

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037818**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.25

(21) Номер заявки
201691502

(22) Дата подачи заявки
2015.03.24

(51) Int. Cl. *A61K 39/085* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) МУТАНТНЫЕ СТАФИЛОКОККОВЫЕ АНТИГЕНЫ

(31) 14161861.1; 14192913.3

(32) 2014.03.26; 2014.11.12

(33) EP

(43) 2017.04.28

(86) PCT/EP2015/056175

(87) WO 2015/144653 2015.10.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС С.А. (BE)**

(72) Изобретатель:
**Баньоли Фабио, Фьяски Луиджи,
Скарселли Мария (IT)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) KIM H K ET AL.: "Nontoxic protein A vaccine for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in mice", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 207, no. 9, 30 August 2010 (2010-08-30), pages 1863-1870, XP002737099, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.20092514 [retrieved on 2010-08-16] abstract, figure 1, page 1864, right-hand column, paragraph 2, page 1866, right-hand column, paragraph 2 - page 1869, column f, paragraph 1

WO-A1-2011127032

WO-A2-2011005341

WO-A1-2012034067

DATABASE WPI Week 201437, Thomson Scientific, London, GB; AN 2014-J07484, XP002739612, -& CN 103 645 318 A (CHONGQING YUANLUN BIOLOGICAL TECHNOLOGY) 19 March 2014 (2014-03-19) abstract; sequence 1

DATABASE WPI Week 201440, Thomson Scientific, London, GB; AN 2014-K04482, XP002739613, -& CN 103 694 322 A (CHONGQING YUANLUN BIOLOGICAL TECHNOLOGY) 2 April 2014 (2014-04-02) abstract; sequences 1-4, paragraphs [0268], [0270], [0299]

WO-A1-2013030378

WO-A2-2010119343

(57) Предложен мутантный SpA со сниженной аффинностью к Fcγ-части человеческого IgG. Иммунизация с использованием EsxA, EsxB, FhuD2, Sta011, Hla и указанного мутантного SpA обеспечивает поразительные результаты в модели абсцесса почки, вызываемого инфекцией S. aureus.

B1

037818

037818

B1

Данная заявка притязает на приоритет Европейских патентных заявок 14161861.1 (подана 26 марта 2014 г.) и 14192913.3 (подана 12 ноября 2014 г.), содержание которых полностью включено в данное описание посредством ссылки для любых целей.

Область изобретения

Данное изобретение относится к иммунизации против инфекции, вызываемой *S. aureus*.

Предшествующий уровень техники

Staphylococcus aureus представляет собой грамположительную сферическую бактерию. В США ежегодная смертность превышает соответствующие показатели любых других инфекционных заболеваний, включая ВИЧ-инфекцию/СПИД, и *S. aureus* является ведущей причиной инфекций кровотока, нижних дыхательных путей, кожи и мягких тканей. Во всем мире он также является доминирующей причиной инфекций костей, и эти инфекции болезненны, ослабляют здоровье и сложны для лечения.

Лечение инфекций, вызываемых *S. aureus*, становится все более затруднительным вследствие развития резистентности к антибиотикам у многих штаммов *S. aureus*. Более чем в половине случаев всех внебольничных и внутригоспитальных инфекций выявляют метициллин-резистентный *S. aureus* (MRSA). В последние годы появились штаммы MRSA, также резистентные к ванкомицину, антибиотику, используемому в самых крайних случаях, которые практически не поддаются лечению.

В настоящее время не существует разрешенной вакцины. Вакцина на основе смеси поверхностных полисахаридов бактериальных типов 5 и 8, StaphVAX™, не снижала показатели инфекции по сравнению группой плацебо в клиническом исследовании III фазы. Сходным образом вакцина V710 [1] на основе антигена IsdB [2] не снижала частоту послеоперационных инфекций, вызываемых *S. aureus* [3].

Потребность в вакцине является особенно острой ввиду проблемы резистентности к антибиотикам и того факта, что инфекция, вызванная *S. aureus*, не обеспечивает иммунитет от будущих инфекций из-за его хорошо развитых способностей к ускользанию от иммунологического надзора. Свойства *S. aureus*, позволяющие ему ускользать от иммунологического надзора, в свою очередь, делают разработку эффективных вакцин более затруднительной. Механизмы ускользания от иммунологического надзора понятны не полностью, но, по меньшей мере частично, обусловлены стафилококковым белком А (SpA), поверхностной молекулой *S. aureus*, связывающейся с Fc иммуноглобулина (Ig) и с Fab-частью В-клеточных рецепторов V_H3-типа. Взаимодействие SpA с В-клеточными рецепторами приводит к клональной экспансии и последующей гибели популяций В-клеток, устраняя адаптивный иммунный ответ. Связывание SpA с Fc Ig препятствует опсонофагоцитарному клиренсу стафилококков полиморфноядерными лейкоцитами.

Разработаны мутантные формы SpA со сниженной аффинностью к иммуноглобулинам. В WO 2011/005341 описан SpA с точечными мутациями в каждом из пяти доменов, связывающихся с Ig, что снижает способность белка связываться с IgG.

В ссылке [4] раскрыты различные подходы к обеспечению улучшенных вакцин против *S. aureus*, включая две предпочтительные комбинации иммуногенов, названные "Combo-1" и "Combo-2". "Combo-1" содержала пять антигенов, EsxA, EsxB, мутантный Hla, FhuD2 и Sta011, в то время как в "Combo-2" вместо мутантного Hla был использован фрагмент IsdA. Обе эти комбинации были испытаны с адьювантами на основе гидрата окиси алюминия, и они увеличивали среднее время выживания в мышинной модели инфекции по сравнению с буфером самим по себе или с антигеном IsdB. "Combo-1" также была испытана с адьювантом на основе гидрата окиси алюминия и агонистом TLR7, и добавление агониста TLR7 улучшало ответы [5].

Несмотря на положительные результаты при использовании "Combo-1" и "Combo-2", сохраняется потребность в дополнительных и улучшенных композициях для иммунизации против *S. aureus*.

Описание изобретения

Белок А (SpA) (SEQ ID NO:43), поверхностный белок *Staphylococcus aureus*, заякоренный в клеточной стенке, способствует ускользанию бактерий от врожденных и адаптивных иммунных ответов. Белок А связывается с иммуноглобулинами в их Fc-части, взаимодействует с V_H3-доменом В-клеточных рецепторов, что приводит к неправильной стимуляции пролиферации и апоптоза В-клеток, связывается с доменами A1 фактора фон Виллебранда, активируя внутриклеточное свертывание, и также связывается с рецептором-1 TNF (фактора некроза опухоли), способствуя патогенезу стафилококковой пневмонии. Ввиду того факта, что белок А связывает иммуноглобулины и демонстрирует токсичные свойства, возможность использования данной поверхностной молекулы в качестве вакцины у людей активно не изучалась. Здесь авторы изобретения демонстрируют, что варианты белка А, более не способные связываться с иммуноглобулинами, лишённые тем самым своего токсигенного потенциала, то есть нетоксигенные, стимулируют гуморальные иммунные ответы, защищающие от стафилококкового заболевания.

Таким образом, согласно изобретению предложены мутантные антигены SpA, как описано ниже. Указанные мутанты предпочтительно имеют сниженную относительно немодифицированного SpA аффинность к Fcγ-части человеческих IgG. Эти мутанты также могут иметь сниженную относительно немодифицированного SpA аффинность к Fab-части V_H3-содержащих человеческих В-клеточных рецепторов.

Авторы изобретения обнаружили, что известная вакцина "Combo-1" может быть улучшена путем добавления мутантного стафилококкового белка А (SpA), модифицированного для снижения его аффин-

ности к Fc γ -части человеческих IgG и к Fab-части V_{H3}-содержащих В-клеточных рецепторов. Этот дополнительный антиген повышает защитную эффективность комбинации и обеспечивает поразительные результаты в модели абсцесса почки. Ни одна из комбинаций антигенов, испытанных в ссылке [4], не включала антиген SpA.

Таким образом, согласно изобретению дополнительно предложена иммуногенная композиция, содержащая антигены EsxA, EsxB, FhuD2, Sta011 и Hla, характеризующаяся тем, что она дополнительно содержит мутантный антиген SpA, имеющий сниженную относительно немодифицированного SpA аффинность к Fc γ -части человеческих IgG и к Fab-части V_{H3}-содержащих человеческих В-клеточных рецепторов.

Согласно изобретению также предложена иммуногенная композиция, содержащая (1) по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, состоящей из антигенов EsxA, EsxB, FhuD2, Sta011 и Hla; и (2) мутантный антиген SpA, имеющий сниженную относительно немодифицированного SpA аффинность к Fc γ -части человеческих IgG и к Fab-части V_{H3}-содержащих человеческих В-клеточных рецепторов. Таким образом, в комбинации с мутантным SpA могут быть использованы 1, 2, 3, 4 или предпочтительно все 5 из EsxA, EsxB, FhuD2, Sta011 и Hla.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, использованные здесь, имеют то же значение, в котором их обычно понимает специалист в соответствующей области.

Для удобства представлены значения определенных терминов и фраз, использованных в описании, примерах и формуле изобретения.

Антигены *S. aureus*

Изобретение относится, среди прочего, к мутантному антигену SpA. SpA (стафилококковый белок А) дикого типа представляет собой поверхностный белок, заякоренный в клеточной стенке, являющийся ключевым фактором вирулентности для развития легочных инфекций, септицемии и абсцессов и экспрессируемый большинством клинических изолятов *S. aureus*. SpA дикого типа связывается с Fc-частью человеческих IgG, с V_{H3}-содержащими В-клеточными рецепторами, с фактором фон Виллебранда в его домене А1 и с рецептором-1 TNF α . Взаимодействие SpA с В-клеточными рецепторами приводит к клональной экспансии и последующей гибели популяций В-клеток, что влияет на адаптивные и врожденные иммунные ответы, в то время как его связывание с Fc γ IgG препятствует опсонофагоцитарному клиренсу стафилококков полиморфноядерными лейкоцитами. N-концевая часть зрелого SpA состоит из четырех или пяти Ig-связывающих доменов из 56-61 остатка, образующих тройные спиральные пучки, соединенных короткими линкерами и обозначаемых в порядке E, D, A, B и C [6]. Эти домены демонстрируют приблизительно 80% идентичность на аминокислотном уровне, имеют длину от 56 до 61 остатка и расположены в форме тандемных повторов [7]. С-концевая область состоит из "Xg", многократно повторяющегося, но варибельного октапептида, и "Xc", домена, примыкающего к структуре, закрепляющей SpA в клеточной стенке.

У штамма NCTC 8325 SpA представляет собой SAOUHSC_00069 и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43 (GI:88193885). У штамма Newman он представляет собой nwmn_0055 (GI:151220267). Антигены SpA, используемые в изобретении, могут приводить к выработке антител (например, при введении человеку), распознающих SEQ ID NO:43, и/или могут содержать аминокислотную последовательность: (а) на 50% или более идентичную (например на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) SEQ ID NO:43; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере из "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO:43, где "n" представляет собой 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). Эти антигены SpA включают варианты SEQ ID NO:43. Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп из SEQ ID NO:43. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:43, сохраняя в то же время по меньшей мере один эпитоп SEQ ID NO:43. Последние 35 С-концевых аминокислот SEQ ID NO:43 могут быть полезным образом пропущены. Первые 36 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:43 могут быть полезным образом пропущены. В ссылке [8] предложено, что отдельные IgG-связывающие домены могут быть полезными иммуногенами, по отдельности или в комбинации.

Полезным фрагментом SEQ ID NO:43 являются аминокислоты 37-325. Этот фрагмент содержит все пять Ig-связывающих доменов SpA (которые расположены естественным образом от N- к С-концу в порядке E, D, A, B, C) и включает наиболее экспонированный домен SpA. Он также уменьшает сходство антигена с человеческими белками. В других полезных фрагментах могут быть пропущены 1, 2, 3 или 4 из природных доменов A, B, C, D и/или E для предотвращения избыточной В-клеточной экспансии и последующего апоптоза, которые могут происходить, если SpA действует как В-клеточный суперантиген. Как указано в ссылке [18], 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 так далее. Таким образом, антиген SpA, используемый в изобретении, может включать 1, 2, 3, 4 или 5 IgG-связывающих доменов, но в идеальном случае имеет 4

или менее.

Таким образом, другой полезный фрагмент SpA содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:50, где две аминокислоты в положениях 60 и 61 не представляют собой Gln-Gln. Указанные две аминокислоты могут быть мутированы, как описано ниже, например, на Lys-Arg. Таким образом, указанный фрагмент может содержать или состоять из SEQ ID NO:51 или 52.

Если антиген включает домен SpA только одного типа (например, только домен SpA(A), SpA(D) или SpA(E)), он может включать более одной копии этого домена, например несколько доменов SpA(E), в одной полипептидной цепи. Он может также включать домен SpA одного типа и другой белок или полипептид. Таким образом, антиген по изобретению может представлять собой слитый белок, содержащий домен SpA только одного типа, такой как домен SpA(E), и другой белковый антиген, такой как EsxB, EsxB, FhuD2, Sta011 и Hla.

Антигены SpA по изобретению мутированы относительно SEQ ID NO:43 таким образом, что они имеют сниженную аффинность к Fcγ-части человеческих IgG. Например, дипептид QQ в остатках 60-61 SEQ ID NO:43 может быть мутирован для снижения аффинности к иммуноглобулинам. Полезные дипептидные замены для дипептида QQ обсуждены ниже, и предпочтительной заменой является дипептид KR. Таким образом, полезный антиген SpA может содержать SEQ ID NO:49, где один или более (предпочтительно все) из 11 дипептидов XX отличаются от соответствующих дипептидов в SEQ ID NO:43. Например, антиген SpA может содержать SEQ ID NO:46, и предпочтительным примером SEQ ID NO:46 является SEQ ID NO:47. При экспрессии с N-концевым метионином антиген SpA, содержащий SEQ ID NO:47, может состоять из SEQ ID NO:48.

Антигены SpA, используемые в изобретении, могут быть дополнительно мутированы относительно SEQ ID NO:43 таким образом, что они имеют сниженную аффинность к Fcγ-части человеческих IgG и к Fab-части V_H3-содержащих человеческих B-клеточных рецепторов. Это может быть осуществлено и оценено, например, следуя руководству, приведенному в ссылке [9]. Таким образом, по меньшей мере один дипептид Gln-Gln в SpA дикого типа может быть мутирован (например, на Lys-Lys; другие возможные мутации включают Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Arg, Ala-Ala, Ser-Ser, Ser-Thr, Thr-Thr и так далее) и/или по меньшей мере один дипептид Asp-Asp в SpA дикого типа может быть мутирован (например, на Ala-Ala; другие возможные мутации включают Lys-Lys, Arg-Arg, Lys-Arg, Arg-Lys, His-His, Val-Val и так далее). Эти целевые последовательности для мутаций подчеркнуты ниже, где тире разделяют пять Ig-связывающих доменов:

```

MKKKNIYSIRKLGVGVIASVTLGTLISGGVTP-AA1NAAQHDEAQQNAFYQVLNMPN2LNADQ3RNGF
IQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSQAPK-ADAQQNNFNK4DQ5SAFYEILNMPN2LNEAQRNGFIQS
LKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK-ADNNFNKEQQNAFYEILNMPN2LNEEQRNGFIQSLKDDPS
QSANLLSEAKKLNESQAPK-ADNKFNKEQQNAFYEILHLPN2LNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLL
AEAKKLNDAQAPK-ADNKFNKEQQNAFYEILHLPN2LTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKL
NDAQAPK-EE1DNNKPGKEDNNKPGKEDNNKPGKEDNNKPGKEDNNKPGKEDNNKPGKEDG2NKPGKEDNNKPGK
EDG2NKPGKEDNNKPGKEDG2NKPGKEDG2NKPGKEDG2NGVHVVKPGD3TVNDIAKANGTTADKIAADN
KLADKNMIKPGQELVVDKKQ4PANHADANKAQA5L1PETGEENPFIGTTVF2GGLSLALGAALLAGRRR
EL
      (SEQ ID NO: 43)
  
```

Отдельный домен антигена может быть мутирован по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотам относительно SEQ ID NO:43 (например, см. выше в отношении последовательностей Gln-Gln и Asp-Asp, но также см. ссылку [22], в которой раскрыты мутации по остаткам 3 и/или 24 домена D, по остаткам 46 и/или 53 домена A и так далее). Такие мутации не должны устранять способность антигена приводить к выработке антитела, распознающего SEQ ID NO:43, но предотвратят связывание антигена с IgG и/или другими человеческими белками (такими как белки человеческой крови), как отмечено выше. В частности, мутантный антиген SpA имеет последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:43, мутированной по меньшей мере по 1, конкретнее по меньшей мере по 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и еще конкретнее 20 аминокислотам в положениях 43, 44, 70, 71, 104, 105, 131, 132, 162, 163, 190, 191, 220, 221, 247, 248, 278, 279, 305 и/или 306 SEQ ID NO:43. Полезные замены для этих положений указаны выше.

Кроме того, нативный N-конец может быть удален, и первые 36 аминокислот SEQ ID NO:43 могут быть полезным образом пропущены. Сходным образом нативный C-конец может быть удален, и последовательность ниже пятого Ig-связывающего домена может быть полезным образом пропущена (то есть ниже Lys-327 в SEQ ID NO:43). Таким образом, полезный антиген SpA содержит SEQ ID NO:44:

```

AQHDEA1XXNAFYQVLNMPN2LNADQ3RNGFIQSLK4XXPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAQQNNFN
KDX5SAFYEILNMPN2LNEAQRNGFIQSLK4XXPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEXXNAF
YEILNMPN2LNEEQRNGFIQSLK4XXPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEXXNAFYEILHLP
NLNEEQRNGFIQSLK4XXPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKFNKEXXNAFYEILHLPN2LTEEQR
NGFIQSLK4XXPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK
  
```

где 10 подчеркнутых дипептидов XX отличаются от соответствующих дипептидов в SEQ ID NO:43.

Таким образом, QQ в этих положениях в SEQ ID NO:43 не будет представлять собой QQ в SEQ ID NO:44 и в идеальном случае не содержит глутаминовых остатков, например, он представляет собой KK. Сходным образом, DD в этих положениях в SEQ ID NO:43 не будет представлять собой DD в SEQ ID NO:44 и в идеальном случае не содержит аспаргатовых остатков, например он представляет собой AA. Таким образом, предпочтительная форма SpA для использования в изобретении содержит SEQ ID NO:45.

Помимо замен по дипептидам XX в SEQ ID NO:44 аминокислотную последовательность можно модифицировать с использованием до 5 одиночных аминокислотных изменений, при условии, что модифицированная последовательность способна приводить к выработке антител, все еще связывающихся с полипептидом, состоящим из SEQ ID NO:44. Таким образом, SEQ ID NO:45 может быть модифицирована 1, 2 или 3 заменами в положениях вне дипептидов XX в SEQ ID NO:44. Например, дипептид QQ в остатках 60-61 SEQ ID NO:44 может быть мутирован для дополнительного снижения аффинности к иммуноглобулинам. Полезные дипептидные замены для дипептида QQ обсуждены выше, и предпочтительной заменой является дипептид KR. Таким образом, полезный антиген SpA может содержать SEQ ID NO:49, где один или более (предпочтительно все) из 11 дипептидов XX отличаются от соответствующих дипептидов в SEQ ID NO:43. Например, антиген SpA может содержать SEQ ID NO:46, и предпочтительным примером SEQ ID NO:46 является SEQ ID NO:47. При экспрессии с N-концевым метионином антиген SpA, содержащий SEQ ID NO:47, может состоять из SEQ ID NO:48.

Как обсуждено выше, полезный фрагмент SpA может содержать только 1, 2, 3 или 4 из природных доменов A, B, C, D и/или E, например содержать только домен SpA(E), а не D, A B или C. Таким образом, антиген SpA, используемый в изобретении, может содержать только домен SpA(E), мутированный, как описано выше, то есть аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:54, мутированной по меньшей мере по 1 аминокислоте в положениях 60 и 61 SEQ ID NO:54, аминокислот 1-67 SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:49 или аминокислот 1-68 SEQ ID NO:48. Например, указанный антиген может содержать SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52 или SEQ ID NO:53. Предпочтительно указанный антиген не будет содержать других последовательностей SpA. Он может включать более одной копии домена SpA(E) и/или дополнительно содержать другой белковый антиген, такой как антиген EsxA, EsxB, FhuD2, Sta011 или Hla, как описано в данном описании.

В комбинациях антигенов по изобретению использованы 1, 2, 3, 4 или все 5 из следующих антигенов: EsxA; EsxB; FhuD2; Sta011; и Hla. Эти пять антигенов уже известны в данной области (например, см. ссылки [4-14]), и дополнительные подробности приведены ниже. Особенно полезная композиция содержит все пять из этих антигенов (предпочтительно, где Hla представлен в нетоксичной (то есть детоксифицированной) мутантной форме).

У штамма NCTC 8325 антиген EsxA имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 (GI:88194063). Антигены EsxA, используемые в настоящем изобретении, могут приводить к выработке антител (например, при введении человеку), распознающих SEQ ID NO:1, и/или могут содержать аминокислотную последовательность: (а) на 50% или более (например, на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) идентичную SEQ ID NO:1; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере из "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO:1, где "n" представляет собой 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или более). Эти полипептиды EsxA включают варианты SEQ ID NO:1. Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп SEQ ID NO:1. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с C-конца и/или одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:1, сохраняя в то же время по меньшей мере один эпитоп SEQ ID NO:1.

У штамма NCTC 8325 антиген EsxB имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 (GI:88194070). EsxB, используемый в настоящем изобретении, может приводить к выработке антител (например, при введении человеку), распознающих SEQ ID NO:2, и/или может содержать аминокислотную последовательность: (а) на 50% или более (например, на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) идентичную SEQ ID NO:2; и/или (б) содержащую фрагмент из по меньшей мере "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO:2, где "n" представляет собой 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более). Эти полипептиды EsxB включают варианты SEQ ID NO:2. Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп SEQ ID NO:2. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с C-конца и/или одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:2, сохраняя в то же время по меньшей мере один эпитоп SEQ ID NO:2. В полезном антигене EsxB нет внутреннего цистеинового остатка SEQ ID NO:2, например он содержит SEQ ID NO:35, где остаток X в положении 30 либо отсутствует, либо представляет собой аминокислотный остаток без свободной тиоловой группы (в восстанавливающих условиях), например представляет собой любую природную аминокислоту, за исключением цистеина.

Антиген FhuD2 аннотирован как "феррихром-связывающий белок" и также изучен в литературе

[15]. Он также известен как Sta006 (например, в ссылках [4-14]). У штамма NCTC 8325 FhuD2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 (GI:88196199). FhuD2, используемый в настоящем изобретении, может приводить к выработке антител (например, при введении человеку), распознающих SEQ ID NO:3, и/или может содержать аминокислотную последовательность: (а) на 50% или более (например, на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) идентичную SEQ ID NO:3; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере из "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO:3, где "n" представляет собой 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). Эти полипептиды FhuD2 включают варианты SEQ ID NO:3. Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп SEQ ID NO:3. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:3, сохраняя в то же время по меньшей мере один эпитоп SEQ ID NO:3. Первые 17 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:3 могут быть полезным образом пропущены (с получением SEQ ID NO:6). О мутантных формах FhuD2 сообщено в ссылке [16]. В полезном антигене FhuD2 нет цистеинового остатка SEQ ID NO:3, например он содержит SEQ ID NO:34 и не включает каких-либо аминокислотных остатков со свободными тиоловыми группами (в восстанавливающих условиях), например он свободен от цистеина. Антиген FhuD2 может быть липидизирован, например, с использованием ацилированного N-концевого цистеина. Одной полезной последовательностью FhuD2 является SEQ ID NO:7, имеющая последовательность Met-Ala-Ser- на N-конце; еще одной такой последовательностью является SEQ ID NO:37, но в ней нет цистеина, присутствующего в SEQ ID NO:7.

У штамма NCTC 8325 антиген Sta011 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 (GI:88193872). Антигены Sta011, используемые в изобретении, могут приводить к выработке антител (например, при введении человеку), распознающих SEQ ID NO:4, и/или могут содержать аминокислотную последовательность: (а) на 50% или более (например, на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) идентичную SEQ ID NO:4; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере из "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO:4, где "n" представляет собой 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). Эти полипептиды Sta011 включают варианты SEQ ID NO:4. Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп SEQ ID NO:4. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:4, сохраняя в то же время по меньшей мере один эпитоп SEQ ID NO:4. Первые 23 N-концевые аминокислоты SEQ ID NO:4 могут быть полезным образом пропущены (с получением SEQ ID NO:33). В полезном антигене Sta011 нет цистеинового остатка SEQ ID NO:4, например он содержит SEQ ID NO:36 и не включает каких-либо аминокислотных остатков со свободными тиоловыми группами (в восстанавливающих условиях), например, он свободен от цистеина. Антиген Sta011 может быть липидизирован, например с использованием ацилированного N-концевого цистеина. Одной полезной последовательностью Sta011 является SEQ ID NO:8, имеющая N-концевой метионин; еще одной такой последовательностью является SEQ ID NO:39, но в ней нет цистеина, присутствующего в SEQ ID NO:8. Вариантные формы SEQ ID NO:4, которые могут быть использованы в качестве или для получения антигенов Sta011, включают без ограничения SEQ ID NO:9, 10 и 11 с различными заменами Ile/Val/Leu (и в изобретении могут также быть использованы варианты этих последовательностей, свободные от Cys). Sta011 может существовать в форме мономера или олигомера, при этом ионы Ca^{++} способствуют олигомеризации. В изобретении могут быть использованы мономеры и/или олигомеры Sta011.

Антиген Hla представляет собой "предшественник альфа-гемолизина", также известный как "альфа-токсин" или просто "гемолизин". У штамма NCTC 8325 Hla имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 (GI:88194865). Hla является важным показателем степени вирулентности, продуцируемым большинством штаммов *S. aureus*, и обладает порообразующей и гемолитической активностью. Антитела против Hla могут нейтрализовать вредные эффекты токсина в животных моделях, и Hla особенно полезен для защиты от пневмонии.

Полезные антигены Hla могут приводить к выработке антител (например, при введении человеку), распознающих SEQ ID NO:5, и/или могут содержать аминокислотную последовательность: (а) на 50% или более (например, на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) идентичную SEQ ID NO:5; и/или (б) содержащую фрагмент по меньшей мере из "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO:5, где "n" представляет собой 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). Эти антигены Hla включают варианты SEQ ID NO:5. Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп SEQ ID NO:5. Другие предпочтительные фрагменты не содержат одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с С-конца и/или одну или более чем одну аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) с N-конца SEQ ID NO:5, сохраняя в то же время по меньшей мере один эпитоп SEQ ID NO:5. Первые 26 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:5 могут быть полезным образом пропущены (например, с получением SEQ ID NO:12). Также может быть применено усечение С-конца,

например, с оставлением только 50 аминокислот (остатки 27-76 SEQ ID NO:5) [17].

В частности, антиген H1a представляет собой детоксифицированный антиген H1a, то есть мутантную форму H1a, где природная токсичность H1a устранена. Токсичности H1a можно избежать путем химической инактивации (например, с использованием формальдегида, глутаральдегида или других поперечно-сшивающих реагентов). Тем не менее, вместо этого предпочтительно использовать мутантные формы H1a без токсической активности, но с сохраненной иммуногенностью. Конкретнее, детоксифицированный антиген H1a представляет собой мутантную форму H1a, где токсичность H1a устранена, но в то же время иммуногенность H1a сохранена. Такие детоксифицированные мутанты уже известны в данной области. Предпочтительный антиген H1a представляет собой мутантный гемолизин *S. aureus*, имеющий мутацию по остатку 61 SEQ ID NO:5, являющемуся остатком 35 зрелого антигена (то есть после пропуска первых 26 N-концевых аминокислот, то есть остатком 35 SEQ ID NO:12). Таким образом, остаток 61 может не представлять собой гистидин и может вместо этого представлять собой, например, Ile, Val или предпочтительно Leu. В этом положении может также быть использована мутация His-Arg. Например, SEQ ID NO:13 представляет собой последовательность зрелой мутантной формы H1a H35L (то есть SEQ ID NO:12 с мутацией H35L), и полезный детоксифицированный антиген H1a имеет последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:13. Другая полезная мутация приводит к замене длинной петли короткой последовательностью, например замене 39-мера в положениях 136-174 SEQ ID NO:5 тетрамером, таким как PSGS (SEQ ID NO:14), как в SEQ ID NO:15 (включающей также мутацию H35L) и SEQ ID NO:16 (не включающей мутацию H35L). Другая полезная мутация приводит к замене остатка Y101, например на лейцин (SEQ ID NO:17). Другая полезная мутация приводит к замене остатка D152, например на лейцин (SEQ ID NO:18). Другая полезная мутация приводит к замене остатков H35 и Y101, например на лейцин (SEQ ID NO:19). Другая полезная мутация приводит к замене остатков H35 и D152, например на лейцин (SEQ ID NO:20).

Другие полезные антигены H1a раскрыты в ссылках [18] и [19].

SEQ ID NO:21, 22 и 23 представляют собой три полезных фрагмента SEQ ID NO:5 (H1a₂₇₋₇₆, H1a₂₇₋₈₉ и H1a₂₇₋₇₉ соответственно). SEQ ID NO:24, 25 и 26 представляют собой соответствующие фрагменты SEQ ID NO:13.

Одной полезной последовательностью H1a является SEQ ID NO:27. Она имеет N-концевой Met, затем дипептид Ala-Ser от вектора экспрессии, затем SEQ ID NO:13 (из штамма NCTC 8325), включающую мутацию H35L.

Там, где композиция включает как антиген EsxA, так и антиген EsxB, они могут присутствовать в виде одного полипептида (то есть слитого полипептида, содержащего или состоящего как из EsxA, так и из EsxB). Таким образом, один полипептид может приводить к выработке антител (например, при введении человеку), распознающих как SEQ ID NO:1, так и SEQ ID NO:2. Этот один полипептид может включать: (1) первую полипептидную последовательность, на 50% или более (например, на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) идентичную SEQ ID NO:1 и/или содержащую фрагмент по меньшей мере из "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO:1, как определено выше для EsxA; и (2) вторую полипептидную последовательность, на 50% или более (например, на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) идентичную SEQ ID NO:2 и/или содержащую фрагмент по меньшей мере из "n" расположенных друг за другом аминокислот SEQ ID NO:2, как определено выше для EsxB. Первая и вторая полипептидные последовательности могут быть расположены в любом порядке, от N- к C-концу. SEQ ID NO:28 (EsxAB) и 29 (EsxBA) являются примерами таких полипептидов, оба из которых имеют гексапептидные линкеры ASGGGS (SEQ ID NO:30). Другой гибрид EsxAB содержит SEQ ID NO:31, которая может быть снабжена N-концевым метионином (например, SEQ ID NO:32). В полезном варианте EsxAB нет внутреннего цистеинового остатка EsxB, например он содержит SEQ ID NO:40, где остаток X в положении 132 либо отсутствует, либо представляет собой аминокислотный остаток без свободной тиоловой группы (в восстанавливающих условиях), например представляет собой любую природную аминокислоту, за исключением цистеина. Таким образом, предпочтительный антиген EsxAB для использования в изобретении имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

Таким образом, полезный полипептид содержит аминокислотную последовательность: (а) на 80% или более (например, на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) идентичную SEQ ID NO:31; и/или (б) содержащую как фрагмент по меньшей мере из "n" расположенных друг за другом аминокислот из аминокислот 1-96 SEQ ID NO:31, так и фрагмент по меньшей мере из "n" расположенных друг за другом аминокислот из аминокислот 103-205 SEQ ID NO:31, где "n" представляет собой 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). Эти полипептиды (например, SEQ ID NO:32) могут приводить к выработке антител (например, при введении человеку), распознающих как стафилококковый белок дикого типа, содержащий SEQ ID NO:1, так и стафилококковый белок дикого типа, содержащий SEQ ID NO:2. Таким образом, иммунный ответ будет распознавать как антиген EsxA, так и антиген EsxB. Предпочтительные фрагменты (б) обеспечивают эпитоп SEQ ID NO:1 и эпитоп SEQ ID NO:2.

В изобретении используют 1, 2, 3, 4 или все 5 из EsxA, EsxB, FhuD2, Sta011 и H1a (предпочтительно,

нетоксичного мутантного H1a). Как указано выше, особенно полезная композиция включает все пять из этих антигенов, но в некоторых воплощениях изобретение включает только 1, 2, 3 или 4 из этих пяти антигенов, то есть 1, 2, 3 или 4 из EsxA, EsxB, FhuD2, Sta011, а H1a в композиции отсутствует.

Предпочтительная композиция включает все четыре из: (1) одного полипептида, включающего как антиген EsxA, так и антиген EsxB, например, содержащего SEQ ID NO:31; (2) антигена FhuD2, например, содержащего SEQ ID NO:6; (3) антигена Sta011, например, содержащего SEQ ID NO:33; и (4) мутантной формы H1a H35L, например, содержащей SEQ ID NO:13.

Несмотря на то, что SEQ ID NO:31, 6, 33 и 13 являются полезными аминокислотными последовательностями в комбинации, изобретение не ограничено этими конкретными последовательностями. Таким образом, 1, 2, 3 или все 4 из этих последовательностей могут быть независимо модифицированы с использованием до 5 одиночных аминокислотных изменений (то есть 1, 2, 3, 4 или 5 одиночными аминокислотными заменами, делециями и/или вставками), при условии, что модифицированная последовательность способна приводить к выработке антител, все еще связывающихся с полипептидом, состоящим из немодифицированной последовательности.

Другая полезная композиция включает все четыре из: (1) первого полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; (2) второго полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; (3) третьего полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8; и (4) четвертого полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27.

Несмотря на то, что SEQ ID NO:32, 7, 8 и 27 являются полезными аминокислотными последовательностями в комбинации, изобретение не ограничено этими конкретными последовательностями. Таким образом, 1, 2, 3 или все 4 из этих четырех последовательностей могут быть независимо модифицированы 1, 2, 3, 4 или 5 одиночными аминокислотными изменениями (то есть 1, 2, 3, 4 или 5 одиночными аминокислотными заменами, делециями и/или вставками), при условии, что модифицированная последовательность способна приводить к выработке антител, все еще связывающихся с полипептидом, состоящим из немодифицированной последовательности. Таким образом, в предпочтительном воплощении композиция содержит эти четыре указанных полипептида с 1, 2, 3 или всеми 4 из SEQ ID NO:32, 7, 8 и 27, независимо модифицированных 1 одиночной аминокислотной заменой, делецией и/или вставкой.

Например, каждая из полипептидных последовательностей FhuD2, Sta011 и EsxAB дикого типа (например, SEQ ID NO:6, 31 и 33) содержит один цистеиновый остаток, который может приводить к дисульфидным связям между полипептидами с образованием как гомодимеров, так и гетеродимеров. Такие связанные между собой полипептиды нежелательны, и поэтому последовательности Sta006, Sta011 и EsxB могут быть модифицированы для удаления их природных цистеиновых остатков так, чтобы они не содержали свободных тиоловых групп (в восстанавливающих условиях). Цистеин дикого типа может быть удален или может быть заменен другой аминокислотой.

Таким образом, антиген FhuD2 может содержать SEQ ID NO:34, антиген Sta011 может содержать SEQ ID NO:36 и антиген EsxB может содержать SEQ ID NO:35 (например, как гибрид EsxAB, содержащий SEQ ID NO:40). Примеры таких последовательностей включают без ограничения SEQ ID NO:37, 39 и 38. Эти последовательности могут быть использованы по отдельности вместо соответствующих последовательностей дикого типа или в комбинации. Таким образом, особенно полезная композиция содержит все четыре из: (1) первого полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38; (2) второго полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; (3) третьего полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39; (4) четвертого полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27.

Таким образом, предпочтительная композиция по изобретению содержит все пять из: (1) одного полипептида, содержащего как антиген EsxA, так и антиген EsxB, например содержащего SEQ ID NO:31; (2) антигена FhuD2, например, содержащего SEQ ID NO:6; (3) антигена Sta011, например, содержащего SEQ ID NO:33; (4) мутантной формы H1a H35L, например, содержащей SEQ ID NO:13; (5) мутантного SpA, например, содержащего SEQ ID NO:45 или 47, или антигена, содержащего его отдельный домен, например SEQ ID NO:50, 51, 52 или 53. Таким образом, в частности, композиция по изобретению содержит:

(1) один полипептид, содержащий как антиген EsxA, так и антиген EsxB, в частности имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:31;

(2) антиген FhuD2, в частности имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:6;

(3) антиген Sta011, в частности имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:33;

(4) мутантную форму H1a H35L, в частности имеющую последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:13;

(5) мутантный антиген SpA, в частности имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:52.

Другая предпочтительная композиция по изобретению содержит:

(1) первый полипептид, имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID

NO:32, конкретнее состоящую из SEQ ID NO:32;

(2) второй полипептид, имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:7, конкретнее состоящую из SEQ ID NO:7;

(3) третий полипептид, имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:8, конкретнее состоящую из SEQ ID NO:8;

(4) четвертый полипептид, имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:27, конкретнее состоящую из SEQ ID NO:27; и

(5) пятый полипептид, имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:52, конкретнее содержащую или состоящую из SEQ ID NO:45, модифицированной с использованием до 3 аминокислотных замен (например, содержащую SEQ ID NO:47 или состоящую из SEQ ID NO:48).

Другая предпочтительная композиция по изобретению содержит:

(1) первый полипептид, имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:38, конкретнее состоящую из SEQ ID NO:38;

(2) второй полипептид, имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:37, конкретнее состоящую из SEQ ID NO:37;

(3) третий полипептид, имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:39, конкретнее состоящую из SEQ ID NO:39;

(4) четвертый полипептид, имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:27, конкретнее состоящую из SEQ ID NO:27;

(5) пятый полипептид, имеющий последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:52, конкретнее SEQ ID NO:45, модифицированной с использованием до 3 аминокислотных замен (например, содержащую SEQ ID NO:47 или состоящую из SEQ ID NO:48).

Белки (1)-(5) в этих комбинациях могут, как объяснено выше, быть независимо модифицированы с использованием до 5 одиночных аминокислотных изменений, при условии, что модифицированная последовательность способна приводить к выработке антител, все еще связывающихся с полипептидом, состоящим из немодифицированной последовательности. В некоторых воплощениях композиция может содержать один или более чем один дополнительный полипептид, в других воплощениях единственными полипептидами в композиции являются эти пять указанных полипептидов, и эти полипептиды могут даже быть единственными иммуногенными компонентами в композиции.

Когда присутствует более чем один полипептид, они могут присутствовать по существу в равных массах, то есть масса каждого из них отличается от средней массы всех полипептидов не более чем на $\pm 5\%$. Таким образом, когда присутствуют пять полипептидов, они могут присутствовать в массовом соотношении a:b:c:d:e, где каждое из a-e составляет от 0,95 до 1,05.

Помимо EsxA, EsxB, Hla, FhuD2, Sta011 и SpA, существуют другие антигены *S. aureus*, и композиция возможно может содержать один или более чем один дополнительный антиген *S. aureus*. Например, для *S. aureus* известны как сахаридные, так и полипептидные антигены. Таким образом, композиция может содержать сахаридный антиген *S. aureus*, например известные сахаридные антигены включают экзополисахарид *S. aureus*, представляющий собой поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG), и капсульные сахараиды *S. aureus*, которые могут быть, например, типа 5, типа 8 или типа 336. Композиция может также содержать антиген ClfA, антиген IsdA, антиген IsdB, антиген IsdC и/или антиген IsdH (каждый из которых определен на страницах 15-17 ссылки [5]).

В некоторых воплощениях композиция содержит антиген *S. aureus*, как определено выше, и также антиген из другого микроорганизма (например, вируса или другой бактерии).

Иммуногенные композиции и лекарственные средства

Иммуногенные композиции по изобретению могут быть полезны в качестве вакцин. Вакцины по изобретению могут быть профилактическими (то есть для предотвращения инфекции) или терапевтическими (то есть для лечения инфекции), но обычно будут профилактическими.

Композиции могут, таким образом, быть фармацевтически приемлемыми. Они будут обычно содержать компоненты, в дополнение к антигенам, например они обычно содержат один или более чем один фармацевтический носитель и/или эксципиент. Подробное обсуждение таких компонентов представлено в ссылке [121].

Композиции будут обычно вводить млекопитающему в водной форме. Перед введением, тем не менее, композиция может быть представлена в неводной форме. Например, несмотря на то, что некоторые вакцины изготавливают в водной форме, после чего помещают в емкости, распространяют и вводят также в водной форме, другие вакцины лиофилизируют при изготовлении и восстанавливают в водную форму во время применения. Таким образом, композиция может быть высушенной, такой как лиофилизованная композиция. В ссылке [10] раскрыто применение лиофилизации иммуногенных композиций *S. aureus*.

Композиция может содержать консерванты, такие как тиомерсал или 2-феноксизтанол. Тем не менее, предпочтительно, чтобы вакцина была по существу свободна (то есть содержала менее 5 мкг/мл) ртути-содержащих веществ, например свободна от тиомерсала. Более предпочтительны вакцины, не содержащие ртути. Особенно предпочтительны вакцины, свободные от консервантов.

Для улучшения термостабильности композиция может содержать термозащитный агент (см. ниже).

Для контроля тоничности предпочтительно включать физиологическую соль, такую как соль натрия. Предпочтителен хлорид натрия (NaCl), который может присутствовать в количестве от 1 до 20 мг/мл, например приблизительно 10 ± 2 мг/мл NaCl. Другие соли, которые могут присутствовать, включают хлорид калия, дигидрофосфат калия, дегидрат гидрофосфата натрия, хлорид магния, хлорид кальция и так далее.

Осмоляльность композиций будет обычно составлять от 200 до 400 мОсмоль/кг, предпочтительно 240-360 мОсмоль/кг, и будет более предпочтительно входить в диапазон 290-310 мОсмоль/кг.

Композиции могут содержать один или более чем один буфер. Типичные буферы включают фосфатный буфер, трис-буфер (трисгидроксиметиламинометан), боратный буфер, сукцинатный буфер, гистидиновый буфер (в частности с адьювантом на основе гидрата окиси алюминия) или цитратный буфер. Содержание буферов будет обычно входить в диапазон 5-20 мМ.

Композиции могут содержать хелатор ионов металлов, в частности хелатор двухвалентных ионов металлов, такой как EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота). В ссылке [10] раскрыто, что включение EDTA может улучшать стабильность композиций, раскрытых в данном описании. Конечная концентрация EDTA в иммуногенной композиции может составлять приблизительно 1-50 мМ, приблизительно 1-10 мМ или приблизительно 1-5 мМ, предпочтительно приблизительно 2,5 мМ.

pH композиции будет обычно составлять от 5,0 до 8,1 и чаще от 6,0 до 8,0, например от 6,5 до 7,5 или от 7,0 до 7,8.

Предпочтительно композиция стерильна. Предпочтительно композиция апирогенна, например содержит менее 1 EU (эндотоксиновых единиц, стандартное измерение) на дозу и предпочтительно менее 0,1 EU на дозу. Предпочтительно композиция свободна от глутена.

Композиция может содержать материал для одной иммунизации или может содержать материал для нескольких иммунизаций (то есть "многодозовый" набор). В многодозовых вариантах предпочтительно включение консерванта. В качестве альтернативы (или в дополнение к) включению консерванта в многодозовые композиции композиции могут быть помещены в контейнер с асептическим адаптером для извлечения материала.

Инфекции, вызываемые *S. aureus*, могут поражать различные области тела, и поэтому композиция может быть изготовлена в различных формах. Например, композиция может быть изготовлена в формах для инъекций в виде жидких растворов или суспензий. Также могут быть изготовлены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких наполнителях перед инъекцией (например, лиофилированная композиция или композиция, полученная распылительной сублимационной сушкой). Может быть изготовлена композиция для местного введения, например в форме мази, крема или порошка. Может быть изготовлена композиция для перорального введения, например в форме таблетки или капсулы, в форме спрея или в форме сиропа (возможно, с корригентом). Может быть изготовлена композиция для введения в легкие, например в форме ингалятора с использованием тонкоизмельченного порошка или спрея. Может быть изготовлена композиция в форме суппозитория или пессария. Может быть изготовлена композиция для назального, ушного или глазного введения, например в форме капель. Композиция может быть в форме набора, разработанного таким образом, что комбинированную композицию восстанавливают непосредственно перед введением пациенту. Такие наборы могут содержать один или более чем один антиген в жидкой форме и один или более чем один лиофилированный антиген.

Там, где композиция предназначена для приготовления непосредственно перед применением (например, где компонент присутствует в лиофилированной форме) и представлена в форме набора, этот набор может содержать два флакона или он может содержать один готовый заполненный шприц и один флакон, где содержимое шприца используют для реактивации содержимого флакона перед инъекцией.

Вакцины для людей обычно вводят в объеме дозы приблизительно 0,5 мл, однако половинный объем (то есть приблизительно 0,25 мл) может также быть полезен, например, для детей.

Иммуногенные композиции, вводимые согласно изобретению, могут также содержать один или более чем один иммунорегуляторный агент. Предпочтительно один или более чем один иммунорегуляторный агент включает один или более чем один адьювант (см. ниже).

Композиции могут вызывать как клеточно-опосредованный иммунный ответ, так и гуморальный иммунный ответ. Этот иммунный ответ будет предпочтительно индуцировать длительно сохраняющиеся (например, нейтрализующие) антитела и клеточно-опосредованный иммунитет, способный быстро отвечать на контакт со *S. aureus*.

Иммуногенные композиции, используемые в качестве вакцин, содержат иммунологически эффективное количество антигена (антигенов), а также по необходимости любые другие компоненты. Под "иммунологически эффективным количеством" понимают, что введение этого количества индивиду в разовой дозе или в качестве части серии эффективно для лечения или предотвращения. Это количество варьирует в зависимости от состояния здоровья и физического состояния индивида, подлежащего лечению, возраста, таксономической группы индивида, подлежащего лечению (например, примат, не являющийся человеком, примат и так далее), способности иммунной системы индивида синтезировать антитела, желаемой степени защиты, состава вакцины, оценки медико-санитарной обстановки лечащим врачом и других имеющих значение факторов. Ожидают, что это количество будет входить в относительно ши-

рокий диапазон, который может быть определен рутинными исследованиями. Там, где композиция содержит более чем один антиген, два антигена могут присутствовать в одинаковой дозе или в разных дозах.

Как указано выше, композиция может содержать термозащитный агент, и этот компонент может быть особенно полезным в композициях с адьювантами (в частности, тех, которые содержат минеральный адьювант, такой как соль алюминия). Как описано в ссылке [20], жидкий термозащитный агент может быть добавлен в водную вакцинную композицию для снижения ее точки замерзания, например для снижения точки замерзания ниже 0°C. Таким образом, композицию можно хранить при температуре ниже 0°C, но выше ее точки замерзания, для ингибирования термического разложения. Термозащитный агент также позволяет замораживать композицию, защищая минеральные солевые адьюванты от агломерации или осаждения после заморозки и размораживания, и может также защищать композицию при повышенных температурах, например выше 40°C. Начальную водную вакцину и жидкий термозащитный агент можно смешивать таким образом, чтобы жидкий термозащитный агент составлял 1-80% конечной смеси по объему. Подходящие термозащитные агенты должны быть безопасными при введении человеку, легко смешиваемыми/растворимыми в воде и не должны повреждать другие компоненты композиции (например, антиген и адьювант). Примеры включают глицерин, пропиленгликоль и/или полиэтиленгликоль (PEG). Подходящие PEG могут иметь среднюю молекулярную массу в диапазоне 200-20000 Да. В предпочтительном воплощении полиэтиленгликоль может иметь среднюю молекулярную массу приблизительно 300 Да (PEG-300).

Способы лечения и введение иммуногенной композиции

Изобретение относится к иммуногенной композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

Изобретение также относится к иммуногенной композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства в предотвращении и/или лечении инфекции, вызываемой *S. aureus*.

Согласно изобретению также предложен способ предотвращения и/или лечения инфекции, вызываемой *S. aureus*, у млекопитающего, включающий стадию введения млекопитающему, нуждающемуся в этом, иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции по изобретению, как определено выше. Полезные воплощения определены выше.

Согласно изобретению также предложено применение (1) по меньшей мере одного антигена, выбранного из группы, состоящей из антигенов EsxA, EsxB, FhuD2, Sta011 и Hla; и (2) мутантного антигена SpA, имеющего сниженную относительно немодифицированного SpA аффинность к Fcγ-части человеческих IgG и к Fab-части V_H3-содержащих человеческих B-клеточных рецепторов, в изготовлении лекарственного средства для предотвращения или лечения инфекции, вызываемой *S. aureus*, у млекопитающего. Полезные воплощения определены выше.

Согласно изобретению также предложен (1) по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, состоящей из антигенов EsxA, EsxB, FhuD2, Sta011 и Hla; и (2) мутантный антиген SpA, имеющий сниженную относительно немодифицированного SpA аффинность к Fcγ-части человеческих IgG и к Fab-части V_H3-содержащих человеческих B-клеточных рецепторов, для применения в иммунизации млекопитающего для предотвращения или лечения инфекции, вызываемой *S. aureus*. Полезные воплощения определены выше.

Согласно изобретению также предложен (1) по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, состоящей из антигенов EsxA, EsxB, FhuD2, Sta011 и Hla; и (2) мутантный антиген SpA, имеющий сниженную относительно немодифицированного SpA аффинность к Fcγ-части человеческих IgG и к Fab-части V_H3-содержащих человеческих B-клеточных рецепторов, для применения в способе иммунизации млекопитающего для предотвращения или лечения инфекции, вызываемой *S. aureus*, введением терапевтически эффективного количества антигенов млекопитающему. Полезные воплощения определены выше.

Как указано выше, в комбинации с мутантным SpA могут быть использованы 1, 2, 3, 4 или предпочтительно все 5 из EsxA, EsxB, FhuD2, Sta011 и Hla. Таким образом, способы, применения, композиции и комбинации антигенов по изобретению вызывают иммунный ответ, эффективный для предотвращения или лечения инфекций, вызываемых *S. aureus*. Иммунный ответ может включать антитела и/или клеточно-опосредованный иммунитет. Посредством иммунного ответа, вызванного у млекопитающего этими применениями и способами, млекопитающее может быть защищено от инфекции, вызываемой *S. aureus*, включая нозокомиальную инфекцию. Конкретнее, млекопитающее может быть защищено от кожной инфекции, пневмонии, менингита, остеомиелита, эндокардита, синдрома токсического шока и/или септицемии. Изобретение также полезно для защиты млекопитающего от инфекции костей и суставов, вызываемой *S. aureus* (и, таким образом, для предотвращения расстройств, включающих без ограничения остеомиелит, септический артрит и инфекцию протезированного сустава). Во многих случаях эти расстройства могут быть связаны с образованием биопленки *S. aureus*.

S. aureus инфицирует различных млекопитающих (включая коров, собак, лошадей и свиней), но предпочтительным млекопитающим для применения по изобретению является человек. Человек может представлять собой ребенка (например, ребенка младшего возраста или младенца), подростка или взрослого. В некоторых воплощениях человек может иметь протез кости или сустава, или ему может быть

выполнено такое протезирование (например, пациент перед ортопедической операцией). Вакцину, предназначенную для детей, можно также вводить взрослым, например, для оценки безопасности, дозы, иммуногенности и так далее. Тем не менее, вакцины не являются подходящими исключительно для этих групп и могут быть использованы в более широкой человеческой популяции.

Один способ проверки эффективности терапевтического лечения включает мониторинг инфекции, вызываемой *S. aureus*, после введения композиций или антигенов по изобретению. Один способ проверки эффективности профилактического лечения включает мониторинг иммунных ответов, системных (такой как мониторинг уровня продукции IgG1 и IgG2a) и/или в слизистых оболочках (такой как мониторинг уровня продукции IgA), против антигенов во вводимой композиции после ее введения. Другим способом оценки иммуногенности композиций является рекомбинантная экспрессия антигенов для скрининга сыворонок или секретов слизистых оболочек пациентов с использованием иммуноблоттинга и/или микрочипов. Положительная реакция между белком и образцом от пациента указывает на развитие у пациента иммунного ответа на рассматриваемый белок.

Эффективность вакцинных композиций может также быть определена *in vivo* введением вакцинных композиций в моделях инфекции, вызываемой *S. aureus*, у животных, например морских свинок или мышей. Существует три полезные в большинстве случаев животные модели для изучения инфекционных заболеваний, вызываемых *S. aureus*, а именно: (1) модель абсцесса у мышей [21], (2) модель летальной инфекции у мышей [21] и (3) модель пневмонии у мышей [22]. В модели абсцесса оценивают абсцессы в почках мышей после внутривенного заражения. В модели летальной инфекции оценивают число мышей, выживающих после внутривенного или внутрибрюшинного инфицирования обычной летальной дозой *S. aureus*. В модели пневмонии также оценивают показатель выживаемости, но применяют интраназальное инфицирование. Другие полезные модели для изучения заболеваний, вызываемых *S. aureus* в связи с опосредованной биопленками инфекцией имплантата, инфекцией кожи и мягких тканей (SSTI) и сепсисом, раскрыты в ссылке [23]. Полезная вакцина может быть эффективна в одной или более из этих моделей. Например, для некоторых клинических ситуаций может быть желательной защита от пневмонии без необходимости предотвращения гемического распространения или стимулирования опсонизации, в других ситуациях основной задачей может быть предотвращение гемического распространения или сепсиса. Различные антигены и различные комбинации антигенов могут вносить вклад в различные аспекты эффективной вакцины.

Композиции будут обычно вводить непосредственно пациенту. Прямая доставка может быть осуществлена парентеральной инъекцией (например, подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно, внутримышечно или в интерстициальное пространство ткани) или через слизистые оболочки, например, ректальным, пероральным (например, таблетка, спрей), вагинальным, местным, трансдермальным или чрескожным, интраназальным, глазным, ушным, легочным или другим введением через слизистые оболочки. Внутримышечная инъекция является наиболее типичным путем введения композиций по изобретению.

Изобретение может быть применено для индукции системного иммунитета и/или иммунитета слизистых оболочек, предпочтительно для индукции усиленного системного иммунитета и/или иммунитета слизистых оболочек. Предпочтительно отражением усиленного системного иммунитета и/или иммунитета слизистых оболочек является усиленный Th1- и/или Th2-иммунный ответ. Предпочтительно усиленный иммунный ответ включает усиленное образование IgG1, и/или IgG2a, и/или IgA.

Введение может представлять собой однократную схему или многократную схему. Несколько доз могут быть использованы в схеме первичной иммунизации и/или в схеме повторной иммунизации. В многократной схеме различные дозы можно вводить одним и тем же или разными способами введения, например парентеральное первичное введение с повторным введением через слизистые оболочки, первичное введение через слизистые оболочки с повторным парентеральным введением и так далее. Несколько доз будут обычно вводить с интервалом по меньшей мере 1 неделя (например, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 6 недель, приблизительно 8 недель, приблизительно 10 недель, приблизительно 12 недель, приблизительно 16 недель и так далее).

Иммуногенные композиции можно вводить пациентам по существу одновременно (например, во время одной и той же медицинской консультации или визита к медицинскому работнику или в вакцинационный центр) с другими вакцинами.

Иммуногенные композиции можно вводить пациентам в комбинации с антибиотиком. Например, их можно вводить по существу одновременно с антибиотиком. Сходным образом их можно вводить субъекту, получающему антибиотикотерапию. Сходным образом их можно вводить в составе комбинированной терапии, включающей введение как композиции, обсуждаемой в данном описании, так и антибиотика. Антибиотик будет представлять собой антибиотик, эффективный против бактерии *S. aureus*, например, бета-лактама.

Штаммы и варианты

Антигены обсуждены выше со ссылкой на существующую номенклатуру (например, EsxA), и примеры последовательностей приведены как GI-номера, а также в перечне последовательностей. Изобретение не ограничено этими конкретными последовательностями. Доступны геномные последовательности нескольких штаммов *S. aureus*, включая геномные последовательности штаммов MRSA N315 и Mh50

[24], MW2, N315, COL, MRSA252, MSSA476, RF122, USA300 (высоко вирулентный), JH1, JH9, NCTC 8325 и Newman. Для идентификации в любой из этих (или других) дополнительных геномных последовательностей гомолога любой конкретной последовательности, упомянутой в данном описании, могут быть применены стандартные методики поиска и выравнивания. Более того, определенные последовательности, раскрытые в данном описании, могут быть использованы для разработки праймеров для амплификации гомологичных последовательностей из других штаммов. Таким образом, изобретение охватывает такие варианты и гомологи из любого штамма *S. aureus*, а также искусственные варианты. Обычно подходящие варианты определенной SEQ ID NO включают ее аллельные варианты, ее полиморфные формы, ее гомологи, ее ортологи, ее паралоги, ее мутанты и так далее.

Таким образом, например, полипептиды, используемые в изобретении, могут, по сравнению с SEQ ID NO, приведенными в данном описании, содержать одну или более чем одну (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и так далее) аминокислотную замену, такую как консервативные замены (то есть замены одной аминокислоты на другую, имеющую родственную боковую цепь). Генетически кодируемые аминокислоты обычно разделяют на четыре семейства: (1) кислые, то есть аспартат, глутамат; (2) основные, то есть лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные, то есть аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные, то есть глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют вместе как ароматические аминокислоты. Обычно замена единичных аминокислот в пределах этих семейств не оказывает значительного эффекта на биологическую активность. Полипептиды могут также содержать одну или более чем одну (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и так далее) одиночную аминокислотную делецию по сравнению с последовательностями SEQ ID NO. Полипептиды могут также содержать одну или более чем одну (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и так далее) вставку (например, из 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот каждая) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO.

Сходным образом полипептид, используемый в изобретении, может содержать аминокислотную последовательность, которая

(а) идентична (то есть на 100% идентична) последовательности, раскрытой в перечне последовательностей;

(б) в некоторой степени идентична (например, на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более) последовательности, раскрытой в перечне последовательностей (в идеальном случае по всей длине указанной последовательности);

(в) имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (или более) одиночных аминокислотных изменений (делеций, вставок, замен), которые могут быть расположены раздельно или могут граничить друг с другом, по сравнению с последовательностями (а) или (б); или

(г) при выравнивании с определенной последовательностью из перечня последовательностей с применением алгоритма попарного выравнивания каждое перемещающееся окно из x аминокислот от N-конца к C-концу (таким образом, что для выравнивания на протяжении p аминокислот, где $p > x$, есть $p-x+1$ таких окон) имеет по меньшей мере $x-y$ идентичных выровненных аминокислот, где x выбран из 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200; y выбран из 0,50, 0,60, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99; и, если $x-y$ не является целым числом, его округляют до ближайшего целого числа. Предпочтительным алгоритмом попарного выравнивания является алгоритм Needleman-Wunsch для выравнивания по всей длине [25] с использованием параметров по умолчанию (например, штраф при начале разрыва 10,0 и штраф при продолжении разрыва 0,5 с использованием матрицы замен EBLOSUM62). Этот алгоритм удобным образом воплощен в инструменте needle в пакете программ EMBOSS [26].

Там, где используют гибридные полипептиды, отдельные антигены в гибриде (то есть отдельные группировки -X-) могут быть от одного или более чем одного штамма. Например, там, где $n=2$, X_2 может быть от того же штамма, что X_1 , или от другого штамма. Там, где $n=3$, штаммы могут быть (1) $X_1=X_2=X_3$; (2) $X_1=X_2 \neq X_3$; (3) $X_1 \neq X_2 = X_3$; (4) $X_1 \neq X_2 \neq X_3$; или (5) $X_1 = X_3 \neq X_2$ и так далее.

В группе (в) делеции или замены могут быть на N-конце и/или C-конце или могут быть между двух концов. Таким образом, усечение является примером делеции. Усечение может включать делецию до 40 (или более) аминокислот на N-конце и/или C-конце. Усечение N-конца может приводить к удалению лидерных пептидов, например для облегчения рекомбинантной экспрессии в гетерологичном хозяине. Усечение C-конца может приводить к удалению якорных последовательностей, например для облегчения рекомбинантной экспрессии в гетерологичном хозяине.

В целом, когда антиген содержит последовательность, не идентичную полноразмерной последовательности *S. aureus* из перечня последовательностей (например, когда он содержит последовательность, идентичную ей менее чем на 100% или когда он содержит ее фрагмент), в каждом отдельном случае предпочтительно, чтобы антиген мог приводить к выработке антител, распознающих соответствующую полноразмерную последовательность *S. aureus*.

Полипептиды, используемые в изобретении

Полипептиды, используемые в изобретении, могут быть представлены в различных формах (на-

пример, нативной, слитой, гликозилированной, негликозилированной, липидизированной, нелипидизированной, фосфорилированной, нефосфорилированной, миристоилированной, немиристоилированной, мономерной, мультимерной и так далее).

Полипептиды, используемые в изобретении, могут быть получены различными способами (например, рекомбинантной экспрессией, очисткой из клеточной культуры, химическим синтезом и так далее). Рекомбинантно экспрессированные белки предпочтительны, в частности, для гибридных полипептидов.

Полипептиды, используемые в изобретении, предпочтительно представлены в очищенной или по существу очищенной форме, то есть по существу свободны от других полипептидов (например, свободны от полипептидов, встречающихся в природе), в частности от других стафилококковых полипептидов или полипептидов клетки-хозяина, и степень их чистоты в большинстве случаев составляет по меньшей мере приблизительно 50% (по массе) и обычно по меньшей мере приблизительно 90%, то есть другие экспрессированные полипептиды составляют менее приблизительно 50% и более предпочтительно менее приблизительно 10% (например, 5%) композиции. Таким образом, антигены в композициях отделены от целого организма, экспрессирующего молекулы.

Термин "полипептид" относится к аминокислотным полимерам любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и он может прерываться неаминокислотными компонентами. Термин также охватывает аминокислотный полимер, модифицированный естественным или искусственным образом; например, образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидизированием, ацетилизированием, фосфорилированием или любой другой манипуляцией или модификацией, такой как конъюгация с компонентом, содержащим метку. Также включены, например, полипептиды, содержащие один или более чем один аналог аминокислот (включая, например, искусственные аминокислоты и так далее), а также другие модификации, известные в данной области. Полипептиды могут иметь форму отдельных цепей или связанных цепей.

Несмотря на то, что экспрессия полипептидов по изобретению может происходить в *Staphylococcus*, для экспрессии в изобретении будут обычно использовать гетерологичного хозяина (рекомбинантная экспрессия). Гетерологичный хозяин может быть прокариотическим (например, бактерия) или эукариотическим. Он может представлять собой *E. coli*, но другие подходящие хозяева включают *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (например, *M. tuberculosis*), дрожжи и так далее. По сравнению с генами *S. aureus* дикого типа, кодирующими полипептиды по изобретению, желательным является изменить кодоны для оптимизации эффективности экспрессии в таких хозяевах без влияния на кодируемые аминокислоты.

Адьюванты

Как указано выше, иммуногенные композиции, используемые согласно изобретению, могут содержать один или более чем один адьювант. Адьюванты, которые могут быть использованы в изобретении, включают без ограничения следующее.

А. Минералсодержащие композиции.

Минералсодержащие композиции, подходящие для использования в изобретении в качестве адьювантов, включают минеральные соли, такие как соли алюминия и соли кальция (или их смеси). Соли кальция включают фосфат кальция (например, САР-частицы, раскрытые в ссылке [27]). Соли алюминия включают гидраты окиси, фосфаты и так далее в любой подходящей форме (например, гель, кристаллические формы, аморфные формы и так далее). Предпочтительна адсорбция на эти соли (например, все антигены могут быть адсорбированы). Минералсодержащие композиции могут также быть изготовлены в форме частиц соли металла [28].

Могут быть использованы адьюванты, известные как гидрат окиси алюминия и фосфат алюминия. Эти названия являются общепринятыми, но их используют только для удобства, поскольку ни одно из них не является точным описанием фактически присутствующего химического соединения (например, см. главу 9 ссылки [29]). В изобретении может быть использован любой из адьювантов "гидрат окиси" или "фосфат", обычно используемых в качестве адьювантов. Адьюванты, известные как "гидрат окиси алюминия", обычно представляют собой оксигидроксидные соли алюминия (*aluminium oxyhydroxide salts*), обычно, по меньшей мере частично, кристаллические. Адьюванты, известные как "фосфат алюминия", обычно представляют собой гидроксифосфаты алюминия, часто содержащие также небольшое количество сульфата (то есть гидроксифосфатсульфат алюминия). Они могут быть получены осаждением, и условия взаимодействия и концентрации во время осаждения влияют на степень замещения гидроксила фосфатом в соли.

Для адьювантов на основе гидрата окиси алюминия типично волокнистое строение (например, как видно на фотографиях, полученных при трансмиссионной электронной микроскопии), рI адьювантов на основе гидрата окиси алюминия обычно составляет приблизительно 11, то есть адьювант сам по себе имеет положительный поверхностный заряд при физиологическом рН. Согласно сообщениям адьюванты на основе гидрата окиси алюминия обладают адсорбционной способностью 1,8-2,6 мг белка на мг Al^{+++} при рН 7,4.

Адьюванты на основе фосфата алюминия обычно имеют молярное отношение PO_4/Al от 0,3 до 1,2, предпочтительно от 0,8 до 1,2 и более предпочтительно 0,95±0,1. Фосфат алюминия будет обычно

аморфным, в частности для гидроксифосфатных солей. Типичным адьювантом является аморфный гидроксифосфат алюминия с молярным отношением PO_4/Al от 0,84 до 0,92, включенный в количестве 0,6 мг Al^{3+} /мл. Фосфат алюминия будет обычно иметь форму частиц (например, пластинчатого строения, как видно на фотографиях, полученных при трансмиссионной электронной микроскопии). Типичные диаметры частиц после адсорбции любого антигена входят в диапазон 0,5-20 мкм (например, приблизительно 5-10 мкм). Согласно сообщениям адьюванты на основе фосфата алюминия обладают адсорбционной способностью 0,7-1,5 мг белка на мг Al^{+++} при pH 7,4.

Точка нулевого заряда (PZC) фосфата алюминия находится в обратной зависимости от степени замещения гидроксила фосфатом, и эта степень замещения может варьировать в зависимости от условий взаимодействия и концентрации взаимодействующих веществ, используемых для получения соли осаждением. PZC также меняется при изменении концентрации свободных фосфат-ионов в растворе (больше фосфата - более кислая PZC) или при добавлении буфера, такого как гистидиновый буфер (делает PZC более основной). Фосфаты алюминия, используемые согласно изобретению, будут обычно иметь PZC от 4,0 до 7,0, более предпочтительно от 5,0 до 6,5, например приблизительно 5,7.

Суспензии солей алюминия, используемые для получения композиций по изобретению, могут содержать буфер (например, фосфатный, гистидиновый или трис-буфер), но это не всегда необходимо. Суспензии предпочтительно стерильны и апирогенны. Суспензия может содержать свободные водные фосфат-ионы, например, присутствующие в концентрации от 1,0 до 20 мМ, предпочтительно от 5 до 15 мМ и более предпочтительно приблизительно 10 мМ. Суспензии могут также содержать хлорид натрия.

В изобретении может быть использована смесь гидрата окиси алюминия и фосфата алюминия. В этом случае фосфата алюминия может быть больше, чем гидрата окиси, например, с массовым отношением по меньшей мере 2:1, например 5:1 или более, 6:1 или более, 7:1 или более, 8:1 или более, 9:1 или более и так далее.

Концентрация Al^{+++} в композиции для введения пациенту предпочтительно составляет менее 10 мг/мл, например 5 мг/мл или менее, 4 мг/мл или менее, 3 мг/мл или менее, 2 мг/мл или менее, 1 мг/мл или менее и так далее. Предпочтительный диапазон составляет от 0,3 до 1 мг/мл. Предпочтительное максимальное количество на одну дозу составляет 0,85 мг.

Б. Эмульсии типа "масло в воде".

Эмульсионные композиции типа "масло в воде", подходящие для использования в изобретении в качестве адьювантов, включают эмульсии сквалена в воде, такие как MF59 (см. главу 10 ссылки [29], см. также ссылку [30]) и AS03 [31].

Известны различные адьюванты в форме эмульсий типа "масло в воде", и они обычно содержат по меньшей мере одно масло и по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество, являющиеся биоразлагаемыми (метаболизуемыми) и биологически совместимыми. Эмульсия будет содержать субмикронные капли масла, и предпочтительны эмульсии с каплями диаметром менее 220 нм, поскольку их можно стерилизовать фильтрацией.

Эмульсия содержит одно или более чем одно масло. Подходящие масла включают масла, полученные, например, из животных (таких как рыба) или растительных источников. В идеальном случае масло является биоразлагаемым (метаболизуемым) и биологически совместимым. Источники растительных масел включают орехи, семена и злаки. Примерами ореховых масел являются наиболее общедоступные арахисовое масло, соевое масло, кокосовое масло и оливковое масло. Может быть использовано масло жожоба, например, полученное из бобов жожоба. Масла из семян включают сафлоровое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, кунжутное масло и тому подобное. В группе злаков наиболее легкодоступным является кукурузное масло, но может также быть использовано масло других хлебных злаков, таких как пшеница, овес, рожь, рис, тэфф, тритикале и тому подобное. Несмотря на то, что эфиры жирных кислот, содержащих 6-10 атомов углерода, глицерина и 1,2-пропандиола, не встречаются естественным образом в маслах из семян, они могут быть получены гидролизом, разделением и этерификацией подходящих веществ, начиная с масел из орехов и семян. Жиры и масла из молока млекопитающих являются метаболизуемыми и, таким образом, могут быть использованы. Методики разделения, очистки, омыления и другие способы, необходимые для получения чистых масел из животных источников, хорошо известны в данной области.

Большинство рыб содержат метаболизуемые масла, которые могут быть легко выделены. Примерами некоторых рыбьих жиров, которые могут быть использованы в данном описании, являются, например, жир печени трески, жир печени акулы и китовый жир, такой как спермацет. Ряд масел с разветвленной цепью проходят биосинтез в 5-углеродных изопреновых единицах, и их обычно называют терпеноидами. Предпочтительные эмульсии содержат сквален, жир из печени акулы, представляющий собой разветвленный ненасыщенный терпеноид. Также может быть использован сквалан, насыщенный аналог сквалена. Рыбьи жиры, включая сквален и сквалан, легко доступны из коммерческих источников или могут быть получены способами, известными в данной области.

Другими полезными маслами являются токоферолы, в частности в комбинации со скваленом. Там, где масляная фаза эмульсии содержит токоферол, может быть использован любой из α -, β -, γ -, δ -, ϵ - или

ζ-токоферолов, но предпочтительны α-токоферолы. Могут быть использованы как D-α-токоферол, так и DL-α-токоферол. Предпочтительный α-токоферол представляет собой DL-α-токоферол. Может быть использована комбинация масел, содержащая сквален и токоферол (например, DL-α-токоферол).

Масло в эмульсии может содержать комбинацию масел, например сквален и по меньшей мере одно другое масло.

Водный компонент эмульсии может представлять собой простую воду (например, воду для инъекций) или может содержать дополнительные компоненты, например растворенные вещества. Например, он может содержать соли для получения буфера, например цитратные или фосфатные соли, такие как соли натрия. Типичные буферы включают фосфатный буфер, трис-буфер, боратный буфер, сукцинатный буфер, гистидиновый буфер или цитратный буфер. Забуференная водная фаза предпочтительна, и содержание буферов будет обычно входить в диапазон 5-20 мМ.

В дополнение к маслу и катионному липиду, эмульсия может содержать неионное поверхностно-активное вещество и/или цвиттер-ионное поверхностно-активное вещество. Такие поверхностно-активные вещества включают без ограничения поверхностно-активные вещества на основе сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана (обычно называемые Tween), особенно полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO) и/или бутиленоксида (BO), имеющиеся в продаже под торговым названием DOWFAX™, такие как линейные блок-сополимеры EO/PO; октоксинолы, которые могут варьировать по числу повторяющихся этокси(окси-1,2-этандинильных) групп, из которых особый интерес представляет октоксинол-9 (Triton X-100 или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол); (октилфеноксиполиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин (лецитин); простые эфиры полиоксиэтилена и жирных спиртов, имеющие происхождение из лаурилового, цетилового, стеарилового и олеилового спиртов (известные как поверхностно-активные вещества Brij), такие как триэтиленгликоль-монолауриловый эфир (Brij 30); полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир; и сложные эфиры сорбитана (обычно известные как Span), такие как сорбитантриолеат (Span 85) и сорбитанмонолаурат. Предпочтительными поверхностно-активными веществами для включения в эмульсию являются полисорбат 80 (Tween 80; полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат), Span 85 (сорбитантриолеат), лецитин и Triton X-100.

Можно использовать смеси поверхностно-активных веществ, например смеси Tween 80/Span 85 или смеси Tween 80/Triton X-100. Комбинация сложного эфира полиоксиэтиленсорбитана, такого как полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (Tween 80), и октоксинала, такого как трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол (Triton X-100), также является подходящей. Другая полезная комбинация включает лаурет-9 со сложным эфиром полиоксиэтиленсорбитана и/или октоксиналом. Полезные смеси могут содержать поверхностно-активное вещество с показателем HLB (гидрофильно-липофильный баланс) в диапазоне 10-20 (например, полисорбат 80 с HLB 15,0) и поверхностно-активное вещество с показателем HLB в диапазоне 1-10 (например, сорбитантриолеат с HLB 1,8).

Предпочтительные количества масла (% по объему) в конечной эмульсии составляют 2-20%, например 5-15%, 6-14%, 7-13%, 8-12%. Особенно полезным является содержание сквалена приблизительно 4-6% или приблизительно 9-11%.

Предпочтительные количества поверхностно-активных веществ (% по массе) в конечной эмульсии составляют от 0,001 до 8%. Например, для сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана (таких как полисорбат 80) - от 0,2 до 4%, в частности 0,4-0,6%, 0,45-0,55%, приблизительно 0,5 или 1,5-2, 1,8-2,2, 1,9-2,1%, приблизительно 2%, или 0,85-0,95%, или приблизительно 1%; для сложных эфиров сорбитана (таких как сорбитантриолеат) - от 0,02 до 2%, в частности приблизительно 0,5 или приблизительно 1%; для октил- или нонилфеноксиполиоксиэтанолов (таких как Triton X-100) - от 0,001 до 0,1%, в частности от 0,005 до 0,02%; для эфиров полиоксиэтилена (таких как лаурет-9) - от 0,1 до 8%, предпочтительно от 0,1 до 10%, и в частности от 0,1 до 1% или приблизительно 0,5%.

Абсолютные количества масла и поверхностно-активного вещества и их отношение могут варьировать в широких пределах, при этом масло и поверхностно-активное вещество все еще будут образовывать эмульсию. Специалист в данной области сможет легко изменить относительные пропорции компонентов для получения желаемой эмульсии, но типичное массовое отношение масла и поверхностно-активного вещества составляет от 4:1 до 5:1 (избыток масла).

Важным параметром для обеспечения иммуностимулирующей активности эмульсии, особенно у крупных животных, является размер (диаметр) капель масла. Наиболее эффективные эмульсии имеют размер капель в субмикронном диапазоне. Подходящим образом размер капель будет в диапазоне 50-750 нм. Наиболее полезным образом средний размер капель составляет менее 250 нм, например менее 200 нм, менее 150 нм. Полезным образом, средний размер капель входит в диапазон 80-180 нм. В идеальном случае по меньшей мере 80% (по числу) капель масла в эмульсии имеют диаметр менее 250 нм, и предпочтительно по меньшей мере 90%. Этих размеров капель можно легко достичь такими методиками как микрофлюидизация. В продаже имеются приборы для определения среднего размера капель в эмульсии и их распределения по размеру. В таких приборах обычно применяют методики динамического светорассеяния и/или одночастичного оптического считывания (single-particle optical sensing), например серии

приборов Accusizer™ и Nicomp™, доступные от Particle Sizing Systems (Santa Barbara, USA), или приборы Zetasizer™ от Malvern Instruments (UK), или приборы Particle Size Distribution Analyzer от Horiba (Kyoto, Japan).

В идеальном случае распределение капель по размеру (исходя из их числа) имеет только один максимум, то есть присутствует одна популяция капель, распределенная вокруг среднего (моды), а не два максимума. Предпочтительные эмульсии имеют полидисперсность менее 0,4, например, 0,3, 0,2 или менее.

Конкретные адьюванты на основе эмульсий типа "масло в воде", пригодные для изобретения, включают без ограничения следующее.

Субмикронная эмульсия сквалена, Tween 80 и Span 85. Эмульсия может содержать приблизительно 5% сквалена, приблизительно 0,5% полисорбата 80 и приблизительно 0,5% Span 85 по объему. По массе эти отношения составляют 4,3% сквалена, 0,5% полисорбата 80 и 0,48% Span 85. Этот адьювант известен как MF59 [32-34], как описано более подробно в главе 10 ссылки [35] и главе 12 ссылки [36]. Эмульсия MF59 предпочтительно содержит цитрат-ионы, например буфер с 10 мМ цитрата натрия.

Эмульсия, содержащая сквален, токоферол и полисорбат 80. Эмульсия может содержать забуференный фосфатом физиологический раствор. Эти эмульсии могут иметь от 2 до 10% сквалена, от 2 до 10% токоферола и от 0,3 до 3% полисорбата 80 по объему, и массовое отношение сквален:токоферол предпочтительно составляет менее 1 (например, 0,90), поскольку это позволяет обеспечить более стабильную эмульсию. Сквален и полисорбат 80 могут присутствовать в объемном отношении приблизительно 5:2 или в массовом отношении приблизительно 11:5. Таким образом, три компонента (сквален, токоферол, полисорбат 80) могут присутствовать в массовом отношении 1068:1186:485 или приблизительно 55:61:25. Одна такая эмульсия (AS03) может быть получена растворением Tween 80 в PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор) с получением 2%-ного раствора, затем смешиванием 90 мл этого раствора со смесью 5 г DL- α -токоферола и 5 мл сквалена с последующей микрофлюидизацией полученной смеси. Полученная эмульсия может иметь субмикронные капли масла, например со средним диаметром от 100 до 250 нм, предпочтительно приблизительно 180 нм. Эмульсия может также содержать 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3d-MPL). Другая полезная эмульсия этого типа может содержать на одну дозу для человека, 0,5-10 мг сквалена, 0,5-11 мг токоферола и 0,1-4 мг полисорбата 80 [37], например в отношениях, рассмотренных выше.

Эмульсия сквалена, токоферола и детергента Triton (например, Triton X-100). Эмульсия может также содержать 3d-MPL (см. ниже). Эмульсия может содержать фосфатный буфер.

Эмульсия, содержащая полисорбат (например, полисорбат 80), детергент Triton (например, Triton X-100) и токоферол (например, сукцинат α -токоферола). Эмульсия может содержать эти три компонента в массовом отношении приблизительно 75:11:10 (например, 750 мкг/мл полисорбата 80, 110 мкг/мл Triton X-100 и 100 мкг/мл сукцината α -токоферола), и эти концентрации должны включать любое поступление этих компонентов из антигенов. Эмульсия может также содержать сквален. Эмульсия может также содержать 3d-MPL (см. ниже). Водная фаза может содержать фосфатный буфер.

Эмульсия сквалана, полисорбата 80 и поллоксамера 401 (Pluronic™ L121). Эмульсия может быть получена в забуференном фосфатом физиологическом растворе, pH 7,4. Эта эмульсия является полезным наполнителем для доставки мурамилдипептидов, и ее используют с треонил-MDP в адьюванте SAF-1 [38] (0,05-1% Thr-MDP, 5% сквалана, 2,5% Pluronic L121 и 0,2% полисорбата 80). Она может также быть использована без Thr-MDP, как в адьюванте AF [39] (5% сквалана, 1,25% Pluronic L121 и 0,2% полисорбата 80). Предпочтительна микрофлюидизация.

Эмульсия, содержащая сквален, водный растворитель, гидрофильное неионное поверхностно-активное вещество на основе полиоксиэтилен-алкилового эфира (например, полиоксиэтиленцетостеариловый эфир (12)) и гидрофобное неионное поверхностно-активное вещество (например, сложный эфир сорбитана или сложный эфир маннида, такой как сорбитанмоноолеат или Span 80). Эмульсия предпочтительно термообратима и/или имеет по меньшей мере 90% капель масла (по объему) размером менее 200 нм [40]. Эмульсия может также содержать одно или более из альдита, криопротектора (например, сахара, такого как додецилмальтозид и/или сахароза) и/или алкилполигликозида. Эмульсия может содержать агонист TLR4 [41]. Такие эмульсии могут быть лиофилизированы.

Эмульсия сквалена, поллоксамера 105 и Abil-Care [42]. Конечная концентрация (масса) этих компонентов в вакцинах с адьювантами составляет 5% сквалена, 4% поллоксамера 105 (плуроник-полиол) и 2% Abil-Care 85 (бис-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 диметикон, триглицерид каприловой/каприновой кислоты).

Эмульсия, имеющая 0,5-50% масла, 0,1-10% фосфолипида и 0,05-5% неионного поверхностно-активного вещества. Как описано в ссылке [43], предпочтительными фосфолипидными компонентами являются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидилглицерин, фосфатидная кислота, сфингомиелин и кардиолипин. Предпочтительны субмикронные размеры капель.

Субмикронная эмульсия типа "масло в воде" из неметаболизируемого масла (такого как легкое минеральное масло) и по меньшей мере одного поверхностно-активного вещества (такого как лецитин, Tween 80 или Span 80). Могут быть включены добавки, такие как сапонин QuilA, холестерин, липофиль-

ный конъюгат сапонина (такой как GPI-0100, описанный в ссылке [44], получаемый добавлением алифатического амина к дезацилсапонину через карбоксильную группу глюкуроновой кислоты), бромид диметилдиоктадециламмония и/или N,N-диоктадецил-N,N-бис(2-гидроксиэтил)пропандиамин.

Эмульсия, в которой сапонин (например, QuilA или QS21) и стерин (например, холестерин) связаны в форме спиральных мицелл [45].

Эмульсия, содержащая минеральное масло, неионный липофильный этоксилированный жирный спирт и неионное гидрофильное поверхностно-активное вещество (например, этоксилированный жирный спирт и/или блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена [46]).

Эмульсия, содержащая минеральное масло, неионный гидрофильный этоксилированный жирный спирт и неионное липофильное поверхностно-активное вещество (например, этоксилированный жирный спирт и/или блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена [46]).

В некоторых воплощениях эмульсию можно смешивать с антигеном (антигенами) непосредственно перед применением, во время доставки, и, таким образом, адъювант и антиген (антигены) можно хранить по отдельности в упакованной или распространяемой вакцине, готовыми для приготвления конечной композиции во время применения. В других воплощениях эмульсию смешивают с антигеном в процессе изготовления и, таким образом, композицию упаковывают в жидкой форме с адъювантом. Антиген будет обычно в водной форме, так что конечную вакцину получают, смешивая две жидкости. Объемное отношение двух жидкостей для смешивания может варьировать (например, от 5:1 до 1:5), но обычно составляет приблизительно 1:1. Там, где концентрации компонентов указаны в приведенных выше описаниях конкретных эмульсий, эти концентрации обычно указаны для неразбавленной композиции, и, таким образом, после смешивания с раствором антигена концентрации будут меньше.

В. Сапониновые композиции (глава 22 ссылки [29]).

Сапониновые композиции могут также быть использованы в изобретении в качестве адъювантов. Сапонины представляют собой разнородную группу стеридных гликозидов и тритерпеноидных гликозидов, обнаруженных в коре, листьях, стволах, корнях и даже цветках широкого спектра видов растений. Сапонины из коры дерева *Quillaja saponaria* Molina подробно изучены в качестве адъювантов. В продаже также имеются сапонины, полученные из *Smilax ornata* (сассапариль), *Gypsophilla paniculata* (перекати поле) и *Saponaria officianalis* (мыльный корень). Сапониновые адъювантные композиции включают очищенные композиции, такие как QS21, а также липидные композиции, такие как ISCOM (комплексы с иммуностимулирующими свойствами). QS21 имеется в продаже как Stimulon™.

Сапониновые композиции очищают с применением HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографии) и RP-HPLC (обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии). С применением этих методик были идентифицированы конкретные очищенные фракции, включая QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B и QH-C. Предпочтительно сапонин представляет собой QS21. Способ получения QS21 раскрыт в ссылке [47]. Сапониновые композиции могут также содержать стерин, такой как холестерин [48].

Комбинации сапонинов и холестерина могут быть использованы для получения частиц, называемых ISCOM (глава 23 ссылки [29]). ISCOM обычно также содержат фосфолипид, такой как фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин. В ISCOM может быть использован любой известный сапонин. Предпочтительно ISCOM содержат одно или более из QuilA, QHA и QHC. ISCOM, также описаны в ссылках [48-50]. Возможно, ISCOM могут не содержать дополнительный детергент [51].

Обзоры по разработке адъювантов на основе сапонинов можно найти в ссылках [52] и [53].

Г. Бактериальные или микробные производные.

Адъюванты, подходящие для использования в изобретении, включают бактериальные или микробные производные, такие как нетоксичные производные энтеробактериального липополисахарида (LPS), производные липида А, иммуностимулирующие олигонуклеотиды и АДФ (аденозиндифосфат)-рибозилирующие токсины и их детоксифицированные производные.

Нетоксичные производные LPS включают монофосфориллипид А (MPL) и 3-О-деацелированный MPL (3d-MPL). 3d-MPL представляет собой смесь 3-де-О-ацелированных монофосфориллипидов А с 4, 5 или 6 ацелированными цепями. Предпочтительная форма 3-де-О-ацелированного монофосфориллипид А в виде "малых частиц" раскрыта в ссылке [54]. Такие "малые частицы" 3d-MPL достаточно малы для стерилизации фильтрацией через 0,22 мкм мембрану [54]. Другие нетоксичные производные LPS включают имитаторы монофосфориллипид А, такие аминокислоты глюкозаминидфосфатные производные, например RC-529 (см. ниже).

Производные липида А включают производные липида А *Escherichia coli*, такие как OM-174. OM-174 описан, например, в ссылках [55] и [56].

Имуностимулирующие олигонуклеотиды, подходящие для использования в изобретении в качестве адъювантов, включают нуклеотидные последовательности, содержащие мотив CpG (динуклеотидную последовательность, содержащую неметилированный цитозин, связанный фосфатной связью с гуанозином). Показано, что двухцепочечные РНК и олигонуклеотиды, содержащие палиндромные или поли(dG)-последовательности, также являются иммуностимулирующими.

CpG могут содержать модификации/аналоги нуклеотидов, такие как фосфоротиоатные модифика-

ции, и могут быть двухцепочечными или одноцепочечными. В ссылках [57, 58 и 59] раскрыты возможные замены на аналоги, например замена гуанозина на 2'-дезоксигуанозин. Адьювантный эффект CpG-олигонуклеотидов обсуждается более подробно в ссылках [60-65].

CpG-последовательность может быть направлена на TLR9, как, например, мотив GTCGTT или TTCGTT [66]. CpG-последовательность может быть специфичной в отношении индукции Th1-иммунного ответа, как, например, CpG-A ODN, или она может быть более специфичной в отношении индукции В-клеточного ответа, как, например, CpG-B ODN. CpG-A и CpG-B ODN обсуждаются в ссылках [67-69]. Предпочтительно CpG представляет собой CpG-A ODN.

Предпочтительно CpG-олигонуклеотид сконструирован таким образом, что 5'-конец доступен для распознавания рецепторами. Возможно, две CpG-олигонуклеотидные последовательности могут быть соединены на их 3'-концах с образованием "иммуномеров". См., например, ссылки [66] и [70-72].

Одним полезным CpG-адьювантом является CpG7909, также известный как ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Другим является CpG1826. В качестве альтернативы или в дополнение к использованию CpG-последовательностей могут быть использованы TrG-последовательности [73], и эти олигонуклеотиды могут быть свободны от метилированных мотивов CpG. Иммуностимулирующий олигонуклеотид может быть богат пиримидином. Например, он может содержать более чем один тимидиновый нуклеотид, расположенные друг за другом (например, TTTT, как раскрыто в ссылке [73]), и/или доля тимидина в его нуклеотидном составе может составлять более 25% (например, более 35%, более 40%, более 50%, более 60%, более 80% и так далее). Например, он может содержать более чем один цитозинный нуклеотид, расположенные друг за другом (например, CCCC, как раскрыто в ссылке [73]), и/или доля цитозина в его нуклеотидном составе может составлять более 25% (например, более 35%, более 40%, более 50%, более 60%, более 80% и так далее). Эти олигонуклеотиды могут быть свободны от метилированных мотивов CpG. Иммуностимулирующие олигонуклеотиды будут обычно содержать по меньшей мере 20 нуклеотидов. Они могут содержать менее 100 нуклеотидов.

Особенно полезный адьювант на основе иммуностимулирующих олигонуклеотидов известен как IC-31™ [74]. Таким образом, адьювант, используемый в изобретении, может содержать смесь (1) олигонуклеотида (например, 15-40 нуклеотидов), содержащего по меньшей мере один (и предпочтительно множество) мотив CpI (то есть цитозин, связанный с инозином с образованием динуклеотида), и (2) поликатионного полимера, такого как олигопептид (например, 5-20 аминокислот), содержащий по меньшей мере одну (и предпочтительно множество) трипептидную последовательность Lys-Arg-Lys. Олигонуклеотид может представлять собой дезоксинуклеотид, содержащий 26-мерную последовательность 5'-(IC)₁₃-3' (SEQ ID NO:41). Поликатионный полимер может представлять собой пептид, содержащий 11-мерную аминокислотную последовательность KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO:42). Олигонуклеотид и полимер могут образовывать комплексы, например, как раскрыто в ссылках [75] и [76].

В качестве адьювантов в изобретении могут быть использованы бактериальные АДФ-рибозилирующие токсины и их детоксифицированные производные. Предпочтительно белок имеет происхождение из *E. coli* (термолабильный энтеротоксин *E. coli* (LT)), холеры (СТ) или коклюша (РТ). Применение детоксифицированных АДФ-рибозилирующих токсинов в качестве адьювантов при иммунизации через слизистые оболочки описано в ссылке [77] и при парентеральной иммунизации - в ссылке [78]. Токсин или анатоксин предпочтительно представлены в форме голотоксина, содержащего как субъединицу А, так и субъединицу В. Предпочтительно субъединица А содержит детоксифицирующую мутацию; предпочтительно субъединица В не содержит мутаций. Предпочтительно адьювант представляет собой детоксифицированный мутантный LT, такой как LT-K63, LT-R72 и LT-G192. Применение АДФ-рибозилирующих токсинов и их детоксифицированных производных, в частности LT-K63 и LT-R72, в качестве адьювантов описано в ссылках [79-86]. Полезным мутантным СТ является СТ-E29H [87]. Числовые обозначения аминокислотных замен предпочтительно основаны на выравниваниях субъединиц А и В АДФ-рибозилирующих токсинов, приведенных в ссылке [88], прямо и полностью включенной в данное описание посредством ссылки.

Д. Агонисты TLR.

Композиции могут содержать агонист TLR, то есть соединение, которое может действовать как агонист Toll-подобного рецептора. Наиболее предпочтительно агонист TLR является агонистом человеческих TLR. Агонист TLR может активировать любые из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 или TLR11; предпочтительно он может активировать человеческий TLR4 или человеческий TLR7.

Агонистическая активность соединения в отношении любого конкретного Toll-подобного рецептора может быть определена стандартными анализами. Такие компании как Imgenex и Invivogen поставляют клеточные линии, стабильно котрансфицированные генами человеческих TLR и NFκB с подходящими репортерными генами, для оценки метаболических путей активации TLR. Они разработаны для чувствительного динамического анализа с широким рабочим диапазоном и могут быть использованы для скрининга с высокой пропускной способностью. Для таких клеточных линий типична конститутивная экспрессия одного или двух конкретных TLR. См. также ссылку [89]. В данной области известно много

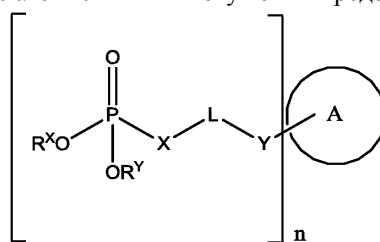
агонистов TLR, например, в ссылке [90] описаны определенные липопептидные молекулы, являющиеся агонистами TLR2, в каждой из ссылок [91-94] описаны классы агонистов TLR7 с небольшими молекулами и в ссылках [95] и [96] описаны агонисты TLR7 и TLR8 для лечения заболеваний.

В идеальном случае агонист TLR, используемый в изобретении, содержит по меньшей мере одну адсорбирующую группировку. Включение таких группировок в агонисты TLR позволяет им адсорбировать нерастворимые соли алюминия (например, посредством лигандного обмена или любого другого подходящего механизма) и улучшает их иммунологические свойства [97]. Особенно полезны фосфорсодержащие адсорбирующие группировки, и, таким образом, адсорбирующая группировка может содержать фосфат, фосфонат, фосфинат, фосфонит, фосфинит и так далее. Предпочтительно агонист TLR содержит по меньшей мере одну фосфонатную группу.

Таким образом, в предпочтительных воплощениях композиция содержит агонист TLR (более предпочтительно, агонист TLR7), содержащий фосфонатную группу. Эта фосфонатная группа может позволять адсорбировать агонист на нерастворимой соли алюминия [97].

Агонисты TLR, используемые в изобретении, могут содержать одну или более чем одну адсорбирующую группировку, например от 2 до 15 адсорбирующих группировок. Обычно соединение будет содержать 1, 2 или 3 адсорбирующие группировки.

Полезные фосфорсодержащие агонисты TLR могут быть представлены формулой (A1):



(A1),

где

R^{X} и R^{Y} независимо выбраны из H и C_1 - C_6 -алкила;

X выбран из ковалентной связи O и NH;

Y выбран из ковалентной связи O, C(O), S и NH;

L представляет собой линкер, например, выбранный из C_1 - C_6 -алкилена, C_1 - C_6 -алкенилена, арилена, гетероарилена, C_1 - C_6 -алкиленокси и $-\text{((CH}_2\text{)}_p\text{O)}_q\text{(CH}_2\text{)}_p-$, каждый из которых, возможно, замещен 1-4 заместителями, независимо выбранными из галогено, OH, C_1 - C_4 -алкила, $-\text{OP(O)(OH)}_2$ и $-\text{P(O)(OH)}_2$;

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5 и 6;

q выбран из 1, 2, 3 и 4;

n выбран из 1, 2 и 3; и

A представляет собой группировку-агонист TLR.

В одном воплощении агонист TLR формулы (A1) представляет собой следующее:

R^{X} и R^{Y} представляют собой H;

X представляет собой O;

L выбран из C_1 - C_6 -алкилена и $-\text{((CH}_2\text{)}_p\text{O)}_q\text{(CH}_2\text{)}_p-$, каждый из которых возможно замещен 1-2 атомами галогена;

p выбран из 1, 2 и 3;

q выбран из 1 и 2;

и n представляет собой 1.

Таким образом, в этих воплощениях адсорбирующая группировка содержит фосфатную группу.

Другие полезные агонисты TLR формулы (A1) раскрыты на страницах 6-13 ссылки [98].

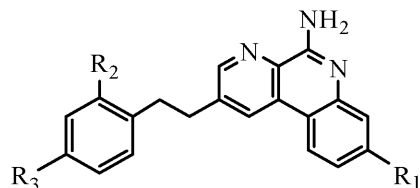
Композиции могут содержать имидазохинолоновое соединение, такое как Imiquimod (R-837) [99, 100], Resiquimod (R-848) [101], их аналоги и их соли (например, гидрохлоридные соли). Дополнительные подробности об иммуностимулирующих имидазохинолинах можно найти в ссылках [102-106].

Композиции могут содержать агонист TLR4 и наиболее предпочтительно агонист человеческого TLR4. TLR4 экспрессируют клетки врожденной иммунной системы, включая обычные дендритные клетки и макрофаги [107]. Стимуляция через TLR4 индуцирует сигнальный каскад с участием как MyD88-, так и TRIF-зависимых путей, что приводит к активации NF- κ B и IRF3/7 соответственно. Активация TLR4 обычно приводит к интенсивному образованию IL-12p70 и значительно усиливает клеточные и гуморальные иммунные ответы Th1-типа.

В данной области известны различные полезные агонисты TLR4, многие из которых являются аналогами эндотоксина или липополисахарида (LPS). Например, агонист TLR4 может представлять собой 3d-MPL (то есть 3-O-деацелированный монофосфориллипид A, присутствующий в адьюванте AS04 от GSK, дополнительные подробности приведены в ссылках [108-111]); глюкопиранозиллипид A (GLA) [112] или его аммониевую соль; аминоктилглюкозаминидфосфат, такой как RC-529 или CRX-524 [113-114].

115]; E5564 [116, 117]; или соединение формулы I, II или III, как определено в ссылке [118], или его соль, такую как соединения ER 803058, ER 803732, ER 804053, ER 804058, ER 804059, ER 804442, ER 804680, ER 803022, ER 804764 или ER 804057 (также известное как E6020).

Изобретение особенно полезно при использовании агонистов человеческого TLR7, таких как соединение формулы (K). Эти агонисты подробно обсуждены в ссылке [119]:



(K),

где

R^1 представляет собой H, C_1 - C_6 -алкил, $-C(R^5)_2OH$, $-L^1R^5$, $-L^1R^6$, $-L^2R^5$, $-L^2R^6$, $-OL^2R^5$ или $-OL^2R^6$;

L^1 представляет собой $-C(O)-$ или $-O-$;

L^2 представляет собой C_1 - C_6 -алкилен, C_2 - C_6 -алкенилен, арилен, гетероарилен или $-((CR^4R^4)_pO)_q(CH_2)_p-$, где C_1 - C_6 -алкилен и C_2 - C_6 -алкенилен в L^2 возможно замещены 1-4 группами фтора; каждый L^3 независимо выбран из C_1 - C_6 -алкилена и $-((CR^4R^4)_pO)_q(CH_2)_p-$, где C_1 - C_6 -алкилен в L^3 возможно замещен 1-4 группами фтора;

L^4 представляет собой арилен или гетероарилен;

R^2 представляет собой H или C_1 - C_6 -алкил;

R^3 выбран из C_1 - C_4 -алкила, $-L^3R^5$, $-L^1R^5$, $-L^3R^7$, $-L^3L^4L^3R^7$, $-L^3L^4R^5$, $-L^3L^4L^3R^5$, $-OL^3R^5$, $-OL^3R^7$, $-OL^3L^4R^7$, $-OL^3L^4L^3R^7$, $-OR^8$, $-OL^3L^4R^5$, $-OL^3L^4L^3R^5$ и $-C(R^5)_2OH$;

каждый R^4 независимо выбран из H и фтора;

R^5 представляет собой $-P(O)(OR^9)_2$;

R^6 представляет собой $-CF_2P(O)(OR^9)_2$ или $-C(O)OR^{10}$;

R^7 представляет собой $-CF_2P(O)(OR^9)_2$ или $-C(O)OR^{10}$;

R^8 представляет собой H или C_1 - C_4 -алкил;

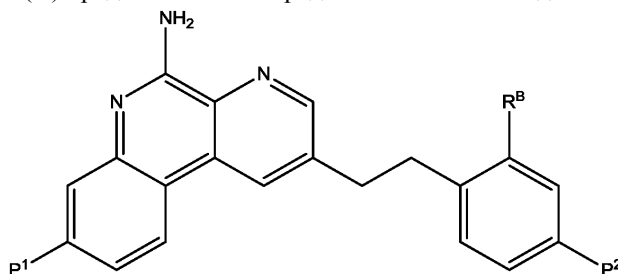
каждый R^9 независимо выбран из H и C_1 - C_6 -алкила;

R^{10} представляет собой H или C_1 - C_4 -алкил;

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5 и 6; и

q представляет собой 1, 2, 3 или 4.

Соединение формулы (K) предпочтительно представляет собой соединение формулы (K'):



(K'),

где

P^1 выбран из H, C_1 - C_6 -алкила, возможно замещенного $COOH$, и $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$;

P^2 выбран из H, C_1 - C_6 -алкила, C_1 - C_6 -алкокси и $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$;

при условии, что по меньшей мере один из P^1 и P^2 представляет собой $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$;

R^B выбран из H и C_1 - C_6 -алкила;

R^X и R^Y независимо выбраны из H и C_1 - C_6 -алкила;

X выбран из ковалентной связи, O и NH;

Y выбран из ковалентной связи, O, C(O), S и NH;

L выбран из ковалентной связи, C_1 - C_6 -алкилена, C_1 - C_6 -алкенилена, арилена, гетероарилена, C_1 - C_6 -алкиленокси и $-((CH_2)_pO)_q(CH_2)_p-$, каждый из которых возможно замещен 1-4 заместителями, независимо выбранными из галогено, OH, C_1 - C_4 -алкила, $-OP(O)(OH)_2$ и $-P(O)(OH)_2$;

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5 и 6; и

q выбран из 1, 2, 3 и 4.

В некоторых воплощениях формулы (K'): P^1 выбран из C_1 - C_6 -алкила, возможно замещенного $COOH$, и $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$;

P^2 выбран из C_1 - C_6 -алкокси, и $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$;

R^B представляет собой C_1 - C_6 -алкил;

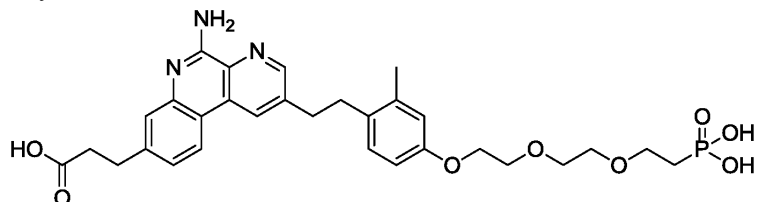
X представляет собой ковалентную связь;

L выбран из C₁-C₆-алкилена и -(CH₂)_pO_q(CH₂)_p-, каждый из которых возможно замещен 1-4 заместителями, независимо выбранными из галогено, OH, C₁-C₄-алкила, -OP(O)(OH)₂ и -P(O)(OH)₂;

каждый p независимо выбран из 1, 2 и 3;

q выбран из 1 и 2.

Предпочтительное соединение формулы (K) для использования в изобретении представляет собой 3-(5-амино-2-(2-метил-4-(2-(2-(2-фосфоэтоксид)этоксид)этоксид)фенетил)бензо[f][1,7]нафтиридин-8-ил)пропановую кислоту или соединение K1:



(K1).

Это соединение может быть использовано как свободное основание или в форме фармацевтически приемлемой соли, например аргининовой соли [120].

E. Микрочастицы.

Микрочастицы могут также быть использованы в изобретении в качестве адъювантов. Предпочтительны микрочастицы (то есть частицы диаметром от приблизительно 100 нм до приблизительно 150 мкм, более предпочтительно от приблизительно 200 нм до приблизительно 30 мкм и наиболее предпочтительно от приблизительно 500 нм до приблизительно 10 мкм), образованные биоразлагаемыми и нетоксичными веществами (например, поли(α-гидроксикислотой), полигидроксимасляной кислотой, полиортоэфиром, полиангидридом, поликапролактоном и так далее) с поли(лактид-со-гликолидом), возможно обработанные для придания их поверхности отрицательного заряда (например, с использованием SDS (додecilсульфата натрия)) или положительного заряда (например, катионным детергентом, таким как СТАВ (бромидом цетил-триметил-аммония)).

Комбинации адъювантов

Отдельные адъюванты, приведенные выше, могут также быть включены в комбинации. Например, может быть использована комбинация адъювантов на основе гидрата окиси алюминия и фосфата алюминия. Сходным образом может быть использована комбинация фосфата алюминия и 3d-MPL.

Особенно предпочтительной комбинацией адъювантов является нерастворимая соль металла (например, соль алюминия, такая как гидрат окиси алюминия) и агонист TLR (например, агонист человеческого TLR7, такой как соединение K1, определенное выше), как раскрыто в ссылках [5] и [97]. Так, в частности, указанный адъювант выбран из группы, состоящей из:

солей алюминия, в частности гидратов окиси алюминия и фосфатов алюминия;

агонистов человеческих TLR, в частности агонистов TLR7;

их смеси.

Агонист TLR предпочтительно адсорбирован на соли металла, и антиген (антигены) *S. aureus* могут также быть адсорбированы на соли металла.

Композиция, содержащая агонист TLR по изобретению, адсорбированный на соли металла, может также содержать буфер (например, фосфатный, гистидиновый или трис-буфер). Тем не менее, когда такая композиция содержит фосфатный буфер, предпочтительно, чтобы концентрация фосфат-ионов в буфере составляла менее 50 мМ, например, менее 40 мМ, менее 30 мМ, менее 20 мМ, менее 10 мМ, или менее 5 мМ, или 1-15 мМ. Предпочтительная концентрация гистидинового буфера составляет, например, 1-50, 5-25 или приблизительно 10 мМ.

Композиция может содержать смесь оксигидроксида алюминия и гидроксифосфата алюминия, и агонист TLR может быть адсорбирован на одной или обеих из этих солей.

Как указано выше, предпочтительное максимальное количество Al⁺⁺⁺ на одну дозу составляет 0,85 мг. Поскольку включение агониста TLR позволяет улучшить адъювантный эффект солей алюминия, изобретение предпочтительно позволяет уменьшить количество Al⁺⁺⁺ на одну дозу, и, таким образом, композиция может полезным образом содержать от 10 до 250 мкг Al⁺⁺⁺ на одну стандартную дозу. Современные вакцины для детей обычно содержат по меньшей мере 300 мкг Al⁺⁺⁺. В пересчете на концентрацию, концентрация Al⁺⁺⁺ в композиции может составлять от 10 до 500 мкг/мл, например 10-300 мкг/мл, 10-200 или 10-100 мкг/мл.

Обычно, когда композиция содержит агонист TLR и соль алюминия, массовое отношение агониста к Al⁺⁺⁺ будет менее 5:1, например менее 4:1, менее 3:1, менее 2:1 или менее 1:1. Таким образом, например, при концентрации Al⁺⁺⁺ 0,5 мг/мл максимальная концентрация агониста TLR будет 1,5 мг/мл. Но могут быть использованы более высокие или более низкие уровни.

Там, где композиция содержит агонист TLR и нерастворимую соль металла, предпочтительно, что-

бы по меньшей мере 50% (по массе) агониста в композиции было адсорбировано на соли металла, например 60% или более, 70% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 92% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более или даже 100%.

Таким образом, в одном воплощении в изобретении используют иммуногенную композицию, содержащую:

адъювант на основе гидрата окиси алюминия;

агонист TLR7 формулы (К), такой как соединение K1;

первый полипептид, содержащий SEQ ID NO:6 или модифицированную аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO:6 наличием до 5 одиночных аминокислотных изменений, при условии, что модифицированная последовательность способна приводить к выработке антител, связывающихся с полипептидом, состоящим из SEQ ID NO:6;

второй полипептид, содержащий SEQ ID NO:13 или модифицированную аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO:13 наличием до 5 одиночных аминокислотных изменений, при условии, что модифицированная последовательность способна приводить к выработке антител, связывающихся с полипептидом, состоящим из SEQ ID NO:13;

третий полипептид, содержащий SEQ ID NO:31 или модифицированную аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO:31 наличием до 5 одиночных аминокислотных изменений, при условии, что модифицированная последовательность способна приводить к выработке антител, связывающихся с полипептидом, состоящим из SEQ ID NO:31;

четвертый полипептид, содержащий SEQ ID NO:33 или модифицированную аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO:33 наличием до 5 одиночных аминокислотных изменений, при условии, что модифицированная последовательность способна приводить к выработке антител, связывающихся с полипептидом, состоящим из SEQ ID NO:33;

пятый полипептид, содержащий SEQ ID NO:45 или модифицированную аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO:45 наличием до 5 одиночных аминокислотных изменений, при условии, что модифицированная последовательность способна приводить к выработке антител, связывающихся с полипептидом, состоящим из SEQ ID NO:45;

где агонист TLR7 и/или по меньшей мере один из полипептидов адсорбирован/адсорбированы на адъюванте на основе гидрата окиси алюминия.

Например, как объяснено более подробно в других разделах настоящей заявки, первый полипептид может содержать SEQ ID NO:34; второй полипептид может содержать SEQ ID NO:13; третий полипептид может содержать SEQ ID NO:40; четвертый полипептид может содержать SEQ ID NO:36; и пятый полипептид может содержать SEQ ID NO:45, возможно модифицированную с использованием до 3 аминокислотных замен (отличных от тех, которые присутствуют в положениях, обозначенных как X в SEQ ID NO:44). Таким образом, в композиции может быть использована смесь пяти полипептидов, имеющих SEQ ID NO:37, 27, 38, 39 и 45 (за исключением того, что SEQ ID NO:45 может быть модифицирована с использованием до 3 аминокислотных замен, как обсуждено выше).

Химические группы

Если конкретно не определено иное, при использовании в настоящем описании химические группы, обсуждаемые в данном описании, имеют следующие значения.

Термин "алкил" включает насыщенные углеводородные остатки, включая

линейные группы из 10 атомов или менее (C_1-C_{10}), или из 6 атомов или менее (C_1-C_6), или из 4 атомов или менее (C_1-C_4); примеры таких алкильных групп включают без ограничения C_1 -метил, C_2 -этил, C_3 -пропил и C_4 -н-бутил;

разветвленные группы из 3-10 атомов (C_3-C_{10}), или из 7 атомов или менее (C_3-C_7), или из 4 атомов или менее (C_3-C_4); примеры таких алкильных групп включают без ограничения C_3 -изопропил, C_4 -втор-бутил, C_4 -изобутил, C_4 -трет-бутил и C_5 -неопентил.

Термин "алкилен" относится к двухвалентному углеводородному радикалу, имеющему происхождение из алкильной группы, и его следует толковать в соответствии с приведенным выше определением.

Термин "алкенил" включает мононенасыщенные углеводородные остатки, включая

линейные группы из 2-6 атомов (C_2-C_6); примеры таких алкенильных групп включают без ограничения C_2 -винил, C_3 -1-пропенил, C_3 -аллил и C_4 -2-бутенил;

разветвленные группы из 3-8 атомов (C_3-C_8); примеры таких алкенильных групп включают без ограничения C_4 -2-метил-2-пропенил и C_6 -2,3-диметил-2-бутенил.

Термин "алкенилен" относится к двухвалентному углеводородному радикалу, имеющему происхождение из алкенильной группы, и его следует толковать в соответствии с приведенным выше определением.

Термин "алкокси" включает O-связанные углеводородные остатки, включая

линейные группы из 1-6 атомов (C_1-C_6) или из 1-4 атомов (C_1-C_4); примеры таких алкоксигрупп включают без ограничения C_1 -метокси, C_2 -этокси, C_3 -н-пропокси и C_4 -н-бутокси;

разветвленные группы из 3-6 атомов (C_3-C_6) или из 3-4 атомов (C_3-C_4); примеры таких алкоксиг-

рупп включают без ограничения C₃-изопропокси и C₄-втор-бутокси и трет-бутокси.

Галогено выбран из Cl, F, Br и I. Предпочтительно галогено представляет собой F.

Термин "арил" включает систему из одиночного или конденсированных ароматических колец, содержащую от 6 до 10 атомов углерода; где, если не указано иное, каждый арил может возможно быть замещен с использованием до 5 заместителей, независимо выбранных из (C₁-C₆)алкила, (C₁-C₆)алкокси, OH, галогено, CN, COOR¹⁴, CF₃ и NR¹⁴R¹⁵, как определено выше. Обычно арил будет возможно замещен 1, 2 или 3 заместителями. Возможные заместители выбраны из заместителей, указанных выше. Примеры подходящих арильных групп включают фенил и нафтил (каждый из которых возможно замещен, как указано выше). "Арилен" относится к двухвалентному радикалу, имеющему происхождение из арильной группы, и его следует толковать в соответствии с приведенным выше определением.

Термин "гетероарил" включает 5-, 6-, 9- или 10-членные моно- или бициклические ароматические кольца, содержащие 1 или 2 атома N и возможно атом NR¹⁴, или один атом NR¹⁴ и атом S или O, или один атом S, или один атом O; где, если не указано иное, указанный гетероарил может возможно быть замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкила, (C₁-C₆)алкокси, OH, галогено, CN, COOR¹⁴, CF₃ и NR¹⁴R¹⁵, как определено ниже. Примеры подходящих гетероарильных групп включают тиенил, фуриил, пирролил, пиразолил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, триазолил, оксадиазолил, тиадиазолил, тетразолил, пиридинил, пиридазинил, пиримидинил, пиазинил, индолил, бензимидазолил, бензотриазолил, хиолинил и изохиолинил (возможно замещенные, как указано выше). Гетероарилен относится к двухвалентному радикалу, имеющему происхождение из гетероарила, и его следует толковать в соответствии с приведенным выше определением.

Термин "гетероцикл" представляет собой C-связанное или N-связанное 3-10-членное неароматическое моно- или бициклическое кольцо, где указанное гетероциклоалкильное кольцо содержит, где это возможно, 1, 2 или 3 гетероатома, независимо выбранных из N, NR¹⁴, S(O)_q и O; и указанное гетероциклоалкильное кольцо, возможно, содержит, где это возможно, 1 или 2 двойные связи и возможно замещено по углероду 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкила, (C₁-C₆)алкокси, OH, CN, CF₃, галогено, COOR¹⁴, NR¹⁴R¹⁵ и арила.

В приведенных выше определениях R¹⁴ и R¹⁵ независимо выбраны из H и (C₁-C₆)алкила.

Когда структурная формула определена заместителем, присоединенным к ядру молекулы неутонченной или "плавающей" связью, например, как для группы R³ в случае формулы (C), это определение охватывает случаи, где неутонченный заместитель присоединен к любому из атомов кольца, в котором расположена плавающая связь, при соответствии валентности, допустимой для этого атома.

В тех случаях, когда соединения по изобретению могут существовать в таутомерных формах (то есть кето-формах или енольных формах), например, соединения формулы (C) или (H), ссылка на определенное соединение, возможно, включает все такие таутомерные формы.

Общее

Если не указано иное, при практическом применении настоящего изобретения будут применены обычные химические, биохимические, молекулярно-биологические, иммунологические и фармакологические методы, находящиеся в компетенции специалиста в данной области. Такие методики полностью описаны в литературе. См., например, ссылки [121-128] и так далее.

В предшествующих разделах использована "GI"-нумерация. GI-номер или "идентификатор GenInfo" представляет собой набор цифр, присваиваемый последовательно каждой записи последовательности, обрабатываемой NCBI при добавлении последовательностей в его базы данных. GI-номер не похож на регистрационный номер записи последовательности. При обновлении последовательности (например, для коррекции или для добавления комментариев или другой информации) она получает новый GI-номер. Таким образом, последовательность, связанная с заданным GI-номером, никогда не меняется.

Там, где в изобретении упомянут "эпитоп", этот эпитоп может представлять собой B-клеточный эпитоп и/или T-клеточный эпитоп. Такие эпитопы могут быть определены эмпирически (например, с применением PEPSCAN [129, 130] или аналогичных методов) или они могут быть спрогнозированы (например, с применением антигенного индекса Jameson-Wolf [131], матричных методов [132], MAPITOPe [133], TERITOPe [134, 135], нейронных сетей [136], OptiMer и EpiMer [137, 138], ADEPT [139], Tsites [140], гидрофильности [141], антигенного индекса [142] или методов, раскрытых в ссылках [143-147], и так далее). Эпитопы являются частями антигена, распознаваемыми и связываемыми антиген-связывающими сайтами антител или T-клеточных рецепторов, и они могут также быть названы "антигенными детерминантами".

Там, где пропущен "домен" антигена, это может включать пропуск сигнального пептида, цитоплазматического домена, трансмембранного домена, внеклеточного домена и так далее.

Термин "содержащий" охватывает "включающий", а также "состоящий", например, композиция, "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может содержать что-либо дополнительное, например, X+Y.

Термин "приблизительно" в связи с числовым значением x является произвольным и означает, например, x±10%.

Ссылки на процент идентичности двух аминокислотных последовательностей обозначает процент

одинаковых аминокислот при выравнивании и сравнении этих двух последовательностей. Такое выравнивание и определение процента гомологии или идентичности последовательностей могут быть проведены с использованием программного обеспечения, известного в данной области, например, описанного в разделе 7.7.18 ссылки [148]. Предпочтительно выравнивание проводят по алгоритму поиска гомологии Smith-Waterman, применяя поиск аффинных разрывов с использованием штрафа за начало разрыва 12, штрафа за продолжение разрыва 2 и матрицы BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Smith-Waterman раскрыт в ссылке [149]. В идеальном случае процент идентичности любой конкретной последовательности (например, конкретной SEQ ID) рассчитывают по всей длине этой последовательности.

Аффинность связывания может быть определена любым методом, известным в данной области, включая поверхностное плазмонное сопротивление, изотермическую титрационную калориметрию, анализы конкурентные связывания, анализ температурного сдвига и так далее. Несмотря на то, что абсолютные значения, полученные с применением разных методов, могут варьировать, предполагают, что определение относительной аффинности связывания одного белка в сравнении с другим не должно зависеть от применяемого метода.

Фосфор-содержащие адьюванты, используемые в изобретении, могут существовать в нескольких протонированных и депротонированных формах, в зависимости от pH окружающей среды, например pH растворителя, в котором они растворены. Таким образом, несмотря на то, что может быть проиллюстрирована одна конкретная форма, подразумевают, что эти иллюстрации являются лишь типичными примерами и не ограничивают изобретение конкретной протонированной или депротонированной формой. Например, в случае фосфатной группы, она была проиллюстрирована как $-OP(O)(OH)_2$, но определение включает протонированные формы $[OP(O)(OH)_2(OH)]^+$ и $-[OP(O)(OH)_2]^{2+}$, которые могут существовать в кислых условиях, и депротонированные формы $-[OP(O)(OH)(O)]^-$ и $[OP(O)(O)_2]^{2-}$, которые могут существовать в щелочных условиях.

Соединения могут существовать в форме фармацевтически приемлемых солей. Таким образом, соединения (например, адьюванты) могут быть использованы в форме их фармацевтически приемлемых солей, то есть физиологически или токсикологически приемлемых солей (включая, когда это уместно, фармацевтически приемлемые соли присоединения оснований и фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот).

Фраза "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, "по существу свободная" от Y, может быть полностью свободной от Y. По необходимости фраза "по существу" в определении по изобретению может быть опущена.

Варианты осуществления изобретения

Мутант SpAkR.

SpA является ключевым фактором вирулентности *S. aureus* и действует, препятствуя опсонофагочитарному клиренсу этих бактерий и устраняя адаптивные иммунные ответы. Последовательность дикого типа SEQ ID NO:43 содержит пять Ig-связывающих доменов (IgBD), как показано выше, и известны мутации аминокислотных остатков в этих доменах, устраняющие Fc/Fab-связывающую активность при сохранении иммуногенности, например, см. ссылку [19], с заменой дипептидов Gln-Gln на Lys-Lys и/или заменой дипептидов Asp-Asp на Ala-Ala.

Получен новый мутантный SpA, в котором еще один дипептид Gln-Gln мутирован на Lys-Arg. Этот дипептид был идентифицирован на основании биоинформационного анализа и прогнозов по дополнительному сайту, вовлеченному в связывание Ig. В частности, была сформулирована гипотеза о том, что остатки 96 и 97 SEQ ID NO:43 вовлечены в связывание Ig. Этот сайт не был отмечен в предыдущих работах, поскольку он расположен за пределами консервативного IgBD и не является частью хорошо изученных структур. Новый мутант назван SpAkR и имеет следующую аминокислотную последовательность, где дополнительная замена QQ/KR, по сравнению с предшествующим мутантом SpAkkAA, заключена в рамку:

```
MAQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAKRRNNF
NKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEKKNA
FYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHL
PNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQ
RNGFIQSLKAAPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK (SEQ ID NO: 48)
```

Подтверждено, что мутант SpAkR имеет сниженную аффинность к иммуноглобулинам, по сравнению с известными мутантами, сохраняя при этом иммуногенность.

CD- и DSC-анализы (DSC-дифференциальная сканирующая калориметрия) показали, что введение мутанта KR не оказывало существенного влияния на структуру SpA. CD-спектры SpAkkAA и SpAKR идентичны. По результатам DSC-анализа, T_{m1} и T_{m2} были следующими. T_{m1} : SpAkkAA 48,9°C; SpAKR 51,1°C. T_{m2} : SpAkkAA 68,1°C; SpAKR 68,0°C.

Аффинность SpA дикого типа и мутантов SpAkkAA и SpAkR к человеческим IgG, IgA и IgM анализировали с применением поверхностного плазмонного резонанса. Белки иммобилизовали на сенсорном чипе и человеческие IgG, IgA и IgM использовали в качестве аналитов. Оба мутанта продемонстрировали

значительно сниженную способность к связыванию по сравнению с диким типом, но, в то время как SpAkkAA показал остаточное связывание с IgG и IgM, при анализе SpAkR никаких обнаружимых взаимодействий ни с одним из иммуноглобулинов выявлено не было. Остаточная связывающая активность SpAkkAA в отношении IgG и IgM была очень низкой (в 11-12 раз ниже, чем у дикого типа), но была воспроизводимой и зависела от концентрации.

Выживаемость *S. aureus* в присутствии SpA (WT, SpAkkAA и SpAkR) оценивали анализом выживаемости в цельной крови (WBA). 1 мл цельной крови от здоровых добровольцев, дополненной антикоагулянтом гепарином (50 мг/л, 10 мкл/мл крови), инкубировали с 0,15 мкМ SpA или с PBS в течение 15 мин при 37°C перед добавлением приблизительно $2,5 \times 10^5$ КОЕ (колониеобразующих единиц) *S. aureus* USA300 LAC (OD₆₀₀ (оптическая плотность) 0,4), разведенных в ВНИ. Аликвоты этой культуры высевали на ВНИ-агар для определения вносимого числа КОЕ. После инкубации при 37°C в течение 2 ч с перемешиванием (180 об/мин) нейтрофилы лизировали 0,5% сапонином в PBS в течение 3 мин на льду. Число жизнеспособных бактерий определяли десятикратным серийным разведением в ВНИ и высеванием на чашки с питательным агаром. Подсчет колоний проводили после инкубации чашек при 37°C в течение 18 ч. Контролем был образец крови, предварительно инкубированный с PBS. Относительную выживаемость рассчитывали, исходя из внесенного числа КОЕ в сравнении с числом КОЕ после инкубации. Эксперименты повторяли трижды; результаты повторных экспериментов различались незначительно.

В WBA относительная выживаемость *S. aureus* в человеческой цельной крови при инкубации с SpAkR была существенно ниже, чем при инкубации с SpA дикого типа ($p < 0,001$, критерий Манна-Уитни) или с SpAkkAA ($p < 0,05$). Инкубация с SpAwt приводила к повышенной выживаемости *S. aureus* по сравнению с контролем ($p < 0,001$), в то время как выживаемость в WBA с инкубацией с SpAkkAA была сопоставима с контролем. Инкубация с SpAkR снижала выживаемость приблизительно до половины выживаемости в контроле.

Было обнаружено, что SpAkkAA или SpAkR сами по себе с адьювантом на основе гидрата окиси алюминия обладали слабой иммуногенностью у мышей, но включение адсорбированного агониста TLR7 K1 существенно повышало титры антител. Поскольку механизм действия, связанный с иммунизацией SpA, по-видимому, обусловлен главным образом антителами, это является важным усовершенствованием.

Вакцины против *S. aureus*

Домены E SpAkR, SpAkkAA, SpAkR сами по себе и домен E SpAkR, слитый с H1a-H35L, анализировали в модели абсцесса почки с использованием адьюванта на основе гидрата окиси алюминия (Al-H) в количестве 2 мг/мл (общее количество соли). Каждый из антигенов присутствовал в количестве 10 мкг в дозе объемом 100 мкл для внутримышечной инъекции.

Мышей (CD1) в возрасте четырех или пяти недель иммунизировали внутримышечно (IM) первичными и повторными инъекциями с интервалом 14 дней. Контрольные мыши получали равные количества адьювантов самих по себе. Сыворотку получали от мышей как до, так и после вакцинации для документирования сывороточных титров антител к каждому белковому компоненту комбинированной вакцины. Эти титры измеряли технологией Lumindex с использованием рекомбинантных антигенов вакцины, конъюгированных с микросферами.

Модель абсцесса почки.

Иммунизированных животных заражали на 24 день внутривенной инъекцией сублетальной дозы штамма *S. aureus* Newman (приблизительно $2-6 \times 10^7$ КОЕ). На 28 день мышей умерщвляли, почки выделяли, гомогенизировали в 2 мл PBS и высевали на агаровые среды в двух повторах для определения колониеобразующих единиц (КОЕ).

При вакцинации доменами E SpAkR, SpAkkAA, SpAkR самими по себе и доменом E SpAkR, слитым с H1a-H35L, было получено сопоставимое уменьшение log₁₀ КОЕ/мл (уменьшение приблизительно на 1 логарифм), по сравнению с адьювантом самим по себе.

Комбинированные вакцины против *S. aureus*.

Получали 5-валентную и 6-валентную вакцины. 5-Валентная вакцина содержала антигены, состоящие из SEQ ID NO:7, 8, 27 и 32 (FhuD2, Sta011, H1a-H35L и EsxAB); 6-валентная вакцина дополнительно содержала мутант SpAkR. В вакцинах присутствовали следующие адьюванты: (1) гидрат окиси алюминия, Al-H; (2) Al-H + адсорбированный агонист TLR7 K1; или (3) эмульсия типа "масло в воде" MF59. Al-H использовали в количестве 2 мг/мл (общее количество соли), K1 присутствовал в количестве 50 мкг на дозу, и MF59 смешивали с антигенами в объемном отношении 1:1. Каждый из антигенов присутствовал в количестве 10 мкг в дозе объемом 100 мкл для внутримышечной инъекции.

Мышей (CD1) в возрасте четырех или пяти недель иммунизировали первичными и повторными инъекциями с интервалом 14 дней. Контрольные мыши получали равные количества адьювантов самих по себе. Сыворотку получали от мышей как до, так и после вакцинации для документирования сывороточных титров антител к каждому белковому компоненту комбинированной вакцины. Эти титры измеряли технологией Lumindex с использованием рекомбинантных антигенов вакцины, конъюгированных с микросферами.

Модель абсцесса почки.

Иммунизированных животных заражали на 24 день внутривенной инъекцией сублетальной дозы *S. aureus* (приблизительно $2-6 \times 10^7$ КОЕ, где конкретная заражающая доза изменялась в зависимости от штамма, использованного для заражения). На 28 день мышей умерщвляли, почки выделяли, гомогенизировали в 2 мл PBS и высевали на агаровые среды в двух повторах для определения колониеобразующих единиц (КОЕ). Почки также использовали для гистопатологического исследования.

Модель перитонита.

Отдельно, иммунизированных животных заражали на 24 день внутрибрюшинной инъекцией летальной дозы *S. aureus* (приблизительно $2-5 \times 10^8$ КОЕ) и затем наблюдали ежедневно на протяжении 14 дней.

Модель кожной инфекции.

Иммунизированных мышей заражали подкожной инъекцией в выбритый правый бок, вводя 2×10^7 КОЕ штамма *S. aureus* LAC (клон USA300, являющийся одним из наиболее значимых клонов по всему миру и тесно связанный с внебольничными кожными инфекциями).

Мониторинг на предмет массы и формирования абсцессов (размера и некроза кожи) проводили с интервалами 24 часа на протяжении 7 дней. Размер абсцессов и связанного с ними некроза расположенной над ними кожи определяли с использованием программного обеспечения для анализа изображений. Забор мышинной кожи и абсцессов для определения числа КОЕ проводили на 7 день после заражения. Эту модель использовали только с адьювантом AI-H/K1.

Результаты были следующими.

	Адьювант сам по себе			5-валентные вакцины			6-валентные вакцины		
	AI-H	AI-H/K1	MF59	AI-H	AI-H/K1	MF59	AI-H	AI-H/K1	MF59
<i>Абсцесс почки</i> – уменьшение логарифма среднего КОЕ/мл									
A	-	-	-	1,5**	1,3**	0,93**	1,57**	2,31**	1,07**
<i>Перитонит</i> – % выживания									
B	29	42	33	67*	88**	67*	83**	92**	71**
<i>Кожная инфекция</i> – уменьшение логарифма среднего КОЕ/мл									
C	N/A	-	-	-	3,35	-	-	4,39	-

* $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем;

** $p < 0,01$ по сравнению с контролем

Эти результаты демонстрируют, что мутант SpAkR улучшает 5-валентный продукт Combo-1 в обеих моделях. Кроме того, наилучшие результаты были отмечены при использовании адьюванта AI-H/K1. Удивительно, что результаты, полученные в модели абсцесса почки с использованием 6-валентной вакцины с AI-H/K1, приближались к стерильности.

В модели перитонита 6-валентная вакцина с AI-H/K1 была статистически лучше по сравнению с отрицательным контролем (см. таблицу выше), а также по сравнению с 5-валентной вакциной с AI-H. В модели абсцесса 6-валентная вакцина с AI-H/K1 была статистически лучше по сравнению с отрицательным контролем (см. таблицу выше), 5-валентной вакциной с AI-H и 5-валентной вакциной с AI-H/K1, демонстрируя, таким образом, что вклад мутантного SpA выходит за пределы усиления, обусловленного только агонистом K1.

В модели кожной инфекции как 5-валентные, так и 6-валентные вакцины значительно уменьшали формирование абсцессов и показатели КОЕ (см. таблицу выше). У вакцинированных мышей не было некроза кожи, в то время как его наблюдали у всех мышей, получавших только адьювант (N/A в таблице). Кроме того, уменьшение КОЕ было значительно больше при включении в вакцину SpAkR, при этом наблюдали меньше мышей с абсцессами, различимыми на макроскопическом уровне (71% против 88%).

Также сравнивали титры антител против SpA при использовании трех адьювантов. Средние титры при использовании AI-H или MF59 статистически не различались, но титр при использовании AI-H/K1 был значимо выше, чем при использовании AI-H самого по себе ($p=0,0047$, критерий Манна-Уитни) и при использовании MF59 ($p=0,01$). Таким образом, композицией с наилучшими показателями в функциональных анализах была композиция, обеспечивавшая наиболее высокие титры антител против SpA, что согласуется с гипотезой, согласно которой активность SpA в качестве антигена в вакцине зависит от антител, способных связываться с ним и ингибировать его активность по ускользанию от иммунологического надзора.

Следует понимать, что изобретение было описано лишь посредством примеров, и возможны модификации, не выходящие за рамки объема и сущности изобретения.

Ссылки.

- [1] Sheridan (2009) *Nature Biotechnology* 27:499-501.
- [2] Kuklin *et al.* (2006) *Infect Immun.* 74(4):2215-23.
- [3] Fowler *et al.* (2013) *JAMA* 309(13):1368-78.
- [4] WO 2010/119343.
- [5] WO 2013/030378.
- [6] Sjodahl (1977) *J. Biochem.* 73:343-351.
- [7] Uhlen *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259:1695-1702 & 13628 (Corr.).
- [8] WO 2007/071692.
- [9] Kim *et al.* (2010) *J Exp Med* 207(9):1863-70.
- [10] WO 2013/092985.
- [11] WO 2014/033190.
- [12] WO 2014/033191.
- [13] WO 2014/033192.
- [14] WO 2014/033193.
- [15] Sebulsky & Heinrichs (2001) *J Bacteriol* 183:4994-5000.
- [16] Sebulsky *et al.* (2003) *J Biol Chem* 278:49890-900.
- [17] Rable & Wardenburg (2009) *Infect Immun* 77:2712-8.
- [18] WO 2007/145689.
- [19] WO 2009/029831.
- [20] WO 2006/110603.
- [21] Stranger-Jones *et al.* (2006) *PNAS USA* 103:16942-7.
- [22] Wardenburg *et al.* (2007) *Infect Immun* 75:1040-4.
- [23] Prabhakara *et al.* (2011) *J Immunol* 186:155-29
- [24] Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357:1225-1240.
- [25] Needleman & Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
- [26] Rice *et al.* (2000) *Trends Genet* 16:276-277.
- [27] Патент США 6355271.
- [28] WO 00/23105.
- [29] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X.

Plenum.

- [30] WO 90/14837.
- [31] Garcon *et al.* (2012) *Expert Rev Vaccines* 11:349-66.
- [32] WO 90/14837.
- [33] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [34] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [35] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [36] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [37] WO 2008/043774.
- [38] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [39] Hariharan *et al.* (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- [40] US 2007/014805.
- [41] US 2007/0191314.
- [42] Suli *et al.* (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.
- [43] WO 95/11700.
- [44] Патент США 6080725.

- [45] WO 2005/097181.
[46] WO 2006/113373.
[47] US 5057540.
[48] WO 96/33739.
[49] EP-A-0109942.
[50] WO 96/11711.
[51] WO 00/07621.
[52] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
[53] Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
[54] EP-A-0689454.
[55] Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
[56] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
[57] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
[58] WO 02/26757.
[59] WO 99/62923.
[60] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
[61] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
[62] WO 98/40100.
[63] US 6207646.
[64] US 6239116.
[65] US 6429199.
[66] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
[67] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
[68] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
[69] WO 01/95935.
[70] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
[71] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
[72] WO 03/035836.
[73] WO 01/22972.
[74] Schellack *et al.* (2006) *Vaccine* 24:5461-72.
[75] Kamath *et al.* (2008) *Eur J Immunol* 38:1247-56.

- [76] Riedl *et al.* (2008) *Vaccine* 26:3461-8.
- [77] WO 95/17211.
- [78] WO 98/42375.
- [79] Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [80] Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [81] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [82] Scharon-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [83] Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [84] Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [85] Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [86] Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [87] Tebbey *et al.* (2000) *Vaccine* 18:2723-34.
- [88] Domenighini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [89] Rosenberg *et al.* (2010) *J Immunol* 184:136.20.
- [90] US 4666886.
- [91] WO 2009/118296.
- [92] WO 2008/005555.
- [93] WO 2009/111337.
- [94] WO 2009/067081.
- [95] WO 2007/040840.
- [96] WO 2010/014913.
- [97] WO 2012/031140.
- [98] WO 2013/132041.
- [99] US 4680338.
- [100] US 4988815.
- [101] WO 92/15582.
- [102] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [103] Wu *et al.* (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
- [104] Vasilakos *et al.* (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
- [105] Патенты США 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265,

6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 и 6924293.

[106] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.

[107] Steinhagen *et al.* (2011) *Vaccine* 29:3341-55.

[108] Myers *et al.* (1990) pages 145-156 of *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*.

[109] Ulrich (2000) Chapter 16 (pages 273-282) of reference 40.

[110] Johnson *et al.* (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.

[111] Baldrick *et al.* (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.

[112] Coler *et al.* (2011) *PLoS ONE* 6(1):e16333.

[113] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.

[114] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.

[115] Bazin *et al.* (2006) *Tetrahedron Lett* 47:2087-92.

[116] Wong *et al.* (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.

[117] US 2005/0215517.

[118] WO 03/011223.

[119] WO 2011/027222.

[120] WO 2013/131985.

[121] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.

[122] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.).

[123] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications).

[124] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[125] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997).

[126] Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).

[127] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press).

- [128] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag).
- [129] Geysen *et al.* (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
- [130] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-23.
- [131] Jameson, BA *et al.* 1988, *CABIOS* 4(1):181-186.
- [132] Radrizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89.
- [133] Bublil *et al.* (2007) *Proteins* 68(1):294-304.
- [134] De Lalla *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29.
- [135] Kwok *et al.* (2001) *Trends Immunol* 22:583-88.
- [136] Brusic *et al.* (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30.
- [137] Meister *et al.* (1995) *Vaccine* 13(6):581-91.
- [138] Roberts *et al.* (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610.
- [139] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7.
- [140] Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1.
- [141] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
- [142] Welling *et al.* (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218.
- [143] Davenport *et al.* (1995) *Immunogenetics* 42:392-297.
- [144] Tsurui & Takahashi (2007) *J Pharmacol Sci.* 105(4):299-316.
- [145] Tong *et al.* (2007) *Brief Bioinform.* 8(2):96-108.
- [146] Schirle *et al.* (2001) *J Immunol Methods.* 257(1-2):1-16.
- [147] Chen *et al.* (2007) *Amino Acids* 33(3):423-8.
- [148] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement 30.
- [149] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:1 (EsxA)

MAMIKMSPEEIRAKSSQSYGQSDQIRQILSDLTRAQGEIAANWEGQAFSRFEEQFQQLSPKVEKFAOLLE
EIKQQLNSTADAVQEQQDQLSNNFGLQ

SEQ ID NO:2 (EsxB)

MGGYKGIKADGGKVDQAKQLAAKTAKDIEACQKQTOQLAEYIEGSDWEGQFANKVKDVLIMAKFOEELV
QPMADHQKAIDNLSQNLAKYDTLSIKQGLDRVNP

SEQ ID NO:3 (FhuD2)

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVAPTYAGGLKKLGANIVA
VNQQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDIIIVYSTDKDIKKYQKVAPTVVVDYNKHKYLEQQE
MLGKIVGKEDKVKAWKDWEEETAKDGEIKKAIQDATVSLFDEFDCKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGL
KMQPEQQKLTAKAGWAEVQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNLTKATKEGHIVKVDAGTYWY
NDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK

SEQ ID NO:4 (Sta011)

MMKRLNKLVLGIIIFLFLVISITAGCGIGKEAEVKKSFKTLSMYPIKNLEDLYDKEGYRDDQFDKNDKGT
WIINSEMVIQPNNEEDMVAKGMVLYMNRNTKTTNGYYYVDVTKDEDEGKPHDNEKRYPVKMVDNKIIP
TKDEKIKKEIENFKFFVQYGDFFKNLKNYKDGDISYNPEVPSYSAKYQLTNDYDYNVKQLRKRYDIPT
SKAPKLLKSGSNLKGSSVGYKDIEFTFVEKKEENIYFSDSLDYKKSQDV

SEQ ID NO:5 (Hla)

MKTRIVSSVTTLLLSGILMNPVANAADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTDGLVTDYDKENGMHKKVYFSFID
DKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKEYMS
TLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWVKVIFNNMVNQNWGPYDR
DSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFDLPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIIDVIYERVRD
DYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN

SEQ ID NO:6 (FhuD2 с SEQ ID NO:3 с усеченным N-концом)

CGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVAPTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKG
VTKIGDGDVEKVAKEKPDIIIVYSTDKDIKKYQKVAPTVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKAWK
DWEETAKDGEIKKAIQDATVSLFDEFDCKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQPEQQKLTAKAGWAE
VKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNLTKATKEGHIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLK
EKLKAAK

SEQ ID NO:7 (пример последовательности FhuD2)

MASCGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVAPTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDK
FKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDIIIVYSTDKDIKKYQKVAPTVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVK
WKKDWEETAKDGEIKKAIQDATVSLFDEFDCKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQPEQQKLTAKAG
WAEVQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNLTKATKEGHIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLK
EKLKAAK

SEQ ID NO:8 (пример последовательности Sta011)

MGCGIGKEAEVKKSFKTLSMYPIKNLEDLYDKEGYRDDQFDKNDKGTWIINSEMVIQPNNEEDMVAKGMV
LYMNRNTKTTNGYYYVDVTKDEDEGKPHDNEKRYPVKMVDNKIIP
TKDEKIKKEIENFKFFVQYGDFFKNLKNYKDGDISYNPEVPSYSAKYQLTNDYDYNVKQLRKRYDIPT
SKAPKLLKSGSNLKGSSVGYKDIEFTFVEKKEENIYFSDSLDYKKSQDV

SEQ ID NO:9 (пример последовательности Sta011)

MMKRLNKLVLGIIIFLFLVISITAGCGIGKEAEVKKSFKTLSMYPIKNLEDLYDKEGYRDDQFDKNDKGT
WIINSEMVIQPNNEEDMVAKGMVLYMNRNTKTTNGYYYVDVTKDEDEGKPHDNEKRYPVKMVDNKIIP
TKDEKIKKEIENFKFFVQYGDFFKNLKNYKDGDISYNPEVPSYSAKYQLTNDYDYNVKQLRKRYDIPT
SKAPKLLKSGSNLKGSSVGYKDIEFTFVEKKEENIYFSDSLDYKKSQDV

SEQ ID NO:10 (пример последовательности Sta011)

MMKRLNKLVLGIIIFLFLVISITAGCGIGKEAEVVKKSFEKTLMSYPIKNLEDLYDKEGYRDDQFDKNDKGT
 WIINSEMVIQPNNEEDMVAKGMVLYMNRNTKTTNGYYYYVDVTKDEDEGKPHDNEKRYPVKMDNKIIPKE
 IKDEKVKKEIENKFFVQYGFKNVKNYKGDIDSYNPEVPSYSAKYQLTNDYDYNVVKQLRKRKYDIPTSKAF
 KLLLKGSGNLKSSVGYKDI EFTFVEKKEENIYFSDSLDYKKS GDV

SEQ ID NO:11 (пример последовательности Sta011)

MMKRLNKLVLGIIIFLFLVISITAGCGIGKEAEVVKKSFEKTLMSYPIKNLEDLYDKEGYRDDQFDKNDKGT
 WIINSEMVIQPNNEEDMVAKGMVLYMNRNTKTTNGYYYYVDVTKDEDEGKPHDNEKRYPVKMDNKIIPKE
 IKDEKLVKKEIENKFFVQYGFKNVKNYKGDIDSYNPEVPSYSAKYQLTNDYDYNVVKQLRKRKYDIPTSKAF
 KLLLKGSGNLKSSVGYKDI EFTFVEKKEENIYFSDSLDYKKS GDV

SEQ ID NO:12 (Hla с SEQ ID NO:5 с усеченным N-концом)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKVKVYFSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSE
 EGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKEYMSTLTGFGNGNVTGDDTGKIGGLIGANV
 SIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWVIFNNMVNQNNGWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
 LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSE
 RYKIDWEKEEMTN

SEQ ID NO:13 (зрелый Hla-H35L)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKVKVYFSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSE
 EGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKEYMSTLTGFGNGNVTGDDTGKIGGLIGANV
 SIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWVIFNNMVNQNNGWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
 LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSE
 RYKIDWEKEEMTN

SEQ ID NO:14 (тетрамер)

PSGS

SEQ ID NO:15 (Hla-H35L с заменой PSGS)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKVKVYFSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSE
 EGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTPSGSVQPDFKTILESPTDKKVGWVIFNNMV
 NQNNGWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI
 DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSE RYKIDWEKEEMTN

SEQ ID NO:16 (Hla с заменой PSGS)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKVKVYFSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSE
 EGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTPSGSVQPDFKTILESPTDKKVGWVIFNNMV
 NQNNGWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI
 DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSE RYKIDWEKEEMTN

SEQ ID NO:17 (Hla с мутацией Y101)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKVKVYFSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSE
 EGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDLYPRNSIDTKEYMSTLTGFGNGNVTGDDTGKIGGLIGANV
 SIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWVIFNNMVNQNNGWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
 LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSE
 RYKIDWEKEEMTN

SEQ ID NO:18 (Hla с мутацией D152)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKVKVYFSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSE
 EGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKEYMSTLTGFGNGNVTGDDTGKIGGLIGANV
 SIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWVIFNNMVNQNNGWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
 LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSE
 RYKIDWEKEEMTN

SEQ ID NO:19 (Hla с мутациями H35 и Y101)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSE
 EGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDLYPRNSIDTKEYMSTLTYGFGNGVNTGDDTGKIGGLIGANV
 SIGHTLKVVQPDFKTI LESPTDKKVGWVKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
 LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI DVYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSE
 RYKIDWEKEEMTN

SEQ ID NO:20 (Hla с мутациями H53 и D152)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSE
 EGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFGNGVNTGDDTGKIGGLIGANV
 SIGHTLKVVQPLFKTILESPTDKKVGWVKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
 LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI DVYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSE
 RYKIDWEKEEMTN

SEQ ID NO:21 (фрагмент Hla)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNK

SEQ ID NO:22 (фрагмент Hla)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAG

SEQ ID NO:23 (фрагмент Hla)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKLL

SEQ ID NO:24 (фрагмент Hla-H35L)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNK

SEQ ID NO:25 (фрагмент Hla-H35L)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAG

SEQ ID NO:26 (фрагмент Hla-H35L)

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKLL

SEQ ID NO:27 (полезная последовательность Hla с мутацией H35L)

MASADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRV
 YSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFGNGVNTGDDTGKIGGLIG
 ANVSIGHTLKVVQPDFKTI LESPTDKKVGWVKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAA
 DNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI DVYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDR
 SSERYKIDWEKEEMTN

SEQ ID NO:28 (пример EsxAB)

MAMIKMSPEEIRAKSQSYGQSDQIRQILSDLTRAQGEIAANWEGQAFSRFEEQFQQLSPKVEKFAQLLE
 EIKQQLNSTADAVQEQDQQLSNNFGLQASGGGSMGGYKGIKADGGKVDQAKQLAAKTAKDIEACQKQTQQL
 LAEYIEGSDWEGQFANKVKDVLIMAKFQEBELVQPMADHQKAI DNLSQNLAKYDTLSIKQGLDRVNP

SEQ ID NO:29 (пример EsxBA)

MGGYKGIKADGGKVDQAKQLAAKTAKDIEACQKQTQQLAEYIEGSDWEGQFANKVKDVLIMAKFQEBELV
 QPMADHQKAI DNLSQNLAKYDTLSIKQGLDRVNPASGGGSMAMIKMSPEEIRAKSQSYGQSDQIRQILS
 DLTRAQGEIAANWEGQAFSRFEEQFQQLSPKVEKFAQLLEEIKQQLNSTADAVQEQDQQLSNNFGLQ

SEQ ID NO:30 (линкер)

ASGGGS

SEQ ID NO:31 (пример EsxAB)

AMIKMSPEEIRAKSQSYGQSDQIRQILSDLTRAQGEIAANWEGQAFSRFEEQFQQLSPKVEKFAQLLEE
 IKQQLNSTADAVQEQDQQLSNNFGLQASGGGSMGGYKGIKADGGKVDQAKQLAAKTAKDIEACQKQTQQLA
 EYIEGSDWEGQFANKVKDVLIMAKFQEBELVQPMADHQKAI DNLSQNLAKYDTLSIKQGLDRVNP

SEQ ID NO:43 (SpA)

MKKKNIYSIRKLGVGIASVTLGTLISGGVTPAANAQHQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVVGAEQKLNDSQAPKADAQQNNFNKDDXXS
 AFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKXXPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEXXNAFYEILNMPNLN
 EEQRNGFIQSLKXXPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNNFNKEXXNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLK
 KADNKNFKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKADNKNFKEQQN
 AFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDQAQPKEDNNKPGKEDNNKPGKEDNNK
 GKEDNNKPGKEDNNKPGKEDGKNKPGKEDNNKPGKEDGKNKPGKEDGKNKPGKEDGKNKPGKEDGKNKPGKEDGKN
 GVHVYKPGDVTNDIAKANGTTADKIAADNKLADKNMIKPGQELVVDKKQAPANHADANKAQALPETGEBENP
 FIGTTVFGGLSLALGAALLAGRREL

SEQ ID NO:44 (SpAkkAA)

AQHDEAXXNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKXXPSQSANVVGAEQKLNDSQAPKADAQQNNFNKDDXXS
 AFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKXXPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEXXNAFYEILNMPNLN
 EEQRNGFIQSLKXXPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKNFKEXXNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLK
 XXPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKADNKNFKEXXNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKXXPSVSKEILAE
 AKKLNDQAQPK

SEQ ID NO:45 (SpAkkAA)

AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVVGAEQKLNDSQAPKADAQQNNFNKDDKKS
 AFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEKKNNAFYEILNMPNLN
 EEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKNFKEKKNNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLK
 AAPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKADNKNFKEKKNNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAE
 AKKLNDQAQPK

SEQ ID NO:46 (SpAkR)

AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVVGAEQKLNDSQAPKADAXXNNFNKDDKKS
 AFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEKKNNAFYEILNMPNLN
 EEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKNFKEKKNNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLK
 AAPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKADNKNFKEKKNNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAE
 AKKLNDQAQPK

SEQ ID NO:47 (SpAkR)

AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVVGAEQKLNDSQAPKADAKRNNFNKDDKKS
 AFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEKKNNAFYEILNMPNLN
 EEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKNFKEKKNNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLK
 AAPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKADNKNFKEKKNNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAE
 AKKLNDQAQPK

SEQ ID NO:48 (SpAkR, использованный в примере)

MAQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVVGAEQKLNDSQAPKADAKRNNFNKDDKKS
 SAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEKKNNAFYEILNMPNLN
 NEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKNFKEKKNNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLK
 KAAPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKADNKNFKEKKNNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAE
 EAKKLNDQAQPK

SEQ ID NO:49 (SpAkR)

AQHDEAXXNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKXXPSQSANVVGAEQKLNDSQAPKADAXXNNFNKDDXXS
 AFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKXXPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEXXNAFYEILNMPNLN
 EEQRNGFIQSLKXXPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKNFKEXXNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLK
 XXPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKADNKNFKEXXNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKXXPSVSKEILAE
 AKKLNDQAQPK

SEQ ID NO:50 (домен E SpAkR)

AQHDEAXXNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKXXPSQSANVVGAEQKLNDSQAPKADAXXNNFNKDD

SEQ ID NO:51 (домен E SpAkR)

AQHDEAXXNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKXXPSQSANVVGAEQKLNDSQAPKADAKRNNFNKDD

SEQ ID NO:52 (домен E SpAkR)

AQHDEAKKNAFYQVLLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAKRNNFNKD

SEQ ID NO:53 (домен E SpAkR, использованный в примере)

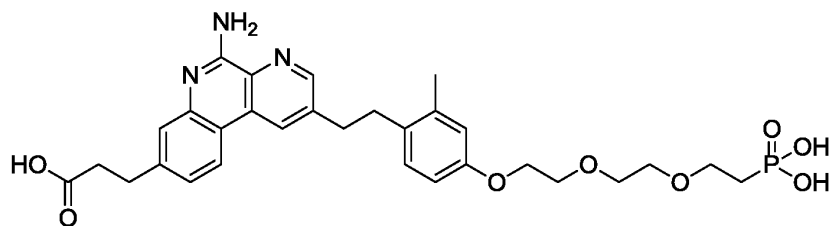
MAQHDEAKKNAFYQVLLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAKRNNFNKD

SEQ ID NO:54 (домен E SpA)

AQHDEAQONAFYQVLLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAQONNFNKD

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутантный антиген SpA (стафилококковый белок A), содержащий аминокислотную последовательность, содержащую (1) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47 или (2) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, модифицированную 1, 2 или 3 аминокислотными заменами вне положений 7, 8, 34, 35, 60, 61, 68, 69, 95, 96, 126, 127, 153, 154, 184, 185, 211, 212, 242, 243, 269 и 270 SEQ ID NO:47, для использования в иммунизации против *Staphylococcus aureus*.
2. Мутантный антиген SpA по п.1, где указанная аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO:47.
3. Мутантный антиген SpA по п.1 или 2, приводящий к выработке у млекопитающего антител, распознающих SEQ ID NO:43 и/или ее фрагмент, представляющий собой природный домен E SpA.
4. Мутантный антиген SpA по любому из пп.1-3, имеющий сниженную относительно немодифицированного SpA аффинность к Fc γ -части человеческого IgG.
5. Мутантный антиген SpA по п.4, имеющий сниженную относительно немодифицированного SpA аффинность к Fab-части V μ 3-содержащих человеческих B-клеточных рецепторов.
6. Иммуногенная композиция, содержащая мутантный антиген SpA по любому из пп.1-5.
7. Композиция по п.6, дополнительно содержащая адъювант.
8. Композиция по п.7, где указанный адъювант выбран из группы, состоящей из солей алюминия, в частности гидратов окиси алюминия и фосфатов алюминия; агонистов человеческих TLR, в частности агонистов TLR7; эмульсии типа "масло-в-воде"; сапониновой композиции; нетоксичного производного энтеробактериального липополисахарида (LPS), в частности монофосфориллипида A (MPL) и 3-О-деацелированного монофосфориллипида A (3d-MPL); производного липида A; их смеси.
9. Композиция по п.8, где указанный агонист TLR7 представляет собой соединение следующей формулы (K1):



- 3-(5-амино-2-(2-метил-4-(2-(2-(2-фосфоэтокси)этокси)этокси)фенетил)бензо[f][1,7]нафтиридин-8-ил)пропановую кислоту (K1).
10. Композиция по п.8 или 9, где адъювант содержит агонист человеческих TLR, адсорбированный на соли алюминия.
11. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.6-10 для предотвращения или лечения инфекции, вызываемой *Staphylococcus aureus*.
12. Применение по п.11, где указанную инфекцию, вызываемую *S. aureus*, предотвращают или лечат у человека.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2