

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291048 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.19(51) Int. Cl. C07K 14/31 (2006.01)
A61K 39/085 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2020.10.02

(54) ПЕПТИДЫ СТАФИЛОКОККА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/909,473; 62/909,458

(72) Изобретатель:

(32) 2019.10.02

Полман Ян Тенис (NL), Шневинд
Олаф, Миссиакас Доминик, Сунь Янь,
Ким Хван Кеун, Ши Мяомяо, Чэнь
Синьхай, Фернандес Джеффри А. (US)

(33) US

(86) PCT/US2020/054047

(87) WO 2021/067785 2021.04.08

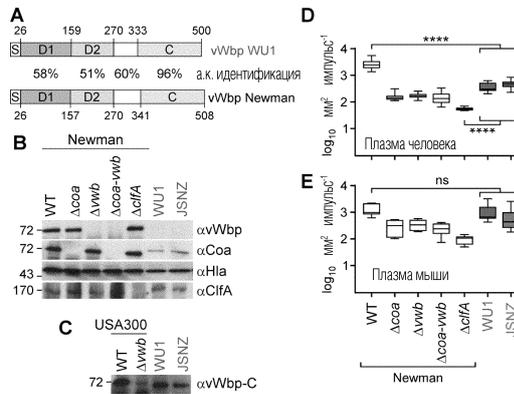
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL); ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЧИКАГО (US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем документе представлены иммуногенные композиции, содержащие вариант белка A (SpA) *Staphylococcus aureus* и мутантный полипептид стафилококковой субъединицы лейкоцидина, содержащий полипептид LukA, полипептид LukB и/или димерный полипептид LukAB, где полипептид LukA, полипептид LukB и/или димерный полипептид LukAB имеют одну или более аминокислотных замен, делеций или их комбинаций.



A1

202291048

202291048

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573696EA/032

ПЕПТИДЫ СТАФИЛОКОККА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/909,458, поданной 2 октября 2019 г., и предварительной заявки США № 62/909,473, поданной 2 октября 2019 г. Каждое описание полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Этот изобретение в целом относится к областям иммунологии, микробиологии и биотехнологии. Более конкретно, к области применения пептидов для создания иммунного ответа. В частности, изобретение относится к применению пептидов стафилококка и способам их применения для индукции иммунного ответа и/или лечения или профилактики стафилококковой инфекции.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Эта заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с именем файла «004852.150WO1 Sequence List» и датой создания 22 сентября 2020 г. и размером 211 кб. Перечень последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Staphylococcus aureus представляет собой наиболее распространенный возбудитель инфекций кожи и мягких тканей, а также преобладающий патоген в хирургических ранах. *S. aureus* также является основной причиной инфекций кровотока. Инфекции в области хирургического вмешательства (SSI) являются следствием хирургического разреза и имеют тенденцию развиваться в период от 15 дней до 3 лет после операции и, как правило, через 30 дней после операции или в течение одного года, если был установлен имплантат. В Соединенных Штатах *S. aureus* отвечает за 11% всех внутрибольничных инфекций, включая 14% SSI и 14% инфекций кровотока (Kallen et al., JAMA 304(6):641-7 (2010); Johnson et al., J. Antimicrob. Chemother. 67(4):802-9 (2012); Laupland et al., Clin. Microbiol. Infect. 19(5):465-71 (2013); и Monaco et al., Current Topics Microbiol. Immunol. 409:21-56 (2017)).

Часто бактериемия является следствием SSI, происходящей из одного или нескольких абсцессов. Острые бактериальные инфекции кожи и кожных структур (ABSSSI) также могут привести к бактериемии. В промышленно развитых странах, заболеваемость популяции бактериемией, связанной с *S. aureus* (SAB), колеблется от 10 до 30 на 100000 человеко-лет (Johnson et al., Antimicrob. Chemother. 67(4):802-9 (2012)). Возраст, по-видимому, является очень важным фактором, определяющим заболеваемость SAB. За высокими показателями в первый год жизни следует низкая заболеваемость в

молодом взрослом возрасте и постепенный рост заболеваемости с возрастом. Например, заболеваемость SAB составляет >100 на 100000 человеко-лет среди лиц >70 лет, но она значительно ниже у молодых людей. (Laupland et al., Clin. Microbiol. Infect. 19(5):465-71 (2013)). Следует отметить, что бактериемия среди пожилых людей связана с высокой смертностью. Инфекция метициллин-резистентными *S. aureus* (MRSA) имеет худший прогноз, чем инфекция метициллин-чувствительными *S. aureus* у пожилых людей. Следовательно, как общая смертность, так и смертность, непосредственно связанная с SAB, более чем в два раза выше у пожилых пациентов (Kaasch et al., J. Infection 68(3):242-51 (2014)). Важность MRSA как возбудителя BSI столь же велика как в амбулаторных, так и в больничных условиях, в то время как MSSA приобретает все большее значение как причина внебольничных BSI, что в значительной степени способствует общему росту заболеваемости инфекциями, вызванными *S. aureus* (Kaasch et al., J. Infection 68(3):242-51 (2014)). Следовательно, как MRSA, так и MSSA являются важными факторами, способствующими развитию тяжелого заболевания SSI и SAB.

Инфекции *Staphylococcus* обычно лечат антибиотиками, где пенициллин является препаратом выбора, и ванкомицин используется для метициллин-резистентных изолятов. Доля штаммов *Staphylococcus*, проявляющих широкий спектр резистентности к антибиотикам, увеличился, что представляет угрозу для эффективной антимикробной терапии. Кроме того, недавнее появление штаммов *Staphylococcus aureus*, резистентных к ванкомицину, вызвало опасения, что штаммы MRSA, для которых не существует эффективной терапии, начинают появляться и распространяться.

Альтернативным подходом к антибиотикам при лечении инфекций *Staphylococcus* является использование антител против антигенов *Staphylococcus* в пассивной иммунотерапии. Примеры этой пассивной иммунотерапии включают введение поликлональных антисывороток (WO2000/015238; WO2000/012132), а также лечение моноклональными антителами против липотейхоевой кислоты (WO1998/057994).

Вакцины первого поколения, таргетирующие *Staphylococcus* или экзопротеины, продуцируемые штаммами *Staphylococcus*, имели ограниченный успех, и, таким образом, остается потребность в разработке дополнительных композиций для лечения и/или профилактики инфекций *Staphylococcus*.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

S. aureus разработал многочисленные механизмы ускользания от иммунного надзора и секретирует различные факторы вирулентности, которые позволяют бактерии выживать в организме хозяина. Инактивация и нейтрализация факторов вирулентности, участвующих в опсонофагоцитозе, опосредованном антителами, является основным иммунным механизмом, который контролирует стафилококковые инфекционные заболевания.

Белок стафилококка A (SpA), поверхностный белок, является одним из ключевых факторов вирулентности, который выполняет, по меньшей мере две функции. Во-первых, SpA, закрепленный на клеточной стенке на поверхности бактерий, связывается с Fcγ-

доменом IgG и отключает эффекторные функции антител., Антитела связаны неспецифически «вверх ногами», тем самым защищая стафилококки от опсонофагоцитирующего киллинга (ОПК) иммунными клетками хозяина и предотвращая надлежащий клиренс. Во-вторых, SpA служит ключевой детерминантой ускользания от иммунного надзора, которая предотвращает развитие защитного иммунитета во время колонизации и инфекции *S. aureus*. Во время колонизации и инвазивного заболевания, высвобождаемый SpA перекрестно сшивает VH3 клональные В-клеточные рецепторы и запускает секрецию антител, не специфичных к *S. aureus*, которые неспособны распознавать стафилококковые детерминанты в качестве антигенов. Такая В-клеточная суперантигенная активность (т.е. VH3-связывающая активность высвободившегося SpA) отвечает за профилактику развития защитного иммунитета против *S. aureus* во время колонизации или инвазивного заболевания. Использование варианта SpA в качестве вакцинного антигена, утратившего свою иммуноглобулин-связывающую активность, индуцирует специфические антитела SpA, которые (1) нейтрализуют его способность связывать IgG через Fc γ , (2) нейтрализуют его способность связывать IgG через тяжелые цепи VH3-идиотипа и делает возможным развитие антистафилококкового иммунитета, и (3) индуцирует опсонофагоцитарный клиренс через поверхностно-связанный SpA.

Стафилококковый лейкоцидин LukAB является еще одним фактором вирулентности с другим механизмом действия. LukAB представляет собой секретлируемый токсин, который при связывании с фагоцитами собирается в пору, внедряется в мембрану и лизирует клетку-хозяина. Это позволяет *S. aureus* ускользнуть от атаки со стороны нейтрофилов и ускользнуть от клиренса хозяином. Антитела, индуцированные иммунизацией анатоксином LukAB, нейтрализуют активность токсина LukAB, что приводит к выживанию фагоцитов, которые могут вычистить *S. aureus*.

Таким образом, вакцина, содержащая два антигена SpA и LukAB, будет индуцировать антитела, которые нейтрализуют два фактора вирулентности *S. aureus* и предотвращают два независимых ключевых механизма ускользания *S. aureus*, а также обеспечивает эффективность опосредованного антителами опсонофагоцитоза.

В настоящем документе было обнаружено, что после вакцинации вакцинными комбинациями по настоящему изобретению, вакцинные антитела (т.е., которые были индуцированы после вакцинации), созданные как против вариантов полипептидов SpA, так и против мутантных полипептидов LukAB, обеспечивают синергетическую защиту и эффективное уничтожение *S. aureus* благодаря двойному механизму. С одной стороны, нейтрализация молекулы SpA предотвращает перевернутое связывание антител (связывание IgG Fc) и предотвращает дисрегуляцию В-клеток через разрушение связывания SpA с VH3. С другой стороны, нейтрализация LukAB токсинов предотвращает лизис фагоцитов под действием LukAB и, следовательно, позволяет нейтрофилам человека оставаться функциональными и способными уничтожать *S. aureus* путем опсонофагоцитоза. Антительный ответ был продуктивным, так как антитела связывались с соответствующей мишенью, а фагоцитирующие клетки были способны убивать, т. е.

имел место явный и аддитивный синергетический эффект нейтрализации как SpA, так и LukAB.

В настоящем документе представлены иммуногенные композиции, содержащие (a) полипептид варианта белка A (SpA) *Staphylococcus aureus*, где полипептид варианта SpA содержит по меньшей мере один домен SpA A, B, C, D или E; и (b) мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина, содержащий (i) мутантный полипептид LukA, (ii) мутантный полипептид LukB и/или (iii) мутантный димерный полипептид LukAB, где (i), (ii) и/или (iii) имеют одну или более аминокислотных замен, делеций или их комбинаций, так что способность мутантных полипептидов LukA, LukB и/или LukAB образовывать поры на поверхности эукариотических клеток нарушается, тем самым снижая токсичность мутантного полипептида LukA и/или LukB или мутантного димерного полипептида LukAB по сравнению с соответствующим полипептидом LukA и/или LukB дикого типа или димерным полипептидом LukAB.

В некоторых вариантах осуществления полипептид варианта SpA имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая нарушает связывание Fc, и по меньшей мере вторую аминокислотную замену, которая нарушает связывание V_{H3}.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит домен SpA D и имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58. Полипептид варианта SpA может, например, иметь одну или более аминокислотных замен в аминокислотном положении 9 или 10 SEQ ID NO:58.

Полипептид варианта SpA может, например, содержать домены SpA E, A, B и C и иметь аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления, каждый домен SpA E, A, B и C имеет одну или более аминокислотных замен в положениях, соответствующих положениям аминокислот 9 и 10 SEQ ID NO: 58. Аминокислотная замена представляет собой лизиновый остаток вместо глутаминового остатка.

В некоторых вариантах осуществления, иммуногенные композиции, содержащие: (a) полипептид варианта белка A (SpA) *Staphylococcus aureus*, где указанный полипептид варианта SpA содержит по меньшей мере один домен SpA A, B, C, D или E, и где указанный домен имеет (i) лизиновые замены для глутаминовых остатков в каждом из по меньшей мере одного домена SpA A, B, C, D или E, соответствующие положениям 9 и 10 в домене SpA D, и (ii) глутаматную замену в каждом из по меньшей мере одного домена SpA A, B, C, D или E, соответствующую положению 33 в домене SpA D, где полипептид, по сравнению с отрицательным контролем, не создает определенной перекрестной связи IgG и IgE в крови или не активирует базофилы; и (b) мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина, содержащий (1) мутантный полипептид LukA, (2) мутантный полипептид Luk B и/или (3) мутантный димерный полипептид LukAB, где (1), (2) и/или (3) имеют одну или более аминокислотных замен, делеций или их комбинаций;

так что нарушается способность мутантных полипептидов LukA, LukB и/или LukB образовывать поры на поверхности эукариотических клеток, тем самым снижая токсичность мутантного полипептида LukA и/или LukB или мутантного димерного полипептида LukAB по сравнению с соответствующим полипептидом LukA и/или LukB дикого типа или димерного полипептида LukAB. В некоторых вариантах осуществления, домен D SpA содержит SEQ ID NO:58.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA имеет пониженную аффинность связывания K_A с V_{H3} из IgG человека по сравнению с полипептидом варианта SpA (SpA_{KKAA}), содержащим лизиновые замены для глутаминовых остатков в каждом домене SpA A-E, соответствующем положениям 9 и 10 в домене SpA D и аланиновые замены для остатков аспарагиновой кислоты в каждом домене SpA A-E, соответствующие положениям 36 и 37 домена SpA D. Полипептида варианта SpA может, например, иметь аффинность связывания K_A для V_{H3} из IgG человека, которая снижена по меньшей мере в 2 раза по сравнению с SpA_{KKAA}. Полипептид варианта SpA может, например, иметь аффинность связывания K_A для V_{H3} из IgG человека менее $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. В определенных вариантах осуществления, SpA_{KKAA} содержит SEQ ID NO:54.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA не имеет замен ни в одном из доменов SpA A, B, C, D или E, соответствующих положениям аминокислот 36 и 37 в домене SpA D. В некоторых вариантах осуществления, единственные замены в вариантах полипептида SpA представляют собой (i) и (ii).

В некоторых вариантах осуществления, мутантный полипептид LukA содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95% по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности любой из SEQ ID NO: 1-28. Мутантный полипептид LukA может, например, содержать делецию аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 342-351 любой из SEQ ID NO: 1-14 и положениям аминокислот 315-324 любой из SEQ ID NO: 15-28.

В некоторых вариантах осуществления, мутантный полипептид LukB содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95% по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности любой из SEQ ID NO: 29-53.

В некоторых вариантах осуществления, мутантный димерный полипептид LukAB содержит мутантный полипептид LukA с делецией аминокислотных остатков, соответствующих положениям 315-324 SEQ ID NO: 16; и мутантный полипептид LukB, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

В некоторых вариантах осуществления, иммуногенная композиция дополнительно

содержит адъювант. Адъювант может, например, содержать сапонины, например, QS21. Адъювант может, например, содержать агонист TLR4, например, агонистом TLR4 является липид A или его аналог или его производное. Агонист TLR4 может, например, содержать MPL, 3D-MPL, RC529, GLA, SLA, E6020, PET-липид A, PHAD, 3D-PHAD, 3D-(6-ацил)-PHAD, ONO4007 или OM-174. Агонист TLR4, например, может представлять собой GLA.

В некоторых вариантах осуществления, иммуногенная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один стафилококковый антиген или его иммуногенный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из CP5, CP8, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, EsxAB(слияние), SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB, Coa, Hla, mHla, MntC, rTSST-1, rTSST-1v, TSST-1, SasF, vWbp, vWh витронектин-связывающего белка, Aaa, Aap, Ant, аутолизинглюкозаминидазы, аутолизинамидазы, Can, коллаген-связывающего белка, Csa1A, EFB, эластин-связывающего белка, EPB, FbpA, фибриноген-связывающего белка, фибронектин-связывающего белка, FhuD, FhuD2, FnbA, FnbB, GehD, HarA, HBP, иммунодоминантного ABC транспортера, IsaA/PisA, рецептора ламинина, липазы GehD, MAP, Mg²⁺ транспортера, аналога MHC II, MRPII, NPase, активирующего белка PHK III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF, SdrG, SdrH, экзотоксинов SEA, экзотоксинов SEB, mSEB, SitC, Ni ABC транспортера, связывающего белка SitC/MntC/слюны, SsaA, SSP-1, SSP-2, Spa5, SpAKKAA, SpAkR, Sta006, Sta011, PVL, LukED и Hlg.

Также представлены одна или более выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид варианта белка A (SpA) *Staphylococcus aureus* и мутантный полипептид Luk A, мутантный полипептид Luk B или мутантный димерный полипептид LukAB по изобретению. Также представлены векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты по изобретению. Также представлены выделенные клетки-хозяева, содержащие векторы по изобретению.

Также представлены способы индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества иммуногенной композиции, описанной в настоящем документе. Иммуногенная композиция может, например, дополнительно содержать адъювант.

Также представлены способы лечения или профилактики инфекции *Staphylococcus* у субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества иммуногенной композиции, описанной в настоящем документе. Способы также включают способ деколонизации или профилактики колонизации или повторной колонизации бактериями *Staphylococcus* у субъекта, и способ индукции иммунного ответа против стафилококковых бактерий у субъекта путем введения композиций по описанию. Иммуногенная композиция может, например, дополнительно содержать адъювант. Инфекция *Staphylococcus* может быть дополнительно определена как инфекция *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления, инфекция *Staphylococcus* представляет собой инфекцию, вызванную метициллин-

резистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA).

В некоторых вариантах осуществления, включая варианты осуществления способа, композиции и полипептида, бактерии *Staphylococcus* могут, например, содержать штамм WU1 или JSNZ *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления, бактерии *Staphylococcus* включают изолят ST88. В других примерах, изоляты *S. aureus* могут принадлежать к типам последовательностей (ST) 5, ST8, ST22, ST30, ST45, ST398 и их соответствующим клональным комплексам (CC) *S. aureus*, ассоциированным с инвазивными нарушениями человека и животных.

В некоторых вариантах осуществления, субъект или пациент, описанный в настоящем документе, например, пациент-человек, является педиатрическим пациентом. Педиатрическим пациентом является пациент в возрасте до 18 лет. В некоторых вариантах осуществления, пациенту не менее или не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 85 или 90 лет (или любой диапазон, полученный из них). В некоторых вариантах осуществления, возраст педиатрического пациента составляет 2 года или менее. В некоторых вариантах осуществления, возраст пациента менее 1 года. В некоторых вариантах осуществления, возраст пациента менее 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, возраст пациента составляет 2 месяца или менее. В некоторых вариантах осуществления, возраст пациента-человека составляет 65 лет или старше. В некоторых вариантах осуществления, пациент-человек представляет собой работника здравоохранения. В некоторых вариантах осуществления, пациентом является пациент, которому будет проведена хирургическая процедура.

В некоторых вариантах осуществления, выделенный полипептид композиции вводят пациенту в виде четырех доз, где интервал между дозами составляет по меньшей мере четыре недели. В некоторых вариантах осуществления, выделенный полипептид вводят в 4 дозах или точно 4 дозы. В некоторых вариантах осуществления, выделенный полипептид или композицию вводят по меньшей мере не более или точно в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 дозах. В некоторых вариантах осуществления, первую дозу вводят в возрасте 6-8 недель. В некоторых вариантах осуществления, все четыре дозы вводят в возрасте 2 лет или ранее. В некоторых вариантах осуществления, полипептид или композицию следует вводить в виде серии из четырех доз в возрасте 2, 4, 6 и 12-15 месяцев. Дозу 1 можно вводить уже в возрасте 6 недель. Интервал между дозами может составлять примерно от 4 до 8 недель. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу вводят примерно в возрасте 12-15 месяцев и по меньшей мере через 2 месяца после введения третьей дозы.

Дополнительные аспекты относятся к способу получения композиции, где способ включает смешивание полипептида варианта SpA по описанию и мутантного полипептида субъединицы стафилококкового лейкоцидина по настоящему изобретению в фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления, иммуногенную композицию вводят в комбинации со второй терапией. Вторая терапия может, например, представлять собой по

меньшей мере один антибиотик. По меньшей мере, один антибиотик может быть, например, выбран из группы, состоящей из стрептомицина, ципрофлоксацина, доксициклин, гентамицин, хлорамфеникола, триметоприма, сульфаметоксазола, ампициллина, тетрациклина и их комбинаций.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Приведенная выше сущность изобретения, а также последующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будут лучше поняты при чтении вместе с приложенными чертежами. Однако следует понимать, что заявка не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

ФИГ. 1А-1Е. Изолят *Staphylococcus aureus* ST88 WU1, патогена мыши. (ФИГ. 1А) Структура домена и гомология последовательностей продуктов гена *vwb* из *S. aureus* WU1 и *S. aureus* Newman, клинического изолята человека. Показаны доля идентичности аминокислоты (а.а.) *vWbp* для его сигнального пептида (S), доменов D1 и D2 (ответственных за связывание и активацию протромбина хозяина), линкера (белый прямоугольник) и С-концевого домена связывания фибриногена (C). (ФИГ. 1В) Иммуноблот образцов *S. aureus* цельной культуры штамма Newman (WT, дикий тип), а также его вариантов Δ coa, Δ vwb, Δ coa-*vwb* и Δ clfA, штаммов WU1, JSNZ, USA300 LAC и его варианта Δ vwb анализируют на продуцирование *vWbp* (α *vWbp*), Coa (Coa) α , Hla (Hla) α и ClfA (α ClfA) с использованием поликлональных антител кролика. (ФИГ. 1С) Поликлональные антитела против домена *vWbp*-C идентифицируют аллельный вариант *vWbp* из штаммов JSNZ и WU1, а также *vWbp* из штамма USA300 LAC. (ФИГ. 1D-1Е) Агглютинацию окрашенных Syto-9 штаммов *S. aureus* в плазме человека (ФИГ. 1D) или мыши (ФИГ. 1Е) измеряют как средний размер и стандартную ошибку среднего агглютинированных бактерий в 12 полях зрения под микроскопом, и статистическую значимость оценивают в попарном сравнении с WT с использованием двухфакторного ANOVA с критериями множественного сравнения Сидака. **** $p < 0,0001$.

ФИГ. 2А-2В. *S. aureus* WU1 постоянно колонизирует носоглотку мышей C57BL/6. Когортам мышей C57BL/6 ($n=10$) интраназально вводят 1×10^8 КОЕ указанного контрольного *S. aureus* WU1 или PBS и берут мазки из горла еженедельно для подсчета бактериальной нагрузки. Каждая точка указывает количество КОЕ на мышь. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных в данный день указаны горизонтальной линией и планкой погрешности.

ФИГ. 3А-3В. Экспрессия стафилококкового белка А (SpA) *S. aureus* WU1, требуемая для персистирующей колонизации мышей C57BL/6. (ФИГ. 3А) Иммуноблот лизатов *S. aureus*, полученных из штаммов USA300 LAC, Newman, WU1, Δ sra вариант WU1 без и с плазмидой для экспрессии *sra* (*psra*) зондируют SpA- (α SpA) и антителами, специфичными к сортазе А (α SrtA). (ФИГ. 3В) Когорты C57BL/6 мышей ($n=10$) инокулируют интраназально 1×10^8 КОЕ *S. aureus* WU1 или его Δ sra вариантом, и берут мазки из ротоглотки животных с недельными интервалами для подсчета

бактериальной нагрузки Каждая точка указывает количество КОЕ на мышь. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных в данный день обозначены горизонтальной линией и планкой погрешности. Наборы данных бактериальной колонизации анализируют с помощью двухфакторного ANOVA и критериев множественного сравнения Сидака; статистически значимые различия (** $p=0,0003$; **** $p < 0,0001$) между двумя группами животных указаны звездочками.

ФИГ. 4. Иммунизация мышей C57BL/6 Sp_{ККАА} способствует деколонизации S. aureus WU1. Мышей C57BL/6 иммунизируют 50 мкг очищенного рекомбинантного Sp_{ККАА}, эмульгированного CFA или PBS-имитацией в CFA, и через 11 дней стимулируют 50 мкг рекомбинантного Sp_{ККАА}, эмульгированного с IFA или PBS-имитацией в IFA. В день 0 эксперимента по колонизации, когорты мышей C57BL/6 (n=10) интраназально инокулируют 1×10^8 КОЕ S. aureus WU1. Мазки из ротоглотки животных берут с интервалами в неделю для подсчета бактериальной нагрузки. Каждая точка указывает количество КОЕ на мышь. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных в данный день указаны горизонтальной линией и планкой погрешности. Наборы данных бактериальной колонизации анализируют с помощью двухфакторного ANOVA и критериев множественного сравнения Сидака, звездочками отмечены статистически значимые различия (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) между двумя группами животных.

ФИГ. 5. Иммунизация мышей BALB/c Sp_{ККАА} способствует деколонизации S. aureus WU1. Мышей BALB/c иммунизируют 50 мкг очищенного рекомбинантного Sp_{ККАА}, эмульгированного CFA или PBS-имитацией в CFA, и через 11 дней стимулируют 50 мкг рекомбинантного Sp_{ККАА}, эмульгированного с IFA или PBS-имитацией в IFA. В день 0 эксперимента по колонизации, когорты мышей C57BL/6 (n=10) интраназально инокулируют 1×10^8 КОЕ S. aureus WU1. Мазки из ротоглотки животных берут с интервалами в неделю для подсчета бактериальной нагрузки. Каждая точка указывает количество КОЕ на мышь. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных в данный день указаны горизонтальной линией и планкой погрешности. Наборы данных бактериальной колонизации анализируют с помощью двухфакторного ANOVA и критериев множественного сравнения Сидака, звездочками отмечены статистически значимые различия (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$) между группами животных.

ФИГ. 6. Иммунизация мышей BALB/c Sp_{ККАА} способствует клиренсу S. aureus JSNZ из носоглотки. Мышей BALB/c иммунизируют 50 мкг очищенного рекомбинантного Sp_{ККАА}, эмульгированного CFA или PBS-имитацией в CFA, и через 11 дней стимулируют 50 мкг рекомбинантного Sp_{ККАА}, эмульгированного с IFA или PBS-имитацией в IFA. В день 0 эксперимента по колонизации, когорты мышей C57BL/6 (n=10) интраназально инокулируют 1×10^8 КОЕ S. aureus JSNZ. Мазки из ротоглотки животных берут с интервалами в неделю для подсчета бактериальной нагрузки. Каждая точка указывает количество КОЕ на мышь. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных в данный день указаны горизонтальной линией и планкой погрешности.

Наборы данных бактериальной колонизации анализируют с помощью двухфакторного ANOVA и критериев множественного сравнения Сидака, звездочками отмечены статистически значимые различия (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) между двумя группами животных.

ФИГ. 7А-7С. Улучшенная вакцина SpA. ФИГ. 7А: Изображение вариантов SpA_{ККАА}, SpA_{ККАА/А} и SpA_{ККАА/Г}. ФИГ. 7В: Аффинность связывания вариантов с IgG человека. ФИГ. 7С: Аффинность связывания вариантов с IgE человека.

ФИГ. 8А-8В. Анализы связывания. ФИГ. 8А: Вестерн-блоттинг вариантов SpA. ФИГ. 8В: ELISA вариантов с указанными молекулами.

ФИГ. 9А-9В. Белок А необходим для персистирующей носовой колонизации мышей *S. aureus*.

ФИГ. 10. Выравнивание аминокислотной последовательности белка А. Темно-серый: аминокислоты, взаимодействующие с фрагментом Fc γ человека; светло-серый: аминокислоты, взаимодействующие с фрагментом Fab человека; звездочка обозначает аминокислоту, взаимодействующую как с фрагментами Fc γ , так и Fab человека, красный цвет: аминокислоты, взаимодействующие с фрагментом Fc γ человека.

ФИГ. 11. Анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR), демонстрирующий, что домен Z (G29A в домене SpA В) не может связывать фрагмент F(ab)₂.

ФИГ. 12А-12В. Новые варианты SpA*, таргетирующие G29.

ФИГ. 13. Новые варианты SpA*, таргетирующие G29.

ФИГ. 14. Новые варианты SpA*, таргетирующие G29.

ФИГ. 15. Новые варианты SpA*, таргетирующие G29.

ФИГ. 16. Изображение анализа высвобождения гистамина базилика, дополнительно описанного в примере 2.

ФИГ. 17А-17В. Стафилококковый белок А (SpA) (ФИГ. 17А) Диаграмма, иллюстрирующая первичную структуру предшественника SpA (с N-концевым сигнальным пептидом, расщепленным сигнальной пептидазой, пятью доменами связывания иммуноглобулинов (IgBD - обозначены E, D, A, B, C), доменом, охватывающим клеточную стенку, обозначенным как область Xr, доменом LysM для связывания пептидогликана и C-концевым сигналом сортировки LPXTG, который расщепляется сортазой А), SpA клеточной стенки, который отображается на поверхности бактерий, и высвобожденных молекул SpA, которые высвобождаются из оболочки клеточной стенки и высвобождаются в ткани хозяина. (ФИГ. 17В) Секреция и опосредованное сортазой А заякоривание SpA на клеточной стенке и высвобождение SpA, связанного с пептидогликаном с помощью *S. aureus*.

ФИГ. 18А-18В. Связывание SpA с Fc γ доменом IgG человека блокирует эффекторные функции антител (взаимодействие с рецепторами Fc и комплемента) и опсонофагоцитарное уничтожение *S. aureus* фагоцитами. Атрибуты ускользания от иммунного надзора стафилококкового белка А. (ФИГ. 18А) Заякоренный на клеточной стенке SpA на поверхности *S. aureus* связывает Fc γ IgG человека (IgG1, IgG2 и IgG4) и

блокирует эффекторные функции антител, запуская опсонофагоцитарное уничтожение бактерий. (ФИГ. 18В) Диаграмма, иллюстрирующая первичную структуру IgG человека, его антигенсвязывающий паратоп (фиолетовый) эффектор (C1q, FcγRs, FcRn) и сайты связывания SpA.

ФИГ. 19А-19В. Свойства ускользания от иммунного надзора стафилококкового белка А. (ФИГ. 19А) Функции ускользания от иммунного надзора SpA во время инфекции *S. aureus*. Заякоренный на клеточной стенке SpA на поверхности *S. aureus* связывает Fcγ IgG человека и блокирует эффекторные функции антител, запуская опсонофагоцитарное уничтожение бактерий. Выделенный SpA перекрестно сшивает V_{H3}-идиотипический вариант тяжелых цепей IgG и IgM человека (В-клеточные рецепторы) для активации пролиферации В-клеток, переключения класса, соматической гипермутации и секреции V_{H3}-идиотипических антител, которые могут быть перекрестно сшиты SpA, но не распознают антигены *S. aureus*, тем самым блокируя развитие адаптивных иммунных ответов против *S. aureus* и установление защитного иммунитета. (ФИГ. 19В) Диаграмма, иллюстрирующая связывание SpA с, и перекрестное связывание V_{H3}-идиотипических В-клеточных рецепторов (IgM) и активацию передачи сигналов CD79АВ.

ФИГ. 20А-20В. Иммуноглобулин-связывающие домены (IgBD) рекомбинантного SpA, SpA_{ККАА}, SpA_{АА} и SpA_{ККАА}. (ФИГ. 20А) Диаграмма, иллюстрирующая первичную структуру IgBD рекомбинантного SpA с N-концевой полигистидиновой меткой для очистки с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA из цитоплазмы *E. coli*. Аминокислотная последовательность домена IgBD-E показана ниже. Указаны положения трех α-спиралей для каждого IgBD (H1, H2 и H3). SpA_{КК} и SpA_{ККАА} удерживают аминокислотные замены при Q^{9,10}K (Gln^{9,10}Lys). SpA_К и SpA_{ККАА} содержат аминокислотные замены при D^{36,37}A (Asp^{36,37}Lys). Нумерация относится к положению аминокислот в В-IgBD. (ФИГ. 20В) Выравнивание аминокислотной последовательности пяти IgBD SpA. Консервативные аминокислоты обозначены периодом (.). Гэпы в выравнивании обозначены тире (-). Не консервативные аминокислоты перечислены однобуквенным кодом. Как сообщает Graille et al. (138), остатки SpA, ответственные за связывание IgG Fcγ, выделены красным цветом. Остатки SpA, ответственные за связывание тяжелой цепи V_{H3}, выделены зеленым цветом. Розовый остаток (Q³²) способствует связыванию как Fcγ, так и V_{H3}.

ФИГ. 21А-21В. SpA-ассоциированная V_{H3}-перекрестно-сшивающая активность и анафилаксия. (ФИГ. 21А) Диаграмма, иллюстрирующая структуру активирующих Fcγ и Fcε рецепторов человека, а также их V_{H3}-идиотипические лиганды IgG и IgE. (ФИГ. 21В) Перекрестное сшивание SpA V_{H3}-идиотипических IgG или IgE, которые взаимодействуют с рецепторами FcγR и FcεR, соответственно, на базофилах или тучных клетках, запускают высвобождение гистамина, воспалительных медиаторов и цитокинов, которые способствуют анафилактическим реакциям, вазодилатации и шоку. Хотя не изображено на (ФИГ. 21В), как тучные клетки, так и базофилы экспрессируют

рецепторы Fc γ R и Fc ϵ R и реагируют на SpA-перекрестное сшивание V_{H3}-идиотипического IgG, связанного с Fc γ R, или на SpA-перекрестное сшивание V_{H3}-идиотипического IgE, связанного с рецепторами Fc ϵ R, с выделением гистамина, провоспалительных медиаторов и цитокинов.

ФИГ. 22. Анафилактическая активность вакцин-кандидатов SpA у мышей.

Мышей μ MT (n=5) сенсибилизируют V_{H3} IgG путем внутрикожной инъекции в ухо. Через 24 часа внутривенно вводят кандидатные вакцинные антигены или контроль PBS с последующей инъекцией Evans blue. Экстравазацию красителя количественно определяют после извлечения из тканей уха через 30 минут с помощью спектрофотометрического измерения при 620 нм. Данные получают из трех независимых экспериментов. Для статистического анализа данных проводят однофакторный ANOVA с критерием множественного сравнения Бонферрони. Символы: нс, несущественно; *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001; ****p <0,0001.

ФИГ. 23А-23В. Дегрануляция тучных клеток. Культивируемые тучные клетки человека (LAD2) сенсибилизируют в течение ночи V_{H3} IgE, промывают и либо оставляют необработанными (PBS), либо подвергают воздействию SpA в течение 1 часа в качестве положительного контроля или испытуемых образцов SpA_{ККАА}, SpA_{Q9,10K/S33E}, SpA_{Q9,10K/S33T} или SpA-KR. Уровни β -гексозаминидазы и гистамина измеряют в дебрисах, а также в супернатантах. Показаны доля β -гексозаминидазы (ФИГ. 23А) и количество выделившегося гистамина (ФИГ. 23В). Для статистического анализа данных проводят однофакторный ANOVA с критерием множественного сравнения Бонферрони. Обозначения : нс, несущественно; *P <0,05; **P <0,01; ***P <0,001; ****p <0,0001.

ФИГ. 24А-24Е. Иммунизация SpA_{ККАА} или SpA_{Q9,10K/S33E} или SpA_{Q9,10K/S33T} способствует прогрессирующей деколонизации. Когортам мышей C57BL/6 (n=10) интраназально инокулируют 1×10^8 КОЕ S. aureus WU1. (ФИГ. 24А, 24В, 24D) Берут мазки из горла мышей еженедельно для подсчета бактериальной нагрузки. (ФИГ. 24С, 24Е) Образцы стула собирают еженедельно после инокуляции для подсчета бактериальной нагрузки. В панели (ФИГ. 24А) животных иммунизируют адьювантом PBS или -SpA_{ККАА}. В панелях (ФИГ. 24В-24С) животных иммунизируют адьювантом SpA_{ККАА} или -SpA_{Q9,10K/S33E}; те же когорты животных отслеживают на бактериальную нагрузку в образцах из глотки (ФИГ. 24В) и стула (ФИГ. 24С). В панелях (ФИГ. 24D-24Е), животных иммунизируют адьювантом-PBS или -SpA_{ККАА} или -SpA_{Q9,10K/S33E} или -SpA_{Q9,10K/S33T}, те же когорты животных отслеживают на бактериальную нагрузку в горле (ФИГ. 24D) и образцах стула (ФИГ. 24Е). Каждый квадрат указывает количество КОЕ на миллилитр на мазок из глотки или на грамм стула. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных на данный день обозначено горизонтальными линиями и планками погрешностей. Данные исследуют с помощью двухфакторного ANOVA с критериями множественного сравнения Сидака (*P <0,05). В панелях (ФИГ. 24D-24Е) каждая группа данных (каждый из 1-8) представляет данные от имитации, SpA_{ККАА}, SpA_{Q9,10K/S33E} или SpA_{Q9,10K/S33T}, соответственно. Между двумя группами не было отмечено статистических

различий на панелях 24В и 24С.

ФИГ. 25А-25С. Защитная активность вакцин-кандидатов SpA в мышинной модели инфекции кровотока. Трехнедельных мышей BALB/c (n=15) иммунизируют SpA_{ККАА} или SpA_{Q9,10K/S33E} или SpA_{Q9,10K/S33T} или PBS контролем. Имитационные или бустерные иммунизации проводят на 11 день. На 20 день у мышей берут кровь для оценки полумаксимальных титров антител в сыворотке к вакцинам-кандидатам, обозначенным как SpA* на оси у. Каждая группа из трех столбцов представляет, слева направо, SpA_{ККАА}, SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} (ФИГ. 25А). На 21 день мышей заражают 5×10^6 КОЕ *S. aureus* USA300 (LAC) в периорбитальный венозный синус правого глаза. Через пятнадцать дней после заражения животных подвергают эвтаназии для подсчета стафилококковой нагрузки в почках (ФИГ. 24В) и подсчета абсцессов (ФИГ. 24С). Для статистического анализа данных проводят однофакторный ANOVA с критерием множественного сравнения Бонферрони. Обозначения: ns, незначительно, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001.

ФИГ. 26А-26С. Взаимодействие между вакцинами-кандидатами SpA и нейтрализующим SpA моноклональным антителом 3F6. Антитела 3F6, рекомбинантное rMAb 3F6 из F-клеток НЕК293 (ФИГ. 26А, rMAb 3F6) или моноклональное антитело гибридомы мыши (ФИГ. 26В, hMAb 3F6) серийно разводят на планшетах для ферментного иммуносорбентного анализа, покрытых либо SpA_{ККАА}, либо SpA_{Q9,10K/S33E}, либо SpA_{Q9,10K/S33T}, либо контрольным PBS (ФИГ. 26С). Константы ассоциации рассчитаны с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

ФИГ. 27. Иммунизация, контрольное заражение и схема отбора образцов мини-свиней. Самцов геттингенских мини-свиней (3 свиньи в группе) иммунизируют внутримышечно в 3 отдельных случаях с 3-недельными интервалами. После вакцинации свиней заражают клинически-релевантным штаммом *S. aureus* (CC398 или CC8 USA300). Образцы крови берут перед каждой вакцинацией и через равные промежутки времени в течение периода заражения. Анализ крови и сыворотки выполняют для оценки количества и функции сывороточного иммуноглобулина. На 8 день после заражения, свиней подвергают эвтаназии, и определяют бактериальную нагрузку в месте хирургического вмешательства и внутренних органах. ФИГ. 27 показывает обзор дизайна эксперимента *in vivo*. У свиней берут кровь и иммунизируют в дни -63, -42 и -21; берут кровь и инфицируют в день 0, берут кровь в дни +1, +2 и +3, и умерщвляют и вскрывают на +8 день.

ФИГ. 28А-28D. Иммунизация LukAB и SpA* приводит к образованию специфических антител к LukAB и SpA у мини-свиней. Мини-свиней иммунизируют в 3 отдельных случаях 100 мкг анатоксина LukAB, 50 мкг SpA* или смесью 100 мкг анатоксина LukAB+50 мкг SpA*. Антигены в каждой группе вводят с 25 мкг MPL и 25 мкг адьюванта QS-21 на животное и вакцинацию. Контрольную группу вакцинируют 25 мкг MPL и 25 мкг адьюванта QS-21. Образцы сыворотки оценивают на IgG против LukAB дикого типа (ФИГ. 28А и 28С) и против SpA* (ФИГ. 28В и 28D). Каждая точка

представляет EC_{50} титр отдельного животного в дни -63 (сыворотки перед иммунизацией), день -42 (три недели после первой иммунизации), день -21 (три недели после второй иммунизации), день 0 (три недели после третьей иммунизации, до контрольного заражения) и +8 (при вскрытии). Столбики показывают средние геометрические EC_{50} титры для каждой группы. ФИГ. 28А: ответы анти-LukAB антитела, измеренные в исследовании 1 (штамм заражения СС398); ФИГ. 28В: ответы анти-SpA*антитела, измеренные в исследовании 1 (штамм заражения СС398); ФИГ. 28С: ответы анти-LukAB антитела, измеренные в исследовании 2 (штамм заражения USA300); ФИГ. 28D: ответы анти-SpA*антитела, измеренные в исследовании 2 (контрольный штамм USA300).

ФИГ. 29А-29В. Иммунизация LukAB и SpA* приводит к образованию антител, нейтрализующих активность токсина LukAB. Мини-свиней иммунизируют 3 отдельных раза 100 мкг анатоксина LukAB, 50 мкг SpA* или смесью 100 мкг анатоксина LukAB+50 мкг SpA*. Антигены в каждой группе вводят с 25 мкг MPL и 25 мкг адьюванта QS-21 на животное и вакцинируют. Контрольную группу вакцинируют 25 мкг MPL и 25 мкг только адьюванта QS-21. Образцы сыворотки оценивают на предмет нейтрализации токсина LukAB. Каждая точка представляет собой IC_{50} титр отдельного животного в дни -63 (сыворотка до иммунизации), -21 (три недели после второй иммунизации), день 0 (через три недели после третьей иммунизации, до контрольного заражения) и +8 (при вскрытии). Полосы указывают средние геометрические титры для каждой группы. ФИГ. 29А: нейтрализация токсина LukAB в исследовании 1 (штамм заражения СС398); ФИГ. 29В: нейтрализация токсина LukAB в исследовании 2 (штамм заражения USA300).

ФИГ. 30А-30D. Иммунизация LukAB и SpA* приводит к уменьшению количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в месте хирургического вмешательства и в селезенке мини-свиней. Мини-свиней иммунизируют в 3 отдельных случаях 100 мкг анатоксина LukAB, 50 мкг SpA*, или смесью 100 мкг анатоксина LukAB+50 мкг SpA*. Антигены в каждой группе вводят с 25 мкг MPL и 25 мкг адьюванта QS-21 на животное и вакцинацию. Контрольную группу вакцинируют 25 мкг MPL и 25 мкг только адьюванта QS-21. Через три недели после третьей иммунизации, животных заражают штаммом *S. aureus* СС398 (исследование 1) или штаммом СС8 USA300 (исследование 2) в модели местного инфицирования. На 8 день после инъекции, животных подвергают эвтаназии, и место хирургического вмешательства и органы подвергают вскрытию. Бактериальную нагрузку определяют с помощью спирального посева с последующим подсчетом КОЕ. Каждая точка представляет значение \log_{10} КОЕ в мышцах и селезенке отдельного животного. Линия указывает геометрическое среднее значение каждой группы. Пунктирная линия на указывает предел обнаружения. ФИГ. 30А: КОЕ в общей мышце, исследование 1 (штамм заражения СС398); ФИГ. 30В: КОЕ в селезенке, исследование 1 (штамм заражения СС398); ФИГ. 30С: КОЕ в общей мышце, исследование 2 (штамм заражения USA300); ФИГ. 30D: КОЕ в селезенке, исследование 2 (штамм заражения USA300).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе «Уровень техники» и по всему описанию; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей и подобных, которые были включены в настоящее описание, проводится с целью предоставления контекста изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все эти вопросы составляют часть известного уровня техники в отношении каких-либо изобретений или формулы изобретения.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. В остальном, некоторые используемые в настоящем документе термины имеют значения, указанные в описании.

Следует отметить, что используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа «a», «an» и «the» включают ссылку на множественное число, если контекст явно не указывает иное.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как измененные во всех случаях термином «примерно». Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Подобным образом, диапазон концентрации от 1% до 10% (масс./об.) включает от 0,9% (масс./об.) до 11% (масс./об.). Как используется в настоящем документе, использование числового диапазона явно включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в таких диапазонах и доли значений, если в контексте явно не указано иное.

Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, должен пониматься как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалисты в данной области техники поймут или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются изобретением.

Используемые в настоящем документе термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» или любой другой их вариант следует понимать как подразумевающий включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и они должны быть неисключительными или открытыми. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое включает список элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не указанные явно или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если прямо не указано иное, «или» относится к включающему или, а не к исключающему или. Например, условие А или В удовлетворяется любым из следующих условий: А истинно (или

присутствует) и В ложно (или не присутствует), А ложно (или не присутствует) и В истинно (или присутствует), и оба А и В истинны (или присутствуют).

Используемый здесь соединительный термин «и/или» между несколькими указанными элементами понимается как охватывающий как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, когда два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов вместе. Любой из этих вариантов понимается как попадающий в значение, и таким образом, удовлетворяет требованию термина «и/или», как он используется в настоящем документе. Одновременное применение более чем одного из вариантов также понимается как подпадающее в значение и, следовательно, удовлетворяющее требованию термина «и/или».

Используемый в настоящем документе термин «состоит из» или варианты, такие как «состоит из» или «состоящий из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но что никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не может быть добавлена к указанному способу, структуре или композиции.

Используемый в настоящем документе термин «состоит по существу из» или варианты, такие как «по существу состоит из» или «состоящий по существу из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, и необязательное включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03).

Используемый в настоящем документе термин «субъект» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно, человека. Термин «млекопитающее», используемое в настоящем документе, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничены ими, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т.д., более предпочтительно, человека.

Также следует понимать, что термины «примерно», «приблизительно», «в целом», «по существу» и подобные им термины, используемые в настоящем документе применительно к размеру или характеристике компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является жесткой границей или параметром и не исключает незначительные вариации из них, которые являются функционально одинаковыми или аналогичными, как это будет понятно специалистам в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, должны включать вариации, которые, при использовании математических и промышленных принципов, принятых в данной области техники (например, округление, ошибки измерения или другие систематические ошибки,

производственные допуски и т. д.), не будут изменять наименьшую значащую цифру.

Термины «идентичные» или доля «идентичности», в контексте двух или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов (например, полипептидов LukA, LukB, SpA *Staphylococcus* и полинуклеотидов, которые их кодируют), относятся к двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, измеренного с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального осмотра.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравниваются тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости назначают координаты подпоследовательности и назначают параметры программы алгоритма последовательности. Алгоритм сравнения последовательностей затем вычисляет долю идентичности последовательности для тестируемой последовательности(ей) по отношению к эталонной последовательности, основываясь на назначенных параметрах программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), алгоритма выравнивания гомологии Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), способом поиска сходства Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), компьютерными реализациями этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), или путем визуального осмотра (см. в общем, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, подходящих для определения доли идентичности последовательностей и подобия последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализа BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает в себя сначала идентификацию пар последовательностей с высокой оценкой (HSP) путем определения коротких слов с длиной W в последовательности запроса, которая либо соответствует, либо удовлетворяет некоторой положительной пороговой оценке T при выравнивании со словом той же длины в последовательности базы данных. T называется порогом показателя сходства соседних слов (Altschul et al., см. выше). Эти начальные совпадения

соседних слов действуют как исходные данные для инициации поиска, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Затем совпадения слов расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько может быть увеличена совокупная оценка выравнивания.

Совокупные оценки рассчитываются с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров M (поощрительный балл за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпадение остатков; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей используется весовая матрица для расчета совокупной оценки. Расширение совпадения слов в каждом направлении останавливается, когда суммарная оценка выравнивания снижается на величину X от своего максимального достигнутого значения; кумулятивная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательной оценкой, или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова (W) 11, ожидание (E) 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, программа BLASTP использует по умолчанию длину слова (W) 3, ожидание (E) из 10, и матрицу оценки BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

В дополнение к вычислению доли идентичности последовательности, алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одной из мер сходства, обеспечиваемой алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая является признаком вероятности того, что совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями произойдет случайно. Например, нуклеиновая кислота считается аналогичной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее примерно 0,1, более предпочтительно, менее примерно 0,01 и наиболее предпочтительно, менее примерно 0,001.

Еще одним признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептиды по существу идентичны, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реакционноспособным с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно практически идентичен второму полипептиду, например, где два пептида различаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот по существу идентичны, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях.

Используемый в настоящем документе термин «полинуклеотид», синонимично обозначаемый как «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые

кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой не модифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничения, одноцепочечную и двухцепочечную ДНК, ДНК, представляющую собой смесь одноцепочечных и двухцепочечных областей, одноцепочечную и двухцепочечную РНК и РНК, представляющую собой смесь одноцепочечных и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, что более типично, двухцепочечными или представлять собой смесь одноцепочечных и двухцепочечных областей. Кроме того, «полинуклеотид» относится к трехцепочечным областям, содержащим РНК или ДНК или обе, РНК и ДНК. Термин полинуклеотид также включает ДНК или РНК, содержащие одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с модифицированными остовами для обеспечения стабильности или по другим причинам. «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. Множество модификаций могут быть получены для ДНК и РНК; таким образом, «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, которые обычно встречаются в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. «Полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» относится, например, к любому количеству нуклеиновых кислот, в которые может быть вставлена желаемая последовательность, например, путем рестрикции и лигирования, для транспорта между генетическими средами или для экспрессии в клетке-хозяине. Векторами нуклеиновой кислоты могут быть ДНК или РНК. Векторы включают, но не ограничены ими, плазмиды, фаги, фагемиды, бактериальные геномы, вирусные геномы, самоамплифицирующуюся РНК, репликоны.

Используемый в настоящем документе термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. «Клетка-хозяин» может быть клеткой любого типа, например первичной клеткой, клеткой в культуре или клеткой из клеточной линии. В одном варианте осуществления, «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную или трансдуцированную молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению. В другом варианте осуществления, «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной или трансдуцированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или воздействий окружающей среды, которые могут происходить в последующих поколениях, или из-за интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

Используемый в настоящем документе термин «экспрессия» относится к биосинтезу генного продукта. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и, кроме того,

охватывает все встречающиеся в природе пост- транскрипционные и пост- трансляционные модификации. Экспрессированный полипептид может находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для роста клеточной культуры, или может быть закреплен на клеточной мембране.

Используемые в настоящем документе термины «пептид», «полипептид» или «белок» могут относиться к молекуле, состоящей из аминокислот, и могут распознаваться специалистами в данной области техники как белок. В настоящем документе используется обычный однобуквенный или трехбуквенный код для аминокислотных остатков. Термины «пептид», «полипептид» и «белок» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и он может быть прерван не аминокислотами. Эти термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилированием, фосфорилированием или любой другой манипуляцией или модификацией, такой как конъюгация с метящим компонентом. В определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, аминокислоты не природного происхождения и т. д.), а также другие модификации, известные в данной области техники.

Описанные в настоящем документе пептидные последовательности записываются в соответствии с обычным соглашением, согласно которому N-концевая область пептида находится слева, и C-концевая область находится справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, представлена L-форма аминокислоты, если точно не указано иное.

Термин «выделенный» может относиться к нуклеиновой кислоте или полипептиду, которые по существу не содержат клеточный материал, бактериальный материал, вирусный материал или культуральную среду (при получении методами рекомбинантной ДНК) их источника происхождения или химических предшественников или других химических веществ (при химическом синтезе). Более того, выделенный полипептид относится к полипептиду, который можно вводить субъекту в виде выделенного полипептида; другими словами, полипептид нельзя просто считать «выделенным», если он прикреплен к колонке или вделан в гель. Более того, «выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты» или «выделенный пептид» представляет собой фрагмент нуклеиновой кислоты или белка, который не встречается в природе в виде фрагмента и/или обычно не находится в функциональном состоянии.

Используемая в настоящем документе фраза «иммунный ответ» или ее эквивалент «иммунологический ответ» относится к развитию гуморального (опосредованного антителами), клеточного (опосредованного антигенспецифическими Т-клетками или продуктами их секреции) или и гуморального, и клеточного ответа, направленного против белка, пептида, углевода или полипептида по настоящему изобретению у субъекта-

реципиента. Такой ответ может представлять собой активный ответ, индуцированный введением иммуногена, или пассивный ответ, индуцированный введением антитела, материала, содержащего антитело, или примированных Т-клеток. Клеточный иммунный ответ вызывается презентацией полипептидных эпитопов в ассоциации с молекулами МНС класса I или класса II для активации антигенспецифических CD4 (+) Т-хелперных клеток и/или CD8 (+) цитотоксических Т-клеток. Ответ также может включать активацию моноцитов, макрофагов, NK клеток, базофилов, дендритных клеток, астроцитов, клеток микроглии, эозинофилов или других компонентов врожденного иммунитета. В настоящем документе «активный иммунитет» относится к любому иммунитету, придаваемому субъекту путем введения антигена.

LukA, LukB и/или SpA полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие их

В настоящем документе было обнаружено, что после вакцинации вакцинными комбинациями по настоящему изобретению, вакцинные антитела (т.е., которые были индуцированы после вакцинации), образующиеся как против вариантов полипептидов SpA, так и против мутантных полипептидов LukAB, обеспечивали синергетическую защиту и эффективное уничтожение *S. aureus* благодаря двойному действию. С одной стороны, нейтрализация молекулы SpA предотвращала перевернутое связывание антител (связывание IgG Fc) и предотвращала В-клеточную дисрегуляцию через нарушение связывания SpA с V_H3. С другой стороны, нейтрализация токсинов LukAB предотвращала лизис фагоцитов под действием LukAB и, таким образом, позволяла нейтрофилам человека оставаться функциональными и способными уничтожать *S. aureus* путем опсонофагоцитоза. Ответ антител была продуктивным, поскольку антитела связывали соответствующую мишень, и фагоциты были способны уничтожать, т.е. имел место явный и аддитивный синергетический эффект нейтрализации как SpA, так и LukAB.

В общем аспекте, изобретение относится к иммуногенным композициям, содержащим вариант белка А (SpA) *S. aureus* и мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина, содержащий (i) полипептид LukA, (ii) полипептид LukB и/или (iii) димерный полипептид LukAB, где полипептид LukA, полипептид LukB и/или димерный полипептид LukAB имеют одну или более аминокислотных замен, делеций или их комбинации в полипептиде LukA, полипептиде LukB или димерном полипептиде LukAB. Одна или более аминокислотных замен, делеций или их комбинаций нарушают способность полипептидов LukA, LukB и/или LukAB образовывать поры на поверхности эукариотических клеток, тем самым снижая токсичность полипептида LukA и/или LukB или мутантного димерного полипептида LukAB относительно соответствующего полипептида LukA и/или LukB дикого типа или димерного полипептида LukAB. Полипептид варианта белка А *Staphylococcus* (SpA) содержит одну или более аминокислотных замен, делеций, вставок или их комбинаций, так что полипептид варианта SpA нарушает способность связывать Fc IgG и/или V_H3, что дает полипептид варианта SpA со сниженной токсичностью по сравнению с полипептидом SpA дикого типа или другим полипептидом варианта SpA, таким как полипептид SpA_{ККАА}.

Полипептиды субъединицы стафилококкового лейкоцидина: полипептиды LukA, полипептиды LukB и/или димерные полипептиды LukAB

В общем аспекте, изобретение относится к иммуногенным композициям, содержащим мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина или полинуклеотиды (ДНК или РНК), кодирующие его. Мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина может содержать (i) полипептид LukA, (ii) полипептид LukB, и/или (iii) димерный полипептид LukAB. Полипептид LukA, полипептид LukB и/или димерный полипептид LukAB могут содержать одну или более аминокислотных замен, делеций, вставок или их комбинацию в полипептиде LukA, полипептиде LukB и/или димерном полипептиде LukAB. В некоторых вариантах осуществления, одна или более аминокислотных замен, делеций, вставок или их комбинаций находятся на границе раздела протомер/протомер LukAB, на границе раздела димер/димер LukAB, в мембраносвязывающей щелевидной области LukB, в порообразующей области LukB, или любой их комбинации, так что способность субъединиц лейкоцидина образовывать димеры, олигомеризоваться, образовывать поры на поверхности эукариотических клеток, или любая их комбинация, нарушается. Нарушение может вызвать снижение токсичности мутантного полипептида субъединицы стафилококкового лейкоцидина.

В некоторых вариантах осуществления, одна или более аминокислотных замен, делеций, вставок или их комбинаций существенно не снижают иммуногенность мутантного полипептида субъединицы лейкоцидина по сравнению с соответствующим полипептидом субъединицы лейкоцидина дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, мутантный полипептид стафилококковой субъединицы является иммуногенным и вызывает иммунный ответ, который может включать антитела, способные нейтрализовать действие полипептида стафилококковой субъединицы лейкоцидина дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, мутантный полипептид стафилококковой субъединицы лейкоцидина или полинуклеотиды (ДНК или РНК), кодирующие его, могут быть иммуногенными и индуцировать антитела, которые могут более эффективно нейтрализовать действие полипептида субъединицы стафилококка дикого типа по сравнению с соответствующим полипептидом субъединицы лейкоцидина дикого типа.

Термины «полипептид стафилококковой субъединицы лейкоцидина», «стафилококковая субъединица лейкоцидина», «субъединица LukA», «полипептид LukA», «субъединица LukB», «полипептид LukB», «димерный полипептид LukAB» и подобные, используемые в данном документе, охватывают субъединицы зрелого или полноразмерного стафилококкового лейкоцидина (например, LukA и/или LukB) и фрагменты, варианты или производные субъединиц зрелого или полноразмерного стафилококкового лейкоцидина (например, LukA и/или LukB), и химерные и слитые полипептиды, содержащие зрелые или полноразмерные полипептиды субъединиц стафилококкового лейкоцидина (например, LukA и/или LukB) или один или более фрагментов зрелых или полноразмерных субъединиц стафилококкового лейкоцидина

(например, LukA и/или LukB). В некоторых вариантах осуществления, мутантные полипептиды субъединиц стафилококкового лейкоцидина, описанные в настоящем документе, имеют пониженную токсичность по сравнению с соответствующим полипептидом субъединицы стафилококкового лейкоцидина дикого типа и/или незначительно пониженную иммуногенность по сравнению с соответствующим полипептидом субъединицы стафилококкового лейкоцидина дикого типа.

Порообразующие токсины, например, однокомпонентный альфа-гемолизин и двухкомпонентные гемолизины и лейкотоксины, играют важную роль в ускользании стафилококков от иммунологического надзора. Эти токсины могут убивать иммунные клетки и вызывать разрушение тканей, тем самым ослабляя хозяина в течение первой стадии инфекции, и способствуют диссеминации бактерий и метастатическому росту. Двухкомпонентный токсин LukAB, состоящий из субъединиц LukA и LukB, уникален тем, что секретируется в виде димера, который затем октамеризуется на поверхности клеток с образованием пор. Напротив, например, два компонента PVL, LukS-PV и LukF-PV, секретируются отдельно и образуют порообразующий октамерный комплекс при связывании LukS-PV с его рецептором и последующем связывании LukF-PV с LukS-PV (Miles et al., *Protein Sci.* 11(4):894-902 (2002); Pedelacq et al., *Int. J. Med. Microbiol.* 290(4-5):395-401 (2000)). Мишени PVL могут включать, например, полиморфноядерные нейтрофилы (PMN), моноциты и макрофаги.

Были охарактеризованы и другие двухкомпонентные токсины: S компоненты HlgA и HlgC и F компонент HlgB для γ -гемолизина; LukS-PV, LukF-PV, LukE (S) и LukD (F); и LukM (S) и LukF-PV-подобный (F) (WO 2011/112570). Благодаря близкому сходству, эти S компоненты могут комбинироваться с F компонентом и образовывать активный токсин с различной специфичностью к мишени (Ferrerias et al., *Biochim Biophys Acta* 1414(1-2):108-26 (1998); Prevost et al., *Infect. Immun.* 63(10):4121-9 (1995)). γ -гемолизин является сильно гемолитичным и на 90% менее лейкотоксичным, чем PVL, в то время как PVL является не гемолитичным. Однако, HlgA или HlgC в паре с LukF-PV способствует лейкотоксической активности (Prevost et al., *Infect. Immun.* 63(10):4121-9 (1995)). PVL и другие лейкотоксины лизируют нейтрофилы, а Hlg является гемолитическим (Kaneko et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(5):981-1003 (2004)) и также сообщалось о лизисе нейтрофилов (Malachowa et al., *PLoS One* 6(4):e18617 (2011)). Хотя PVL субъединицы происходят из фага, белки Hlg происходят из локуса Hlg и найдены в 99% клинических изолятов (Kaneko et al., *выше*). Субъединицы Hlg активируются во время роста *S. aureus* в крови (Malachowa et al., *выше*), и было показано, что Hlg участвует в выживании *S. aureus* в крови (Malachowa et al., *Virulence* 2(6) (2011)). Мутант USA 300 Δ -hlgABC обладает сниженной способностью вызывать смертность в модели бактериемии у мышей (Malachowa et al., *PLoS One* 6(4):e18617 (2011)). Токсин LukED имеет решающее значение для инфекций кровотока у мышей (Alonzo et al., *Mol. Microbiol.* 83(2):423-35 (2012)). Было описано, что LukAB действует синергетически с PVL для усиления лизиса PMN (Ventura et al., *PLoS One* 5(7):e11634 (2010); LukAB упоминается в настоящем документе как

LukGH).

Сходство последовательностей пяти различных лейкотоксинов лейкоцидинов γ -гемолизина (HlgAB и HlgCB), лейкоцидина E/D (LukED), лейкоцидина Пантона-Валина (PVL) и лейкоцидина A/B (LukAB, также известного как LukGH) колеблется в пределах от 60% до 80%, за исключением LukAB, который только на 30-40% является аналогичным другим. Хотя все лейкоцидины могут таргетировать и убивать полиморфоядерные клетки, они различаются по своей способности делать это. LukAB чрезвычайно эффективен для уничтожения PMN человека, включая нейтрофилы. LukAB отличается от других лейкотоксинов, так как он секретируется в виде гетеродимера, который специфически связывает домен I субъединицы CD11b человека рецептора интегрина $\alpha M/\beta 2$, который отвечает за специфическое связывание и уничтожение PMN человека с помощью LukAB (<http://www.pnas.org/content/110/26/10794.full.pdf>). Считается, что нейтрализация этих токсинов, и, в частности, токсина LukAB, антителами, индуцированными вакциной, значительно снижает гибель нейтрофилов во время инфекции *S. aureus*, тем самым сохраняя способность иммунной системы хозяина выводить патоген.

LukED

Хотя LukED не является компонентом корового генома *S. aureus*, он сохраняется в преобладающих линиях, связанных с инвазивными инфекциями. В отличие от LukAB и PVL, которые проявляют активность видоспецифическим образом, LukED проявляет широкую активность у разных видов, включая сопоставимую токсичность среди лейкоцитов мыши, кролика и человека. LukED проявляет литическую активность в отношении клеток, экспрессирующих рецепторы CCR5, включая макрофаги, Т-клетки и дендритные клетки, и CXCR1, CXCR2, включая первичные нейтрофилы, моноциты, естественные киллеры и субпопуляцию CD8⁺ Т-клеток (Sraan et al., 2017 Nat Rev Microbiol 15: 435-47). Эта активность способствует ускользанию как врожденного, так и адаптивного звена иммунной системы, что способствует прогрессированию заболевания. В животных моделях инфекции, LukED вызывает провоспалительный ответ и способствует репликации в печени и почках путем уничтожения инфильтрирующих нейтрофилов. LukED также связывает эритроциты в DARC (рецептор антигена Даффи хемокинов)-зависимым образом, что приводит к гемолизу, высвобождению гемоглобина и стимулированию роста *S. aureus* за счет приобретения железа (Sraan et al., 2015 Cell Host Microbe 18: 363-70).

Ha

Альфа-гемолизин (альфа токсин, Ha) способствует патогенезу и летальному исходу инфекции за счет множественной активности, включая прямую токсичность и лизис эритроцитов и других клеток, а также иммуномодуляцию. Ha секретируется в виде растворимого мономерного белка, который связывается с рецептором ADAM10 и собирается в гептамерный комплекс пор ствола, который структурно очень похож на таковой двухкомпонентных β -PFT, такой как LukAB и LukED. Помимо эритроцитов, при высоких концентрациях Ha может лизировать множество других типов клеток,

экспрессирующих ADAM10, включая макрофаги и моноциты. Клеточный лизис, опосредованный Hla, зависит как от концентрации токсина, так и от уровня экспрессии ADAM10. Роль Hla в вирулентности *S. aureus* хорошо известна на многочисленных животных моделях, включая сепсис, пневмонию, кожные инфекции и другие (Berube and Bubeck Wardenburg, 2013 *Toxins* 5: 1140-66). Hla экспрессируется во время инфекции у человека и является иммуногенным, с более высокими титрами анти-Hla антител, ассоциированными пониженным риском сепсиса, вызванного *S. aureus* (Adhikari et al., 2012 *J Infect Dis* 206: 915-23). Дополнительно, изоляты *S. aureus*, демонстрирующие повышенные уровни экспрессии Hla, ассоциированы с инвазивным заболеванием. Из-за его роли в вирулентности *S. aureus*, Hla широко изучался в качестве вакцинного антигена. Ослабленный мутант Hla_{H35L}, который не может образовывать комплексы активных пор, продемонстрировал защитную эффективность в нескольких моделях инфицирования мышей (Bubeck Wardenburg and Schneewind, 2008 *J Exp Med* 205: 287-94). Hla антигены, полученные из N-концевых 62 остатков (Adhikari et al., 2016 *Vaccine* 34: 6402-7) или при делеции стволового домена (Fiaschi et al., 2016 *Vaccine* 23: 442-450) также были иммуногенными и вызывали защитные иммунные ответы.

«Полипептиды LukA», как описано в настоящем документе, представляют собой полипептиды, нативные для стафилококковых организмов (например, *Staphylococcus aureus*), которые специфически таргетируют и связывают с фагоцитами человека (но не с эндотелиальными клетками или клетками мыши). После связывания полипептида LukA с мембраной фагоцита, LukA олигомеризуется со стафилококковой F-субъединицей лейкоцидина (например, LukF-PVL, LukD и HlgB и LukB, как описано в настоящем документе). При олигомеризации, полипептиды образуют трансмембранную пору (вместе обозначаемые как активность LukA).

Полипептиды LukA обычно содержат 351 аминокислотный остаток. Аминоконцевые 27 аминокислотных остатков представляют нативную секреторную/сигнальную последовательность, и, таким образом, зрелая секретируемая форма LukA представлена аминокислотными остатками 28-351 и может быть обозначена как «LukA₍₂₈₋₃₅₁₎» или «зрелый LukA». Соответственно, незрелая форма LukA может быть обозначена в настоящем документе как «LukA₍₁₋₃₅₁₎». Примеры незрелых полипептидов LukA, выделенных из различных штаммов *Staphylococcus aureus*, включает полипептиды LukA с SEQ ID NO: 2-14. SEQ ID NO: 1 представляет консенсусную последовательность полипептида LukA, основанную на выравнивании SEQ ID NO: 2-14, как описано в WO 2011/140337, которая включена в качестве ссылки. Примеры зрелых полипептидов LukA, соответствующих незрелым полипептидам LukA с SEQ ID NO: 1-14 с удаленной последовательностью секреции/подачи сигнала, включают SEQ ID NO: 15-28, соответственно.

«Полипептиды LukB», как описано в настоящем документе, представляют собой полипептиды, нативные для стафилококковых организмов (например, *Staphylococcus aureus*), которые демонстрируют профиль активности F-субъединицы лейкоцидина

(например, LukF-PVL, LukD и HlgB). Полипептиды LukB специфически олигомеризуются со стафилококковой S-субъединицей лейкоцидина (например, LukS-PVL, LukE и HlgC и LukA, как описано в настоящем документе), которая связана с фагоцитом человека. После олигомеризации он образует трансмембранную пору в фагоците (вместе именуемую активностью LukB).

Полипептиды LukB обычно содержат 339 аминокислотных остатков. Аминоконцевые (N-концевые) 29 аминокислотных остатков представляют последовательность секреции/подачи сигнала и, таким образом, зрелая, секретируемая форма LukB представлена аминокислотными остатками 30-339 и может обозначаться как «LukB₍₃₀₋₃₃₉₎» или «зрелый LukB». Соответственно, незрелая форма LukB может обозначаться в настоящем документе как «LukB₍₁₋₃₃₉₎». Примеры незрелых полипептидов LukB, выделенных из разных штаммов *Staphylococcus aureus*, включают полипептиды LukB с SEQ ID NO:30-41. SEQ ID NO:29 представляет консенсусную последовательность полипептида LukB, основанную на выравнивании SEQ ID NO:30-41, как описано в WO2011/140337, которая включена в настоящий документ полностью посредством ссылки. Примеры зрелых полипептидов LukB, соответствующих незрелым полипептидам LukB с SEQ ID NO: 29, 30 и 32-41 с удаленной последовательностью секреции/подачи сигнала, включают SEQ ID NO: 42-53, соответственно.

В настоящем документе делается ссылка на полипептиды LukA, полипептиды LukB и димерные полипептиды LukAB. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что LukA также может обозначаться как LukH, и что LukB также может обозначаться как LukG, см., например, патент США № 8,431,687 (LukAB), Badarau et al., JBC 290(1):142-56 (2015) (LukGH); и Badarau et al., MABS 9(7):1347-60 (2016) (LukGH).

Полипептиды LukA и LukB могут содержать одну или более дополнительных аминокислотных вставок, замен и/или делеций, например, один или более аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 1-28 и/или SEQ ID NO: 29-53 могут быть заменены другой аминокислотой аналогичной полярности, которая может действовать как функциональный эквивалент, приводя к молчащему изменению. Замена аминокислоты на аминокислоту аналогичной полярности может привести к полипептиду LukA и/или LukB с теми же основными свойствами, что и полипептиды LukA и/или LukB дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, в полипептиде LukA и/или LukB могут быть сделаны не консервативные изменения с целью инактивации или детоксикации LukA и/или LukB. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды LukA могут содержать делецию в положениях аминокислотных остатков 342-351 SEQ ID NO: 1-14 (за исключением SEQ ID NO: 4-6, которые содержат 9 аминокислот в этих положениях и, таким образом, могут содержать делецию в положениях аминокислотных остатков 342-350). Делеция в аминокислотных остатках в положениях 342-351 должны находиться в положениях аминокислотных остатков 315-324 SEQ ID NO: 15-28 (за исключением SEQ ID NO: 18-20, которые содержат 9 аминокислот в этих положениях и, таким образом, могут содержать делеции в положениях аминокислотных остатков 315-323).

Детоксифицированные LukA и/или LukB можно использовать в иммуногенных композициях, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлены полипептиды LukA, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью к любой из SEQ ID NO: 1-28.

В некоторых вариантах осуществления, одна или более мутаций включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен, делеций, вставок или из комбинаций в полипептиде LukA. В некоторых вариантах осуществления, одна или более замен, делеций, вставок или их комбинаций находятся в консервативных остатках на границе раздела протомер/протомер LukAB, на границе раздела димер/димер или любой их комбинации. Способность мутантного полипептида LukA образовывать димеры, олигомеризацию, образование пор на поверхности эукариотических клеток, или любое их сочетание, например, может быть нарушена. Токсичность мутантного полипептида LukA по сравнению с соответствующим полипептидом LukA дикого типа может, например, быть снижена. Иммуногенность мутантного полипептида LukA и/или димерного полипептида LukAB по сравнению с соответствующим полипептидом LukA дикого типа и/или димерным полипептидом LukAB, например, не может быть значительно снижена. Полипептиды LukA, содержащие одну или более мутаций, описаны в WO 2018/232014, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, замена остатка глутаминовой кислоты в положении 323 зрелого полипептида LukA может быть сделана с целью инактивации или детоксификации димера LukAB. В некоторых вариантах осуществления, замена остатка глутаминовой кислоты в положении 323 зрелого полипептида LukA аланиновым остатком, т.е. замена E323A, может быть сделана с целью инактивации или детоксификации димерного полипептида LukAB (DuMont et al., *Infect. Immun.* (2014)).

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлены полипептиды LukB, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью к любой из SEQ ID NO:29-53.

В некоторых вариантах осуществления, одна или более мутаций включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен, делеций, вставок или из комбинаций в полипептиде LukB. В некоторых вариантах осуществления, одна или более замен, делеций, вставок или их комбинаций находятся в консервативных остатках на границе раздела протомер/протомер LukAB, в мембраносвязывающей щелевидной области LukB, в порообразующей области LukB, или любой их комбинации. Например,

может быть нарушена способность мутантного полипептида LukB образовывать димеры, олигомеризоваться, образовывать поры на поверхности эукариотических клеток или любой их комбинации. Например, может быть снижена токсичность мутантного полипептида LukB по сравнению с соответствующим полипептидом LukB дикого типа. Например, может быть значительно снижена иммуногенность мутантного полипептида LukB и/или димерного полипептида LukAB по сравнению с соответствующим полипептидом LukB дикого типа и/или димерным полипептидом LukAB. Полипептиды LukB, содержащие одну или более мутаций, описаны в WO 2018/232014, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлены мутантные димерные полипептиды LukAB с аминокислотной последовательностью с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью к любой из SEQ ID NO: 1-28, и аминокислотной последовательностью с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью к любой из SEQ ID NO: 29-53.

В некоторых вариантах осуществления, мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина имеет мутацию на границе раздела протомер/протомер LukAB. Мутация может, например, приводить к образованию неполного, более крупного лейкоцидинового октамерного кольца; снижать или устранять гемолитическую/лейкотоксическую активность токсина; или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, мутация может включать замену в полипептиде LukA, соответствующую аминокислоте R49 в SEQ ID NO: 15; замену в полипептиде LukA, соответствующую аминокислоте L61 в SEQ ID NO: 15; замену в полипептиде LukB, соответствующую аминокислоте D49 в SEQ ID NO: 42, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukA, соответствующая аминокислоте R49 в SEQ ID NO: 15, представляет собой глутамат (E). Замена в полипептиде LukA может разрушить солевой мостик между LukA R49 в SEQ ID NO: 15 и LukB D49 в SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukA, соответствующая аминокислоте L61 в SEQ ID NO: 15, представляет собой замену аспарагином (N), глутамином (Q) или аргинином (R). Замена в полипептиде LukA может разрушить гидрофобный карман, обнаруженный на границе раздела протомер/протомер LukAB. В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukB, соответствующая аминокислоте D49 в SEQ ID NO: 42, представляет собой замену аланином (A) или лизином (K). Замена в полипептиде LukB может разрушить солевой мостик между LukB D49 в SEQ ID NO: 42 и LukA R49 в SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления, мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина содержит мутацию на границе раздела димер/димер LukAB. Мутация может, например, нарушать образование димера LukAB, может нарушать олигомеризацию LukAB на поверхности эукариотической клетки или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, мутация может включать замену в полипептиде LukA, соответствующую аминокислоте D39 SEQ ID NO:15; замену в полипептиде LukA, соответствующую аминокислоте D75 в SEQ ID NO:15; замену в полипептиде LukA, соответствующую аминокислоте K138 в SEQ ID NO:15; замену в полипептиде LukA, соответствующую аминокислоте D197 в SEQ ID NO:15; замену в полипептиде LukB, соответствующую аминокислоте K12 в SEQ ID NO:42; замену в полипептиде LukB, соответствующую аминокислоте K19 в SEQ ID NO:42; замену в полипептиде LukB соответствующую аминокислоте R23 в SEQ ID NO: 42; замену в полипептиде LukB соответствующую аминокислоте K58 в SEQ ID NO:42; замену в полипептиде LukB, соответствующую аминокислоте E112 в SEQ ID NO:42; замену в полипептиде LukB, соответствующую аминокислоте K218 в SEQ ID NO:42; или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukA, соответствующая аминокислоте D39 в SEQ ID NO: 15, представляет собой замену аланином (A) или аргинином (R). Замена в D39 в SEQ ID NO: 15 может разрушить солевой мостик между LukA D39 в SEQ ID NO:15 и LukB K58 в SEQ ID NO:42.

В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukA, соответствующая аминокислоте D75 в SEQ ID NO:15, представляет собой замену аланином (A). Замена в D75 в SEQ ID NO:15 может разрушить солевой мостик между LukA D75 в SEQ ID NO:15 и LukB R23 в SEQ ID NO:42.

В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukA, соответствующая аминокислоте K138 в SEQ ID NO: 15, представляет собой замену аланином (A). Замена в положении K138 в SEQ ID NO: 15 может разрушить солевой мостик между LukA K138 в SEQ ID NO: 15 и LukB E112 в SEQ ID NO:42.

В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukA, соответствующая аминокислоте D197 в SEQ ID NO: 15, представляет собой замену аланином (A) или лизином (K). Замена в D197 в SEQ ID NO: 15 может разрушить солевой мостик между LukA D197 в SEQ ID NO:15 и LukB K218 в SEQ ID NO:42.

В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukB, соответствующая K12 в SEQ ID NO: 42, представляет собой замену аланином (A). В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukB, соответствующая K19 в SEQ ID NO: 42, представляет собой замену аланином (A). В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukB, соответствующая R23 в SEQ ID NO: 42, представляет собой замену аланином (A) или глутаматом (E). В некоторых вариантах осуществления, полипептид LukB может содержать тройную мутацию, соответствующую K12, K19 и R23 в SEQ ID NO: 42. Замена в K12, K19 и/или R23 в SEQ ID NO: 42 может

разрушить по меньшей мере солевой мостик между LukB R23 в SEQ ID NO: 42 и LukA D75 в SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukB, соответствующая K58 в SEQ ID NO: 42, представляет собой замену аланином (A) или глутаматом (E). Замена в положении K58 в SEQ ID NO: 42 может разрушить солевой мостик между LukB K58 в SEQ ID NO:42 и LukA D39 в SEQ ID NO:15.

В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukB, соответствующая E112 в SEQ ID NO: 42, представляет собой замену аланином (A). Замена в E112 в SEQ ID NO: 42 может разрушить солевой мостик между LukB E112 в SEQ ID NO: 42 и LukA K138 в SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukB, соответствующая K218 в SEQ ID NO: 42, представляет собой замену аланином (A). Замена в положении K218 SEQ ID NO: 42 может разрушить солевой мостик между LukB K218 в SEQ ID NO: 42 и LukA D197 в SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления, мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина содержит мутацию в области мембраносвязанной щели LukB. Мутация может, например, нарушать взаимодействие субъединицы LukB с полярными головными группами липидного бислоя эукариотической клетки. В некоторых вариантах осуществления, мутация может включать замену в полипептиде LukB, соответствующую аминокислоте H180 в SEQ ID NO:42; замену в полипептиде LukB, соответствующую аминокислоте E197 в SEQ ID NO:42; замену в полипептиде LukB, соответствующую R203 в SEQ ID NO:42; или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, замена в полипептиде LukB, соответствующая H180 в SEQ ID NO: 42, представляет собой замену аланином (A); замена в полипептиде LukB, соответствующая E197 в SEQ ID NO: 42, представляет собой замену аланином (A); и замена в полипептиде LukB, соответствующая R203 в SEQ ID NO: 42, представляет собой замену аланином (A).

В некоторых вариантах осуществления, мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина содержит мутацию в порообразующей области LukB. Мутация может, например, затруднять цитоплазматический край поры LukAB, образованной на поверхности эукариотической клетки, тем самым затрудняя образование пор. В некоторых вариантах осуществления, мутация в порообразующей области включает делецию аминокислот F125 - T133 в SEQ ID NO: 42; и в некоторых аспектах дополнительно включает вставку одного, двух, трех, четырех или пяти глициновых (G) остатков после аминокислоты, соответствующей D124 в SEQ ID NO:42.

В некоторых вариантах осуществления, димерный полипептид LukAB содержит (a) полипептид LukA с аминокислотной заменой L61R, соответствующей SEQ ID NO:15, и полипептид LukB с аминокислотной заменой D49K, соответствующей SEQ ID NO:42; (b) полипептид LukA с аминокислотной заменой L61R, соответствующей SEQ ID NO:15, и полипептид LukB с аминокислотной заменой R23A, соответствующей SEQ ID NO:42; (c)

В другом общем аспекте, изобретение относится к одной или нескольким выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим полипептид варианта белка А (SpA) *Staphylococcus aureus* и мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина (т.е. мутантный полипептид LukA, мутантный полипептид LukB и/или мутантный димерный полипептид LukAB) по изобретению. Выделенная нуклеиновая кислота может кодировать полипептид варианта SpA и выделенный мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из субъединицы стафилококка LukA дикого типа, субъединицы стафилококка LukB дикого типа или димера стафилококка LukAB дикого типа, за исключением наличия одной или нескольких мутаций, как описано в настоящем документе, которые снижают токсичность мутантной субъединицы лейкоцидина по сравнению с соответствующей субъединицей лейкоцидина дикого типа. В некоторых аспектах, замены, делеции или их комбинация не снижает значительно иммуногенность мутантной субъединицы LukA, мутантной субъединицы LukB или мутантного димера LukAB по отношению к соответствующей субъединице или димеру лейкоцидина дикого типа. Специалистам в данной области техники будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, заменена, удалена, вставлена и т. д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды или их фрагменты по изобретению, могут быть изменены без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему одну или более выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид варианта SpA и мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина (т.е. мутантный полипептид LukA, мутантный полипептид LukB и/или мутантный димерный полипептид LukAB) по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники, в свете настоящего изобретения, такой как плаزمид, космида, фаговый вектор, вирусный вектор, самореплицирующаяся РНК или репликон. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как плазмид. Вектор может включать любой элемент для установления обычной функции вектора экспрессии, например, промотор, связывающий рибосому элемент, терминатор, энхансер, маркер селекции и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцируемым или репрессируемым промотором. Множество векторов экспрессии, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известно в данной области техники и может быть использовано для продуцирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке. Для создания рекомбинантного вектора экспрессии по вариантам осуществления изобретения можно использовать традиционные методы клонирования или синтеза искусственных генов. Такие методы хорошо известны специалистам в данной области техники ввиду настоящего раскрытия.

После выбора вектора экспрессии, описанный в настоящем документе полинуклеотид можно клонировать ниже промотора, например, в области полилинкера. Вектор трансформируют в соответствующий бактериальный штамм, и получают ДНК с использованием стандартных методов. Ориентацию последовательности ДНК полипептида, а также другие элементы, включенные в вектор, подтверждают с использованием рестрикционного картирования, анализа последовательности ДНК и/или ПЦР анализа. Бактериальные клетки, содержащие правильный вектор, можно хранить в виде банков клеток.

В другом общем аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей одну или более выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид варианта SpA и мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина (т.е. мутантный полипептид LukA, мутантный полипептид LukB и/или мутантный димерный полипептид LukAB) по настоящему изобретению. Любая клетка-хозяин, известная специалистам в данной области техники по настоящему изобретению, может быть использована для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, клетки-хозяева представляют собой клетки *E.coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, scFv или Fab антитела), клетки CHO-DG44 или CHO-K1 или клетки HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG)., Согласно конкретным вариантам осуществления, рекомбинантный вектор экспрессии трансформируют в клетки-хозяева обычными способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрируется в геном клетки-хозяина, так что рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессируется.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения полипептида варианта SpA и мутантного полипептида субъединицы стафилококкового лейкоцидина (т.е. мутантного полипептида LukA, мутантного полипептида LukB и/или мутантного димерного полипептида LukAB) по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид варианта SpA и мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина в условиях, обеспечивающих получение полипептида варианта SpA и мутантного полипептида субъединицы стафилококкового лейкоцидина по изобретению, и выделение полипептида варианта SpA и мутантного полипептида субъединицы стафилококкового лейкоцидина из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные полипептиды варианта SpA и мутантные полипептиды субъединицы стафилококкового лейкоцидина (т.е. мутантные полипептиды LukA, мутантные полипептиды LukB и/или мутантные димерные полипептиды LukAB) могут быть получены из клетки и очищены в соответствии с обычными методами, известными в данной области техники, и описанными в настоящем документе. Способы получения мутантных димерных полипептидов LukAB известны в данной области техники, см., например, DuMont et al., *Infection and Immunity* 82(3):1268-76 (2014); Kailasan et al., *Toxins* 11(6):339 (2019).

Стафилококковый белок А (SpA)

«Белок А» и «SpA», используемые в настоящем документе, могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к заякоренному поверхностному белку клеточной стенки *S. aureus*, функция которого заключается в обеспечении ускользания бактерий от врожденного и адаптивного иммунного ответа инфицированного хозяина. Белок А может связывать иммуноглобулины в их Fc части, может взаимодействовать с доменом VH3 В-клеточных рецепторов, соответствующим образом стимулируя пролиферацию и апоптоз В-клеток, может связываться с доменами фактора А1 фон Виллебранда для активации внутриклеточного свертывания, и также может связываться с рецептором-1 TNF, чтобы способствовать патогенезу стафилококковой пневмонии.

Все штаммы *S. aureus* экспрессируют структурный ген для белка А (spa) (Jensen (1958); Said-Salim et al., (2003)), хорошо охарактеризованного фактора вирулентности, у которого заякоренный на клеточной стенке поверхностный белковый продукт (SpA) охватывает пять высоко гомологичных доменов, связывающих иммуноглобулин, обозначенных E, D, A, B и C (Sjodahl, (1977)). Домены иммуноглобулина демонстрируют ~80% идентичность на уровне аминокислот, имеют длину от 56 до 61 остатка и организованы как тандемные повторы (Uhlen et al., (1984)). Каждый из доменов, связывающих иммуноглобулины, состоит из антипараллельных α -спиралей, которые собираются в пучок из трех спиралей и связывают Fc домен иммуноглобулина G (IgG) (Deisenhofer, (1981); Deisenhofer et al., (1978)), тяжелая цепь VH3 (Fab) IgM (Graille et al., (2000)), фактор фон Виллебранда в его А1 домене (O'Seaghdha et al., (2006)) и рецептор 1 фактора некроза опухоли α (TNF- α) (TNFR1) (Gomez et al., (2006)).

SpA препятствует нейтрофильному фагоцитозу стафилококков за счет связывания Fc компонента IgG (Jensen, (1958); Uhlen et al., (1984)). Кроме того, SpA способен активировать внутрисосудистое свертывание путем связывания с доменами фактора А1 фон Виллебранда и (Hartleib et al., (2000)). Белки плазмы, такие как фибриноген и фибронектин, действуют как мостики между стафилококками (C1fA и C1fB) и интегрином тромбоцитов GPIIb/IIIa (O'Brien et al., (2002)), активность, которая дополняется за счет ассоциации SpA с vWF А1, что позволяет стафилококкам захватывать тромбоциты через рецептор тромбоцитов GPIIb- α (Foster, (2005); O'Seaghdha et al., (2006)). SpA также связывает TNFR1, и это взаимодействие способствует патогенезу стафилококковой пневмонии (Gomez et al., (2004)). SpA активирует провоспалительную сигнализацию через TNFR1-опосредованную активацию TRAF2, p38/c-Jun киназу, митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK) и Rel-транскрипционный фактор NF- κ B. Связывание SpA дополнительно индуцирует шеддинг TNFR1, активность, которая, по-видимому, требует TNF-превращающий фермент (TACE) (Gomez et al., (2007)). Каждая из описанных активностей опосредована пятью доменами связывания IgG и может быть нарушена теми же аминокислотными заменами, первоначально определенными их потребностью во взаимодействии между белком А и IgG1 человека (Cedergren et al., (1993)).

SpA также действует как В-клеточный суперантиген, захватывая Fab область VH3,

несущую IgM, В-клеточный рецептор (Gomez et al., (2007); Goodyear et al., (2003); Goodyear and Silverman (2004); Roben et al., (1995)). После внутривенного заражения, мутации SpA стафилококка показывают снижение стафилококковой нагрузки в тканях органов и резко сниженную способность к образованию абсцессов. При заражении диким типом *S. aureus*, абсцессы образуются в течение сорока восьми часов и выявляются световой микроскопией окрашенных гематоксилином-козином тонких срезов ткани почки, первоначально отмеченной притоком полиморфноядерных лейкоцитов (PMN). На 5 день инфекции абсцессы увеличиваются в размерах и заключают центральную популяцию стафилококков, окруженную слоем эозинофильного аморфного материала и большим скоплением PMN. Гистопатология выявила массивный некроз PMN вблизи стафилококкового очага в центре абсцессов, а также мантию здоровых фагоцитов. Также наблюдали ободок некротических PMN по периферии абсцессов, граничащих с эозинофильной псевдокапсулой, отделяющей здоровую ткань почки от инфекционного очага. Стафилококковые варианты, лишенные SpA, не могут установить гистопатологические признаки абсцессов и очищаются при инфицировании.

Как описано в настоящем документе, термины «вариант белка А», «вариант SpA», «полипептид варианта белка А» и «полипептид варианта SpA» относятся к полипептиду, включающему домен SpA IgG, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая нарушает связывание с Fc и VN3. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA включает вариант домена D, а также его варианты и фрагменты, которые не токсичны и стимулируют иммунный ответ против белка А стафилококковых бактерий и/или бактерий, экспрессирующих его.

В настоящем документе описаны варианты полипептидов SpA, которые больше не способны связываться с иммуноглобулинами, что, таким образом, устраняет токсичность, связанную с полипептидом SpA. Варианты полипептидов SpA являются не токсичными и стимулируют гуморальные иммунные ответы для защиты от стафилококковой инфекции и заболевания.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA представляет собой полноразмерный вариант SpA, содержащий вариант домена А, В, С, D и/или Е. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:60 или 61. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентична аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:54.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит фрагмент полноразмерного полипептида SpA. Фрагмент полипептида варианта SpA может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или более доменов связывания IgG. Домены связывания IgG могут, например, быть 1, 2, 3, 4, 5 или несколькими вариантными доменами A, B, C, D и/или E.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит 1, 2, 3, 4, 5 или более доменов варианта A. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит 1, 2, 3, 4, 5 или более доменов варианта B. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит 1, 2, 3, 4, 5 или более доменов варианта C. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит 1, 2, 3, 4, 5 или более доменов варианта D. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит 1, 2, 3, 4, 5 или более доменов варианта E.

Вариант домена A может, например, содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55. Вариант домена B может, например, содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56. Вариант домена C может, например, содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57. Вариантный домен D может, например, содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58. Вариантный домен E может, например, содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать вариант домена A, B, C, D и E, который может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать вариант домена A, содержащий замену в аминокислотных положениях 7, 8, 34 и/или 35 в SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать вариант домена B, содержащий замену в аминокислотных положениях 7, 8, 34 и/или 35 в SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать вариант домена C, содержащий замену в аминокислотных положениях 7, 8, 34 и/или 35 в SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать вариант домена D, содержащий замену в аминокислотных положениях 9, 10, 36 и/или 37 в SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать вариант домена E, содержащий замену в положениях аминокислот 6, 7, 33 и/или 34 в SEQ ID NO: 59. Аминокислотные замены в доменах варианта A, B, C, D и/или E описаны в WO

2011/005341.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит одну или более аминокислотных замен в IgG Fc-связывающем субдомене домена D SpA или в соответствующем положении аминокислоты в других доменах IgG. Одна или более аминокислотных замен могут нарушить или уменьшить связывание полипептида варианта SpA с Fc IgG. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA дополнительно содержит одну или более аминокислотных замен в V_{H3}-связывающем субдомене домена D SpA, или в соответствующем аминокислотном положении в других доменах IgG. Одна или более аминокислотных замен могут нарушать или уменьшать связывание с V_{H3}.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные остатки F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 и/или K35 IgG Fc-связывающего субдомена домена D SpA в SEQ ID NO: 58 модифицированы или заменены таким образом, что связывание с Fc IgG снижается или устраняется.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные остатки Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43 и/или E47 V_{H3}-связывающего субдомена домена D SpA в SEQ ID NO: 58 модифицированы или заменены таким образом, что связывание с V_{H3} снижается или устраняется.

Соответствующие модификации могут быть включены в домен A, B, C и/или E SpA. Соответствующие положения определены путем выравнивания домена D SpA с доменом A, B, C и/или E SpA для определения соответствующих остатков из домена D SpA с доменом A, B, C и/или E SpA.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит (a) одну или более аминокислотных замен в IgG Fc-связывающем субдомене домена D SpA или в соответствующем положении аминокислоты в других доменах IgG; и (b) одну или более аминокислотных замен в V_{H3}-связывающем субдомене домена D SpA, или в соответствующем положении аминокислоты в других доменах IgG. Одна или более аминокислотных замен уменьшают связывание полипептида варианта SpA с IgG Fc и V_{H3}, так что полипептид варианта SpA снижает или устраняет токсичность в организме хозяина.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доменов варианта D. Домены варианта D могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более замен или модификаций аминокислотных остатков. Замены или модификации аминокислотных остатков могут, например, происходить в аминокислотных остатках F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 и/или K35 IgG Fc-связывающего субдомена домена D SpA (SEQ ID NO:58) и/или в аминокислотных остатках Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43 и/или E47 V_{H3}-связывающего субдомена домена D SpA (SEQ ID NO: 58). В некоторых вариантах осуществления, замена или модификация аминокислотного остатка находится на аминокислотных остатках Q9 и Q10 в SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления, замена или модификация

аминокислотного остатка находится на аминокислотных остатках D36 и D37 в SEQ ID NO: 58. Аминокислотные замены в вариантах доменов А, В, С, D и/или Е описаны в WO 2011/005341, которая включена посредством ссылки в настоящий документ во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с SEQ ID NO: 72 и/или содержит фрагмент из по меньшей мере n последовательных аминокислот в SEQ ID NO:72, где n равно по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225, по меньшей мере 250, по меньшей мере 275, по меньшей мере 300, по меньшей мере 325, по меньшей мере 350, по меньшей мере 375, по меньшей мере 400 или по меньшей мере 425 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать делецию одной или нескольких аминокислот из карбокси (С)-конца (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 35 аминокислот) и/или делецию одной или более аминокислот из амино (N)-конца (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 35 аминокислот) в SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, удалены последние 35 С-концевых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, удалены первые 36 N-концевых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит аминокислоты 37-325 в SEQ ID NO:72.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA, содержащий все пять SpA Ig-связывающих доменов, расположенных от N-конца к С-концу, включает в себя в указанном порядке домен Е, домен D, домен А, домен В и домен С. В некоторых вариантах осуществления, вариант SpA содержит полипептид 1, 2, 3 или 4 природных доменов А, В, С, D и/или Е. В вариантах осуществления, в которых удалены 1, 2, 3 или 4 природных домена, полипептид варианта SpA может предотвращать чрезмерное размножение и апоптоз В-клеток, которые могут иметь место, если SpA функционирует как В-клеточный суперантиген. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит только домен А SpA. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит только домен В SpA. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит только домен С SpA. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит только домен D SpA. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит только домен Е SpA.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит

мутации по меньшей мере одного из одиннадцати (11) повторов дипептидной последовательности относительно SEQ ID NO:72 (например, дипептидный повтор QQ и/или дипептидный повтор DD). В качестве примера, вариант SpA содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, где XX дипептидные повторы в аминокислотных положениях 7 и 8, 34 и 35, 60 и 61, 68 и 69, 95 и 96, 126 и 127, 153 и 154, 184 и 185, 211 и 212, 242 и 243 и 269 и 270 могут быть мутированы для снижения аффинности полипептида варианта SpA к иммуноглобулинам. Полезные дипептидные замены для дипептида Gln-Gln (QQ) могут включать, но не ограничены ими, Lys-Lys (KK), Arg-Arg (RR), Arg-Lys (RK), Lys-Arg (KR), Ala-Ala (AA), Ser-Ser (SS), Ser-Thr (ST) и Thr-Thr (TT) дипептид. Предпочтительно, дипептид QQ заменен дипептидом KR. Полезные дипептидные замены для дипептида Asp-Asp (DD) могут включать, но не ограничены ими, Ala-Ala (AA), Lys-Lys (KK), Arg-Arg (RR), Lys-Arg (KR), His-His (HH) и Val-Val (VV) дипептид. Дипептидные замены могут, например, снижать аффинность варианта полипептида SpA к части Fc IgG человека и части Fab V_H3-содержащих В-клеточных рецепторов человека.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать SEQ ID NO:78, где один или более, предпочтительно все 11 дипептидов XX заменены аминокислотами, которые отличаются от соответствующих дипептидов в SEQ ID NO:72. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит SEQ ID NO:79, где аминокислотный дублет в положениях 60 и 61 представляет собой Lys и Arg (K и R), соответственно. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 81. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит SEQ ID NO: 75, где предпочтительным примером SEQ ID NO: 75 является SEQ ID NO:76 или SEQ ID NO:77 (SEQ ID NO:77 представляет собой SEQ ID NO:76 с N-концевым метионином).

В некоторых вариантах осуществления, N-конец полипептида варианта SpA может содержать делецию первых 36 аминокислот в SEQ ID NO:72, и C-конец может содержать делецию последних 35 аминокислот в SEQ ID NO:72. Полипептид варианта SpA, содержащий N-концевую делецию 36 аминокислот в SEQ ID NO:72 и C-концевую делецию 35 аминокислот в SEQ ID NO:72, может дополнительно содержать делецию пятого Ig-связывающего домена (т.е., ниже Lys-327 в SEQ ID NO: 72). Этот вариант SpA может содержать аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 73, где дипептиды XX могут быть заменены аминокислотами, так что аминокислоты отличаются от соответствующих дипептидных последовательностей в SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления, как указано выше, полипептид варианта SpA может содержать 1, 2, 3 или 4 природных домена A, B, C, D и/или E, например, содержать только домен E SpA, но не D, A, B или C. Таким образом, полипептид варианта SpA может содержать домен E варианта SpA, где домен E SpA содержит замену по меньшей мере в одной аминокислоте в SEQ ID NO: 83. Замена может, например,

находиться в аминокислотных положениях 60 и 61 в SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82 с по меньшей мере одной аминокислотной заменой. Полипептиды варианта SpA описаны в WO 2015/144653, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит аминокислотную замену в аминокислотах 43Q, 44Q, 96Q, 97Q, 162Q, 163Q, 220Q, 221Q, 278Q и 279Q в SEQ ID NO: 84. Аминокислотная замена в аминокислотах 43Q, 44Q, 96Q, 97Q, 162Q, 163Q, 220Q, 221Q, 278Q и 279Q в SEQ ID NO: 84 может, например, представлять собой лизин (K) или аргинин (R). В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит аминокислотную замену на аминокислотах 70D, 71D, 131D, 132D, 189D, 190D, 247D, 248D, 305D и 306D в SEQ ID NO: 84. Аминокислотная замена на аминокислотах 70D, 71D, 131D, 132D, 189D, 190D, 247D, 248D, 305D и 306D в SEQ ID NO: 84 могут, например, представлять собой замену аланином (A) или валином (V). В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может быть выбран из SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 88. Варианты полипептидов SpA описаны в US 2016/0304566, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, вариант домена A может, например, содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 62 или 67. Вариант домена B может, например, содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 63 или 68. Вариант домена C может, например, содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 64 или 69. Вариант домена D может, например, содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 66 или 71. Вариант домена E может, например, содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 65 или 70.

В предпочтительном варианте осуществления, вариант домена A может, например, содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 62. Вариант домена B может, например, содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 63. Вариант домена C может, например, содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 64. Вариант домена D может, например, содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 66. Вариант домена E может, например, содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать вариант домена A, B, C, D и E, который может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к

SEQ ID NO: 62 или 67, SEQ ID NO: 63 или 68, SEQ ID NO: 64 или 69, SEQ ID NO: 66 или 71 и SEQ ID NO: 65 или 70, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA может содержать вариант домена D, содержащий замену в аминокислотных положениях 9, 10 и/или 33 в SEQ ID NO:58.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит (i) замены лизина на глутаминовые аминокислотные остатки в каждом из доменов A-E SpA, соответствующие положениям 9 и 10 домена D SpA (SEQ ID NO: 58); и (ii) замену глутамата на сериновый аминокислотный остаток в каждом из доменов A-E SpA, соответствующую положению 33 домена D SpA (SEQ ID NO: 58). Полипептид варианта SpA, по сравнению с отрицательным контролем, не дает определяемой перекрестной связи IgG и IgE в крови и/или не активирует базофилы. Из-за отсутствия определяемого перекрестного связывания IgG и IgE в крови и/или активации базофилов, считается, что полипептид варианта SpA не представляет значительной проблемы безопасности или токсичности для пациентов-людей или не представляет значительного риска анафилактического шока у пациента-человека.

В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания K_A для V_{H3} из IgG человека снижена по сравнению с вариантным полипептидом SpA (SpA_{KKAA}), состоящим из лизиновых замен для глутаминовых остатков в каждом из доменов A-E SpA, соответствующих положениям 9 и 10 домена D SpA (SEQ ID NO: 58) и аланиновых замен для аспарагиновой кислоты в доменах A-E SpA, соответствующих положениям 36 и 37 домена D SpA (SEQ ID NO: 58). Полипептид варианта SpA, состоящий из лизиновых замен для глутаминовых остатков в каждом из доменов A-E, соответствующих положениям 9 и 10 в домене D, и аланиновой замены для аспарагиновой кислоты в доменах A-E, соответствующей положениям 36 и 37 домена D, используется в качестве компаратора и называется SpA_{KKAA} . Полипептид варианта SpA_{KKAA} имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A с V_{H3} формой IgG человека, которая снижена по меньшей мере в два раза (в 2 раза) по сравнению с SpA_{KKAA} . В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A с V_{H3} IgG человека, которая снижена по меньшей мере в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3 раза или более, или любое промежуточное значение, по сравнению с SpA_{KKAA} . В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A с V_{H3} IgG человека, которая снижена по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300% или более, или любое промежуточное значение, по сравнению со SpA_{KKAA} . В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A с V_{H3} IgG человека менее примерно 1×10^5 M^{-1} . В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA имеет аффинность

связывания K_A с V_{H3} IgG человека менее примерно 3, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или $0,1 \times 10^5 M^{-1}$ или любое промежуточное значение. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA не имеет замен ни в одном из доменов A-E SpA, соответствующих положениям 36 и 37 домена D SpA (SEQ ID NO: 58). В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA по настоящему изобретению содержит SEQ ID NO: 66 или 71. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA по настоящему изобретению содержит SEQ ID NO: 60 или 61. В предпочтительном варианте осуществления, полипептид варианта SpA по изобретению содержит SEQ ID NO:60.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит (i) лизиновые замены для глутаминовых аминокислотных остатков в каждом из доменов A-E SpA, соответствующих положениям 9 и 10 домена D SpA (SEQ ID NO: 58), и (ii) треониновую замену для серинового аминокислотного остатка в каждом из доменов A-E SpA, соответствующую положению 33 домена D SpA (SEQ ID NO: 58). Полипептид варианта SpA, по сравнению с отрицательным контролем, не дает определяемой перекрестной связи IgG и IgE в крови и/или не активирует базофилы. Из-за отсутствия определяемого перекрестного связывания IgG и IgE в крови и/или активации базофилов, считается, что полипептид варианта SpA не представляет значительной проблемы безопасности или токсичности для пациентов-людей или не представляет значительного риска анафилактического шока у пациента-человека.

В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания K_A для V_{H3} из IgG человека снижена по сравнению с вариантным полипептидом SpA (SpA_{KKAA}), состоящим из лизиновых замен для глутаминовых остатков в каждом из доменов A-E SpA, соответствующих положениям 9 и 10 домена D SpA (SEQ ID NO: 58) и аланиновых замен для аспарагиновой кислоты в доменах A-E SpA, соответствующих положениям 36 и 37 домена D SpA (SEQ ID NO: 58). В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A с V_{H3} формой IgG человека, которая снижена по меньшей мере в два раза (в 2 раза) по сравнению с SpA_{KKAA} . В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A с V_{H3} IgG человека, которая снижена по меньшей мере в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3 раза или более, или любое промежуточное значение, по сравнению с SpA_{KKAA} . В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A с V_{H3} IgG человека, которая снижена по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300% или более, или любое промежуточное значение, по сравнению со SpA_{KKAA} . В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A с V_{H3} IgG человека менее примерно $1 \times 10^5 M^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A с V_{H3} IgG человека менее

примерно 3, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или $0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ или любое промежуточное значение. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA не имеет замен ни в одном из доменов A-E SpA, соответствующих положениям 36 и 37 домена D SpA (SEQ ID NO: 58). В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA по настоящему изобретению содержит SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит одну или более аминокислотных замен в IgG Fc-связывающем субдоме домена D SpA или в соответствующем аминокислотном положении в других доменах IgG. Одна или более аминокислотных замен могут нарушить или уменьшить связывание полипептида варианта SpA с Fc IgG. В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA дополнительно содержит одну или более аминокислотных замен в V_{H3} -связывающем субдоме домена D SpA, или в соответствующем аминокислотном положении в других доменах IgG. Одна или более аминокислотных замен могут нарушать или уменьшать связывание с V_{H3} .

Соответствующие модификации могут быть включены в A, B, C и/или E домен SpA. Соответствующие положения определяются путем выравнивания домена D SpA с доменом A, B, C и/или E SpA для определения соответствующих остатков из домена D SpA с доменом A, B, C и/или E SpA.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA содержит (a) одну или более аминокислотных замен в Fc-связывающем субдоме IgG домена D SpA или в соответствующем положении аминокислоты в других доменах IgG; и (b) одну или более аминокислотных замен в V_{H3} -связывающем субдоме домена D SpA, или в соответствующем положении аминокислоты в других доменах IgG. Одна или более аминокислотных замен уменьшают связывание полипептида варианта SpA с IgG Fc и V_{H3} , так что полипептид варианта SpA снижает или устраняет токсичность в организме хозяина.

Дополнительные пептиды *Staphylococcus*

В некоторых вариантах осуществления, иммуногенная композиция, содержащая полипептид варианта белка A (SpA) *Staphylococcus aureus* и/или мутантный полипептид стафилококковой субъединицы лейкоцидина (например, стафилококковый полипептид LukA, стафилококковый полипептид LukB и/или стафилококковый димерный полипептид LukAB), как описано в настоящем документе, дополнительно содержит по меньшей мере один или более стафилококковых антигенов или их иммуногенных фрагментов, выбранных из группы, состоящей из CP5, CP8, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, EsxAB(слияние), SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB, Coa, Hla (например, мутантов H35 или H35L/H48L), mHla, MntC, rTSST-1, rTSST-1v, SasF, vWbp и vWh. Дополнительные стафилококковые антигены, которые могут быть включены в иммуногенную композицию, могут включать, но не ограничены ими, витронектин-связывающий белок (WO2001/60852), Aaa (GenBank CAC80837), Aap (GenBank

AJ249487), Ant (GenBank NP_372518), аутолизинглюкозаминидазу, аутолизинамидазу, Can, коллаген-связывающий белок (US6,288,214), Csa1A, EFB (FIB), эластин-связывающий белок (EbpS), EPB, FbpA, фибриноген-связывающий белок (US6,008,341), фибронектин-связывающий белок (US5,840,846), FhuD, FhuD2, FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, иммунодоминантный транспортер ABC, IsaA/PisA, рецептор ламинина, липазу GehD, MAP, транспортер Mg²⁺, аналог МНС II (US 5,648,240), MRPII, NPase, РНК III активирующий белок (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 2000/12689), SdrG (WO 2000/12689), SdrH (WO 2000/12689), экзотоксины SEA (WO 2000/02523), экзотоксины SEB (WO 2000/02523)), mSEB, транспортер SitC и Ni ABC, SitC/MntC/слюна-связывающий белок (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2, Spa5 (US2016/0304566), SpA_{ККАА} (WO2011/005341, WO2015/144653, WO 2015/144691), SpAkR (WO2015/144653), Sta006 и/или Sta011.

Дополнительные стафилококковые антигены, которые могут быть включены в иммуногенную композицию, могут включать, но не ограничены ими, мутантную субъединицу LukS-PV, субъединицу LukF-PV, мутантный гамма гемолизин А, мутантный гамма гемолизин В, мутантный гамма гемолизин (Hlg), лейкоцидины Пантона-Валентайна (PVL), димеры LukE, LukD, LukED или любую их комбинацию.

Вирулентные инкапсулированные штаммы *S. aureus* несут капсулу полисахарида типа 5 (CP5) или типа 8 (CP8) (O'Riordan and Lee, Clin. Microbiol. Rev. 17(1):218-34 (2004) PMID: 14726462). Вакцины на основе стафилококкового CP вырабатывают антитела, которые способствуют опсонофагоцитарному уничтожению (ОПК) *S. aureus* (Karakawa et al., Infect. Immun. 56(5):1090-5 (1988) PMID: 3356460), и было показано, что иммунизация защищает экспериментальных животных от стафилококковой бактериемии, летальности, мастита, остеомиелита и эндокардита (Cheng et al., Human Vaccines & Immunother. 13(7):1609-14 (2017); Kuipers et al., Micro. 162(7): 1185-94 (2016). CP5 и CP8 состоят из повторов очень похожих трисахаридов, которые различаются только связью между их моносахаридами и О-ацетилированием. Иммуный ответ против CP5 и CP8 считается серотип-специфичным. Однако, было выдвинуто предположение, что CP8-индуцированные антитела могут быть перекрестно-реактивными против штаммов CP5, тогда как CP5-индуцированные антитела являются серотип-специфичными (Park et al., Infect. Immun. 82(12):5049-55 (2014) PMID: 25245803). Капсульные полисахариды являются Т-независимыми иммуногенами и обладают слабой иммуногенностью. Для повышения иммуногенности капсульного полисахарида, он должен быть химически или ферментативно ковалентным (или связанным через высокоаффинные не ковалентные связи) с белком-носителем для получения искусственного гликопротеина или гликоконъюгата (Fattom et al., Infect. Immun. 61(3):1023-32 (1993) PMID: 8432585). Путем конъюгации будет образован гликоконъюгат, состоящий из капсульного полисахарида и белка-носителя, такого как, но не ограничиваясь ими, CRM197. CRM197 представляет собой нетоксичный мутант дифтерийного токсина, имеющий одну аминокислотную замену глутаминовой кислоты на глицин. CRM197 является четко определенным белком и

функционирует как носитель полисахаридов и гаптен, делая их иммуногенными. Он используется в качестве белка-носителя во множестве одобренных конъюгированных вакцин для таких заболеваний, как менингит и пневмококковые бактериальные инфекции. CP5 и CP8 могут быть получены в виде нативного антигена из биомассы *S. aureus* или могут быть химически синтезированы. Могут использоваться другие белки-носители помимо CRM197. Пример CRM197 не считается ограничивающим.

Дополнительный стафилококковый антиген можно вводить одновременно с вариантным полипептидом белка А (SpA) *S. aureus* и/или мутантным полипептидом субъединицы стафилококкового лейкоцидина (например, стафилококковым полипептидом LukA, стафилококковым полипептидом LukB и/или стафилококковым димерным полипептидом LukAB). Стафилококковый антиген можно вводить с вариантным полипептидом белка А (SpA) *S. aureus* и/или мутантным полипептидом субъединицы стафилококкового лейкоцидина (например, стафилококковым полипептидом LukA, стафилококковым полипептидом LukB и/или стафилококковым димерным полипептидом LukAB) в одной той же иммуногенной композиции.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид варианта SpA и/или мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат гетерологическую аминокислотную последовательность. Гетерологическая аминокислотная последовательность может, например, кодировать пептид, выбранный из группы, состоящей из His-метки, убиквитиновой метки, метки NusA, хитин-связывающего домена, В-метки, HSB-метки, зеленого флуоресцентного белка (GFP), кальмодулин-связывающего белка (CBP), галактоза-связывающего белка, мальтоза-связывающего белка (MBP) целлюлоза-связывающих доменов, авидин/стрептавидин/Strep-метка, trpE, хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT), lacZ(β -галактозидазы), FLAGTM пептида, S-метки, T7-метки, их фрагмента гетерологичной аминокислотной последовательности и комбинация двух или нескольких указанных гетерологичных аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная аминокислотная последовательность кодирует иммуноген, Т-клеточный эпитоп, В-клеточный эпитоп, его фрагмент гетерологичной аминокислотной последовательности и комбинацию двух или нескольких указанных гетерологичных аминокислотных последовательностей.

В другом общем аспекте, изобретение относится к одной или нескольким выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим полипептиды вариантов белка А (SpA) *S. aureus* и/или полипептиды мутантных стафилококковых субъединиц лейкоцидина (например, стафилококковому полипептиду LukA, стафилококковому полипептиду LukB и/или стафилококковому димерному полипептиду LukAB) по изобретению. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, заменена, удалена, вставлена и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот,

кодирующие полипептиды по изобретению, могут быть изменены без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему одну или более выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид варианта белка А (SpA) *S. aureus* и мутантный полипептид стафилококковой субъединицы лейкоцидина (например, стафилококковый полипептид LukA, стафилококковый полипептид LukB, и/или стафилококковый димерный полипептид LukAB) по изобретению. Термин «вектор», используемый в данном документе, относится, например, к любой из ряда нуклеиновых кислот, в которые может быть вставлена желаемая последовательность, например, путем рестрикции и лигирования, для транспорта между различными генетическими средами или для экспрессии в клетке-хозяине. Векторы нуклеиновых кислот могут быть ДНК или РНК. Векторы включают, но не ограничены ими, плазмиды, фаги, фагемиды, бактериальные геномы и вирусные геномы. Клонированным вектором является такой, который способен реплицироваться в клетке-хозяине, и который дополнительно характеризуется одним или несколькими сайтами эндонуклеазной рестрикции, по которым вектор можно разрезать определяемым образом, и в котором желаемая ДНК последовательность может быть лигирована таким образом, чтобы новый рекомбинантный вектор сохранял свою способность к репликации в клетке-хозяине. В случае плазмид, репликация желаемой последовательности может происходить много раз по мере увеличения числа копий плазмиды в бактерии-хозяине или только один раз на одного хозяина до того, как хозяин размножится путем митоза. В случае фага, репликация может происходить активно во время литической фазы, или пассивно во время лизогенной фазы. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены. Другие векторы интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина.

Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники, в связи с настоящим изобретением, такой как плазида, космоида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как плазида. Вектор может включать любой элемент для установления обычной функции вектора экспрессии, например, промотор, рибосома-связывающий элемент, терминатор, энхансер, маркер селекции и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцируемым или репрессируемым промотором. В данной области известно множество векторов экспрессии, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, и их можно использовать в данном документе для получения слитого пептида в клетке. Для создания рекомбинантного экспрессионного вектора можно использовать обычные методы клонирования или синтеза искусственных генов, согласно вариантам осуществления изобретения.

После выбора вектора экспрессии, описанный в настоящем документе полинуклеотид можно клонировать ниже промотора, например, в области полилинкера.

Вектор трансформируют в соответствующий бактериальный штамм, и получают ДНК с использованием стандартных методов. Ориентацию и ДНК последовательность полипептида, а также другие элементы, включенные в вектор, подтверждают с использованием рестрикционного картирования, анализа последовательности ДНК и/или ПЦР анализа. Бактериальные клетки, содержащие правильный вектор, можно хранить в виде банков клеток.

В другом общем аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей одну или более выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид варианта белка А (SpA) *S. aureus* и/или мутантный полипептид стафилококковой субъединицы лейкоцидина (например, стафилококковый полипептид LukA, стафилококковый полипептид LukB и/или стафилококковый димерный полипептид LukAB) по изобретению, или вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид варианта белка А (SpA) *S. aureus*, и/или мутантный полипептид стафилококковой субъединицы лейкоцидина (например, стафилококковый полипептид LukA, стафилококковый полипептид LukB и/или стафилококковый димерный полипептид LukAB) по изобретению. Любая клетка-хозяин, известная специалистам в данной области техники, может быть использована для рекомбинантной экспрессии мутантных полипептидов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TG1 или BL21, клетки CHO-DG44 или CHO-K1 или клетки HEK293. Согласно конкретным вариантам осуществления, рекомбинантный вектор экспрессии трансформируют в клетки-хозяева обычными способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрируется в геном клетки-хозяина, так что рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессируется.

Клетки-хозяева генетически сконструированы (инфицированы, трансдуцированы, трансформированы или трансфицированы) векторами по настоящему изобретению. Таким образом, один аспект изобретения относится к клетке-хозяину, содержащей вектор, который содержит полинуклеотид, как описано в настоящем документе. Сконструированная клетка-хозяин может быть культивирована в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для активации промоторов, отбора трансформантов или амплификации полинуклеотидов. Условия культивирования, такие как температура, pH и подобные, являются теми, которые ранее использовались с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны обычному специалисту в данной области техники. Термин «трансфекция», как он используется в данном документе, относится к любой процедуре, с помощью которой эукариотические клетки индуцируют принимать и включать в свой геном выделенную ДНК, включая, но не ограничиваясь ими, ДНК в форме плазмиды. Термин «трансформация», как используется в данном документе, относится к любой процедуре, с помощью которой бактериальные клетки индуцируются к принятию и включению ДНК, выделенной из их генома, включая, но не ограничиваясь ими, ДНК в форме плазмиды.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения полипептида варианта белка А (SpA) *S. aureus* и мутантного полипептида субъединицы стафилококкового лейкоцидина (например, стафилококкового полипептида LukA, стафилококкового полипептида LukB и/или стафилококкового димерного полипептида LukAB) по изобретению, включающему культивирование клеточного полипептида, содержащего одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид варианта белка А (SpA) *S. aureus* и мутантный полипептид стафилококковой субъединицы лейкоцидина (например, стафилококковый полипептид LukA, стафилококковый полипептид LukB, и/или стафилококковый димерный полипептид LukAB) в условиях, обеспечивающих продуцирование полипептида варианта белка А (SpA) *S. aureus* и мутантного полипептида стафилококкового лейкоцидина по изобретению, и выделение полипептида из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные полипептиды можно собирать из клеток и очищать в соответствии с обычными методами, известными в данной области техники, и как описано в настоящем документе.

Иммуногенные композиции

В другом общем аспекте, изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей вариантный полипептид белка А (SpA) *S. aureus* и мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина, включающий (например, стафилококковый полипептид LukA, стафилококковый полипептид LukB и/или стафилококковый димерный полипептид LukAB) по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Термин «иммуногенная композиция» относится к любой фармацевтической композиции, содержащей антиген, например, микроорганизм или его компонент, которую можно использовать для индукции иммунного ответа у субъекта. Выделенные полипептиды вариантов белка А (SpA) *S. aureus* и выделенные мутантные полипептиды субъединиц стафилококкового лейкоцидина (например, стафилококковый полипептид LukA, стафилококковый полипептид LukB и/или стафилококковый димерный полипептид LukAB) по изобретению, и содержащие их композиции также применяют при производстве лекарственного средства для терапевтического применения, упомянутого в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, липидсодержащей везикуле, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники для использования в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к не токсичному материалу, который не вмешивается в эффективность композиции по изобретению или биологическую активность композиции по изобретению. Согласно конкретным вариантам осуществления, принимая во внимание

настоящее описание, любой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для применения в полипептидной фармацевтической композиции, можно использовать в изобретении.

Состав фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известен в данной области техники, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21 издание (2005 г.) и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или более фармацевтически приемлемых носителей могут быть использованы при составлении фармацевтических композиций по изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может включать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и подобные. Водный состав обычно содержит по меньшей мере 50% масс./масс. воды или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или по меньшей мере 95% масс./масс. воды.

В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция может быть составлена в виде инъекционного препарата, который можно вводить, например, с помощью инъекционного устройства (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекцию можно вводить подкожно, внутримышечно, внутривенно, интравитреально или внутривенно, например.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой твердую композицию, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть, или где врач или пациент перед применением добавляют растворители и/или разбавители. Твердые дозированные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки и/или таблетки с покрытием, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция также может быть в форме саше, драже, порошков, гранул, пастилок, или порошков для восстановления, например.

Дозированные формы могут быть с немедленным высвобождением, и в этом случае они могут включать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут быть с отсроченным высвобождением, пролонгированным высвобождением или модифицированным высвобождением, и в этом случае они могут содержать водонерастворимые полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

В других вариантах осуществления, фармацевтическая композиция может быть доставлена интраназально, интрабуккально, сублингвально или внутрикожно.

pH в водном составе может быть между pH 3 и pH 10. В одном варианте осуществления изобретения, pH композиции составляет от примерно 7,0 до примерно 9,5.

В другом варианте осуществления изобретения, рН композиции составляет от примерно 3,0 до примерно 7,0.

Адьювант

Используемый в настоящем документе термин «адьювант» относится к соединению, которое при введении в сочетании с композицией по настоящему изобретению или как ее часть усиливает, улучшает и/или стимулирует иммунный ответ на полипептиды LukA, полипептиды LukB, димерные полипептиды LukAB и/или полипептиды варианта SpA, но когда адьювантное соединение вводят отдельно, оно не вызывает иммунного ответа на полипептиды LukA, полипептиды LukB, димерные полипептиды LukAB и/или полипептиды варианта SpA. Адьюванты могут усиливать иммунный ответ несколькими механизмами, включая, например, рекрутинг лимфоцитов, стимуляцию В- и/или Т-клеток и стимуляцию антигенпрезентирующих клеток.

Комбинации вакцин по изобретению (например, иммуногенные композиции, содержащие полипептиды LukA, полипептиды LukB, димерные полипептиды LukAB, полипептиды варианта SpA и/или полинуклеотиды, ДНК или РНК, или кодирующие их вирусные векторы) содержат или вводятся в комбинации с адьювантом. Адьювант для введения в комбинации с иммуногенной композицией по изобретению можно вводить до, одновременно с или после введения иммуногенной композиции.

Конкретные примеры адьювантов включают, но не ограничены ими, соли алюминия (квасцы) (такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия и оксид алюминия, включая наночастицы, содержащие составы квасцов или наноквасцов), фосфат кальция (например, Masson JD et al, 2017, Expert Rev Vaccines 16: 289-299), монофосфорил липид А (MPL) или 3-де-О-ацилированный монофосфорил липид А (3D-MPL) (см., например, патент Великобритании GB2220211, EP0971739, EP1194166, US6491919), AS01, AS02, AS03 и AS04 (все GlaxoSmithKline; см., например, EP1126876, US7357936 для AS04, EP0671948, EP0761231, US5750110 для AS02), соединения имидазопиридина (см. WO2007/109812), соединения имидазохиноксалина (см. WO2007/109813), дельта-инулин (например, Petrovsky N and PD Cooper, 2015, Vaccine 33: 5920-5926), STING-активирующие синтетические циклические динуклеотиды (например, US20150056224), комбинации гомополимеров лецитина и карбомера (например, US6676958) и сапонины, такие как Quil A и QS21 (см., например, Zhu D and W Tuo, 2016, Nat Prod Chem Res 3: e113 (doi:10.4172/2329-6836.1000e113), необязательно в комбинации с QS7 (см. Kensil et al., in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5,057,540). В некоторых вариантах осуществления, адьювант представляет собой адьювант Фрейнда (полный или неполный). В некоторых вариантах осуществления, адьювант содержит Quil-A, такой как, например, коммерчески доступный от Brenntag (теперь Croda) или Invivogen. QuilA содержит экстрагируемую водой фракцию сапонинов из дерева *Quillaja saponaria* Molina. Эти сапонины принадлежат к группе тритерпеноидных сапонинов, которые имеют общую структуру тритерпеноидного остова. Известно, что сапонины вызывают сильный адьювантный ответ

на Т-зависимые, а также Т-независимые антигены, а также сильные цитотоксические CD8⁺ лимфоцитарные ответы, и потенцируют ответ на антигены слизистой оболочки. Они также могут сочетаться с холестерином и фосфолипидами с образованием иммуностимулирующих комплексов (ISCOM), в которых адъювант QuilA может активировать как антитело-опосредованные, так и клеточно-опосредованные иммунные ответы на широкий спектр антигенов различного происхождения. В некоторых вариантах осуществления, адъювант представляет собой ASO1, например ASO1_B. ASO1 представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL (3-О-дезацил-4'-монофосфорил липид А), QS21 (*Quillaja saponaria* Molina, фракция 21) и липосомы. В некоторых вариантах осуществления, ASO1 коммерчески доступен (GSK) или может быть получен, как описано в WO 96/33739, включенной в настоящий документ в качестве ссылки. Некоторые адъюванты содержат эмульсии, которые представляют собой смеси двух несмешивающихся жидкостей, например, масла и воды, одна из которых суспендирована в виде мелких капель внутри другой и стабилизирована поверхностно-активными веществами. Эмульсии масло-в-воде содержат воду, образующую непрерывную фазу, окружающую небольшие капли масла, в то время как эмульсии вода-в-масле содержат масло, образующее непрерывную фазу. Некоторые эмульсии масло-в-воде содержат сквален (метаболизируемое масло). Некоторые адъюванты содержат блок-сополимеры, которые представляют собой сополимеры, образованные при взаимодействии двух мономеров, сгруппированных вместе, и образуют блоки повторяющихся единиц. Примером эмульсии вода-в-масле, содержащей блок сополимера, сквален и стабилизатор в виде микрочастиц, является TiterMax®, которая может быть коммерчески получена от Sigma-Aldrich. Необязательно, эмульсии могут быть объединены с или содержать дополнительные иммуностимулирующие компоненты, такие как агонист TLR4. Некоторыми адъювантами являются эмульсии масло-в-воде (такие как сквален или арахисовое масло), также используемые в MF59 (см., например, EP0399843, US 6299884, US6451325) и AS03, необязательно в комбинации с иммуностимуляторами, такими как монофосфорил липид А и/или QS21, таким как AS02 (см. Stoute et al., 1997, N. Engl. J. Med. 336, 86-91). Дополнительными примерами адъювантов являются липосомы, содержащие иммуностимуляторы, такие как MPL и QS21, такие как AS01E и AS01B (например, US 2011/0206758). Другими примерами адъювантов являются CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998) и имидазохинолины (такие как имихимод и R848). См., например, Reed G, et al., 2013, Nature Med, 19: 1597-1608. В предлагаемых вариантах осуществления по изобретению, адъювант представляет собой адъювант Th1.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, адъювант содержит сапонины, предпочтительно экстрагируемую водой фракцию сапонинов, полученных из *Quillaja saponaria*. В некоторых вариантах осуществления, адъювант содержит QS-21.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, адъювант содержит агонист толл-подобного рецептора 4 (TLR4). Агонисты TLR4 хорошо известны в данной области техники, см., например, Ireton GC and SG Reed, 2013, Expert Rev Vaccines 12: 793-

807. В определенных предпочтительных вариантах осуществления, адъювант представляет собой агонист TLR4, содержащий липид А или его аналог или производное.

Адъювант, предпочтительно включающий агонист TLR4, может быть составлен различными способами, например, в виде эмульсий, таких как эмульсии вода-в-масле (в/м) или эмульсии масло-в-воде (м/в) (примерами являются MF59, AS03), стабильные (нано-)эмульсии (SE), липидные суспензии, липосомы, (полимерные) наночастицы, виросомы, адсорбированные квасцы, водные составы (AF) и подобные, представляющие собой различные системы доставки для иммуномодулирующих молекул в адъюванте и/или для иммуногенов (см., например, Reed et al., 2013, выше; Alving CR et al., 2012, *Curr Opin Immunol* 24: 310-315).

Иммуностимулирующий агонист TLR4 можно необязательно комбинировать с другими иммуномодулирующими компонентами, такими как сапонины (например, QuilA, QS7, QS21, Matrix M, Iscoms, Iscomatrix и т. д.), соли алюминия, активаторы других TLR (например, имидазохинолины, флагеллин, аналоги дцРНК, агонисты TLR9, такие как CpG и т.д.) и подобные (см., например, Reed et al., 2013, выше).

Используемый в настоящем документе термин «липид А» относится к гидрофобной липидной части молекулы LPS, которая содержит глюкозамин и связана с кето-дезоксиктулозонатом во внутреннем ядре молекулы LPS посредством кетозидной связи, которая закрепляет молекулу LPS в наружном листке наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Для обзора синтеза LPS и структур липида А см., например, Raetz, 1993, *J. Bacteriology* 175:5745-5753, Raetz CR and C. Whitfield, 2002, *Annu Rev Biochem* 71: 635-700, US 5,593,969 и US 5,191,072. Липид А, используемый в настоящем документе, включает встречающийся в природе липид А, его смеси, аналоги, производные и предшественники. Термин включает моносахариды, например, предшественник липида А, упоминаемый как как липид X; дисахаридный липид А; гептаациловый липид А; гексаациловый липид А; пентаациловый липид А; тетраациловый липид А, например, тетраациловый предшественник липида А, называемый липидом IVA; дефосфорилированный липид А; монофосфорильный липид А; дифосфорильный липид А, такой как липид А из *Escherichia coli* и *Rhodobacter sphaeroides*. Некоторые иммуноактивирующие структуры липида А содержат 6 ацильных цепей. Четыре первичные ацильные цепи, присоединенные непосредственно к глюкозаминовым сахарам, представляют собой 3-гидроксиацильные цепи, обычно длиной от 10 до 16 атомов углерода. Две дополнительные ацильные цепи часто присоединены к 3-гидрокси группам первичных ацильных цепей. Липид А *E. coli*, например, обычно имеет четыре C14 3-гидроксиацильные цепи, присоединенные к сахарам, и одну C12 и одну C14, присоединенные к 3-гидрокси группам первичных ацильных цепей в положениях 2' и 3', соответственно.

Используемый в настоящем документе термин «аналог или производное липида А» относится к молекуле, которая по структуре и иммунологической активности напоминает липид А, но которая не обязательно встречается в природе. Аналоги или производные

липида А можно модифицировать, например, чтобы они были укорочены или конденсированы, и/или чтобы их глюкозаминовые остатки были заменены другим остатком аминного сахара, например, галактозаминовыми остатками, чтобы содержать 2-дезоксид-2-аминоглюконат вместо глюкозамин-1-фосфата на восстанавливаемом конце, чтобы нести группу галактуроновой кислоты вместо фосфата в положении 4'. Аналоги или производные липида А могут быть получены из липида А, выделенного из бактерии, например, путем химического получения, или синтезированного химическим путем, например сначала определяя структуру предпочтительного липида А и синтезируя его аналоги или производные. Аналоги или производные липида А также можно использовать в качестве адъювантов агонистов TLR4 (см., например, Gregg KA et al, 2017, MBio 8, eDD492-17, doi: 10.1128/mBio.00492-17).

Например, аналог или производное липида А можно получить путем деацилирования молекулы липида А дикого типа, например, обработкой щелочью. Аналоги или производные липида А можно получить, например, из липида А, выделенного из бактерий. Такие молекулы также могут быть химически синтезированы. Другим примером аналогов или производных липида А являются молекулы липида А, выделенные из бактериальных клеток, несущих мутации, делеции или вставки ферментов, участвующих в биосинтезе липида А и/или модификации липида А.

MPL и 3D-MPL представляют собой аналоги или производные липида А, которые были модифицированы для снижения токсичности липида А. Липид А, MPL и 3D-MPL имеют сахарный остов, к которому присоединены длинные цепи жирных кислот, где остов содержит два 6-углеродных сахара в гликозидной связи, и фосфорильную группу в положении 4. Обычно к основной цепи сахара присоединены от пяти до восьми длинноцепочечных жирных кислот (обычно 12-14 атомов углерода). Благодаря дериватизации из природных источников, MPL или 3D-MPL могут присутствовать в виде композита или смеси ряда шаблонов замещения жирных кислот, например, гептаацила, гексаацила, пентаацила и т. д., с различной длиной жирных кислот. Это также верно для некоторых других аналогов или производных липида А, описанных в настоящем документе, однако синтетические варианты липида А также могут быть определены и гомогенны. MPL и его производство, например, описаны в US 4,436,727. 3D-MPL, например, описан в US 4,912,094B1 и отличается от MPL селективным удалением 3-гидроксимиристинового ацильного остатка, который связан сложным эфиром с глюкозамином на восстанавливаемом конце в положении 3 (сравните, например, структуру MPL в столбце 1 и 3D-MPL в столбце 6 US 4,912,094B1). В данной области техники часто используется 3D-MPL, хотя иногда упоминается как MPL (например, первая структура в Таблице 1 Ireton GC and SG Reed, 2013, см. выше, называет эту структуру MPL®, но фактически изображает структуру 3D-MPL).

Примеры липида А (аналогов, производных) по изобретению включают MPL, 3D-MPL, RC529 (например, EP1385541), PET-липид А, GLA (адъювант гликопиранозиллипида, синтетический дисахарид гликолипид; например, US20100310602,

US8722064), SLA (например, Carter D et al, 2016, Clin. Transl. Immunology. 5: e108 (doi: 10.1038/cti.2016.63), в котором описан структурно-функциональный подход к оптимизации лигандов TLR4 для вакцин для человека), PHAD (фосфорилированный гексаацилдисахарид; структура которого такая же, как у GLA), 3D-PHAD, 3D-(6-ацил)-PHAD (3D(6A)-PHAD) (PHAD, 3D-PHAD и 3D(6A)PHAD представляют собой варианты синтетического липида А, см., например, avantilipids.com/divisions/adjuvants, где также представлены структуры этих молекул), E6020 (номер CAS 287180-63-6), ONO4007, OM-174 и подобные. Примеры химических структур 3D-MPL, RC529, PET-липиды А, GLA/PHAD, E6020, ONO4007 и OM-174, представлены, например, в Таблице 1 в Ireton GC and SG Reed, 2013, см. выше. Структуру SLA см., например, на фиг. 1 в Reed SG et al, 2016, Curr. Opin. Immunol. 41:85-90. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, адъювант агониста TLR4 содержит аналог или производное липида А, выбранное из 3D-MPL, GLA или SLA. В некоторых вариантах осуществления, аналог или производное липида А составляют в липосомах.

Примеры адъювантов, содержащих аналог или производное липида А, включают GLA-LSQ (синтетический MPL [GLA], QS21, липиды, составленные в виде липосом), SLA-LSQ (синтетический MPL [SLA], QS21, липиды, составленные в виде липосом), GLA-SE (синтетический MPL [GLA], скваленовая эмульсия масло/вода), SLA-SE (синтетический MPL [SLA], скваленовая эмульсия масло/вода), SLA-Наноквасцы (синтетический MPL [SLA], соль алюминия), GLA-Наноквасцы (синтетический MPL [GLA], соль алюминия), SLA-AF (синтетический MPL [SLA], водная суспензия), GLA-AF (синтетический MPL [GLA], водная суспензия), SLA-квасцы (синтетический MPL [SLA], соль алюминия), GLA-квасцы (синтетический MPL [GLA], соль алюминия) и несколько адъювантов серии GSK ASxx, включая AS01 (MPL, QS21, липосомы), AS02 (MPL, QS21, эмульсия масло/вода), AS25 (MPL, эмульсия масло/вода), AS04 (MPL, соль алюминия) и AS15 (MPL, QS21, CpG, липосомы). См., например, WO2008/153541; WO2010/141861; WO2013/119856; WO2019/051149; WO 2013/119856; WO 2006/116423; US 4,987,237; U.S. 4,436,727; US 4,877,611; US 4,866,034; US 4,912,094; US 4,987,237; US5,191,072; US5,593,969; US 6,759,241; US 9,017,698; US 9,149,521; US 9,149,522; US 9,415,097; US 9,415,101; US 9,504,743; Reed G, et al., 2013, выше, Johnson et al., 1999, J Med Chem, 42:4640-4649, и Ulrich and Myers, 1995, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach; Powell and Newman, Eds.; Plenum: New York, 495-524.

Не гликолипидные молекулы также можно использовать в качестве адъювантов-агонистов TLR4, например, синтетические молекулы, такие как Неосептин-3, или природные молекулы, такие как LeIF, см., например, Reed SG et al, 2016, выше.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения иммуногенной композиции, содержащей полипептид варианта белка А (SpA) *Staphylococcus aureus* и мутантный полипептид стафилококковой субъединицы лейкоцидина (например, стафилококковый полипептид LukA, стафилококковый полипептид LukB и/или стафилококковый димерный полипептид LukAB) по

изобретению, включающий объединение полипептида варианта белка А (SpA) *Staphylococcus aureus* и полипептида мутантной стафилококковой субъединицы лейкоцидина (например, стафилококкового полипептида LukA, стафилококкового полипептида LukB и/или стафилококкового димерного полипептида LukAB) с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Оценка иммуногенных композиций

В настоящем документе представлены иммуногенные композиции, содержащие полипептид варианта белка А (SpA) *Staphylococcus aureus* и мутантный полипептид стафилококковой субъединицы лейкоцидина (например, стафилококковый полипептид LukA, стафилококковый полипептид LukB и/или стафилококковый димерный полипептид LukAB).

Различные *in vitro* тесты применяют для оценки иммуногенности описанных в настоящем документе иммуногенных композиций. Например, опсонический анализ *in vitro* проводят путем совместной инкубации смеси стафилококковых клеток, инактивированной нагреванием сыворотки, содержащей специфические антитела к рассматриваемым антигенам, и источник экзогенного комплемента. Опсонофагоцитоз проходит во время инкубации свежевыделенных полиморфноядерных клеток (PMN) или дифференцированных эффекторных клеток, таких как HL60, и смеси антител/комплемента/стафилококка. Бактериальные клетки, покрытые антителами и комплементом, погибают при опсонофагоцитозе. Колониеобразующие единицы (КОЕ) выживших бактерий, восстановленных из опсонофагоцитоза, определяют путем посева анализируемой смеси. Титры записывают как обратную величину самого высокого разведения, обеспечивающего 50% уничтожение бактерий, по данным сравнения с контрольными образцами.

Анализ ELISA цельных клеток также используют для оценки *in vitro* иммуногенности и воздействия антигена на поверхности, где представляющий интерес бактериальный штамм (*S. aureus*) наносят на планшет, такой как 96-луночный планшет, и тестируемую сыворотку из иммунизированного животного подвергают реакции с бактериальными клетками. Если какое-либо антитело, специфичное к тестируемому антигену, вступает в реакцию с эпитопом антигена, экспонированным на поверхности, его можно обнаружить стандартными способами, известными специалисту в данной области техники.

Любой антиген, демонстрирующий желаемую активность *in vitro*, затем тестируют на модели заражения животных *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, иммуногенные композиции используют для иммунизации животного (например, мыши) способами и путями иммунизации, известными специалистам в данной области техники (например, интраназально, парентерально, перорально, ректально, вагинально, чрескожно, внутрибрюшинно, внутривенно, подкожно и т. д.). После иммунизации иммуногенной композицией, содержащей стафилококковый антиген, животное заражают *Staphylococcus sp.* и оценивают на резистентность к стафилококковой инфекции.

Животные модели стафилококковой инфекции

Несколько моделей заражения стафилококком перечислены в таблице 1.

Таблица 1: Модели заражения стафилококком

Модель	Виды	Конечная точка	Комментарии
Летальный перитонит/ септицемия	мышь, кролик	живой/мертвый	системная модель, не чувствительная
Почечный абсцесс	мышь	КОЕ в почках и поражение почек	системная модель
Хирургическая раневая инфекция	мышь	КОЕ в месте операции и диссеминация в органы	локальная/ системная модель низкого инфицирующего инокулята, чувствительная модель
Инфекционный эндокардит	крыса, кролик	вегетация сердечного значения КОЕ	системная модель, ассоциированная с биопленкой
Центральный венозный катетер	крыса	КОЕ на катетере	системная модель, ассоциированная с биопленкой
Кожа и мягкие ткани	мышь	КОЕ в очаге инфекции (кожа и мышцы)	модель локальной инфекции, ассоциированная с биопленкой
Инфекция воздушного мешка	мышь	КОЕ в мешочной жидкости	модель локального заражения
Подкожный абсцесс (wiffle ball)	кролик	КОЕ в жидкости wiffle ball	в основном локальная инфекция (абсцессоподобные состояния), будет распространяться в среде с более высоким инокулятом
Пиелонефрит	мышь	КОЕ в почках	Системная модель, не отражающая клинического состояния, поскольку нефротоксический агент

			используется для создания повреждения почек.
Хирургическая раневая инфекция	минисви нья	КОЕ в месте операции и диссеминация в органы	локальная/системная модель. У свиней иммунная система и система органов такие же, как у людей. Превосходная трансляционная модель.

Модель сепсиса у мышей (пассивная или активная)

Модель пассивной иммунизации: Мышей пассивно иммунизируют внутрибрюшинно (в.б.) иммунным IgG или моноклональным антителом. Через 24 часа мышей заражают летальной дозой *S. aureus*. Заражение бактериями проводят внутривенно (в.в.) или в.б., гарантируя, что любое выживание может быть отнесено на счет специфического взаимодействия антитела с бактериями *in vivo*. Доза заражения бактериями определяется как доза, необходимая для достижения летального сепсиса примерно у 20% не иммунизированных контрольных мышей. Статистическую оценку исследований выживаемости можно проводить анализом Каплана-Мейера.

Модель активной иммунизации: в этой модели мышей (например, мышей Swiss Webster) активно иммунизируют внутрибрюшинно (в.б.) или подкожно (п.к.) антигеном-мишенью в 0, 3 и 6 недель (или по другому аналогичному графику вакцинации с подходящими интервалами), и затем заражают *S. aureus* внутривенно на 8 неделе. Дозу заражения бактериями калибруют для достижения примерно 20% выживаемости в контрольной группе в течение 10-14 дней. Статистическая оценка исследований выживаемости может быть проведена анализом Каплана-Мейера.

Модель инфекционного эндокардита (пассивная или активная)

Модель пассивной иммунизации при инфекционном эндокардите (ИЕ), вызванном *S. aureus*, ранее использовалась для демонстрации того, что ClfA может индуцировать защитный иммунитет (Vernachio et al., *Antimicro. Agents & Chemo* 50:511-8 (2006)). В этой модели, кроликов или крыс используют для имитации клинических инфекций, которые включают центральный венозный катетер, бактериемию и гематогенный посев в дистальные органы. Катетеризованным кроликам или крысам со стерильными вегетациями аортального клапана вводят однократную или многократную внутривенную инъекцию моноклонального поликлонального антитела, специфичного для антигена-мишени. Затем животных внутривенно заражают штаммом *S. aureus* или *S. epidermidis*. После заражения, сердце, сердечные вегетации и дополнительные ткани (например, почки), кровь собирают и культивируют. Затем измеряют частоту стафилококковой инфекции в сердечной ткани, почках и крови.

Модель эндокардита также адаптируют для исследований активной иммунизации как на кроликах, так и на крысах. Кроликов или крыс иммунизируют внутримышечно или

подкожно антигеном-мишенью и через две недели заражают *S. aureus* внутривенным путем.

Модель пиелонефрита

В модели пиелонефрита мышей иммунизируют на 0, 3 и 6 неделе (или по другому графику иммунизации с соответствующим интервалом) антигенами-мишенями. Затем животных в.б. или в.в. заражают *S. aureus* PFESA0266. Через 48 часов почки собирают и подсчитывают бактериальные КОЕ.

Модель почечного абсцесса

Мышей иммунизируют (активно, 3 раза с 2-недельным интервалом между дозами; пассивно, за 24 часа до заражения, в.б.), затем системно заражают (в.в. или р.о. (ретро-орбитально)) *S. aureus*. Через четыре-семь дней после инфекции, мышей подвергают эвтаназии, оценивают почки с использованием полукачественной системы оценки для оценки количества поражений в дополнение к приблизительной доле повреждения почек (обесцвечивания). Затем почки оценивают на предмет бактериальной нагрузки.

Модель хирургической раневой инфекции

Мышей иммунизируют (активно, 3 раза с интервалом между дозами 2 недели; пассивно, за 24 часа до заражения, в.б.). Через две недели после введения последней дозы вакцины, животных анестезируют, бреют бедро и дезинфицируют. Делают разрез кожного и мышечного слоев (на глубину бедренной кости). В рану пипеткой вводят 5 мкл *S. aureus*, затем мышцу ушивают шелковой нитью 4-0 и кожу сшивают автоклипсами. Через трое суток мышей подвергают эвтаназии, мышцу с хирургическим вмешательством удаляют и регистрируют на наличие бактериальной нагрузки.

Модель глубокой хирургической раневой инфекции у минисвиней

Считается, что свиньи являются отличной трансляционной моделью для вакцин при клинических бактериальных заболеваниях человека (Gerdt et al., *ILAR Journal* 56 (1): 53-62 (2015)). Свиней используют для изучения кистозного фиброза (Meyerholz, *Theriogenology* 86 (1):427-432 (2016)), заболеваний, передающихся половым путем (Kaser et al., *Infection, Genetics and Evolution* (2017)), коклюша (Elahi et al., *Trends in Microbiology* 15 (10) (2007)), остеомиелита (Jensen et al., *In Vivo* 29: 555-560 (2015)), Elvang et al., *In Vivo* 24: 257-264 (2010)) и кожных инфекций (Klein et al., *Biofouling* 34 (2): 226-236 (2018)). Иммунная система свиней >80% похожа на человеческую по сравнению с <10% у мышей (Dawson et al., *BMC Genomics* 14:332 (2013)). Высокая доля циркулирующих нейтрофилов, сходные толл-подобные рецепторы и дендритные клетки являются одними из общих свойств иммунной системы, которые имеют как свиньи, так и люди (Meurens et al., *Trends in Microbiology* 20 (1): 50-57 (2012)). Дополнительно, свиньи имеют сходства с системой органов человека, т. е. кожей и структурой кожи (Summerfield et al., *Mol Immunol* 66: 1-21 (2015)). Эти сходства делают свинью отличной моделью для изучения и переноса стафилококковых заболеваний на человека.

Способы использования

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу индукции иммунного

ответа у субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, иммуногенной композиции по изобретению.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу лечения или профилактики инфекции *Staphylococcus* у субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом иммуногенной композиции по изобретению.

По вариантам осуществления изобретения, иммуногенная композиция содержит терапевтически эффективное количество полипептида варианта белка А (SpA) *Staphylococcus aureus* и мутантного полипептида субъединицы стафилококкового лейкоцидина (например, стафилококкового полипептида LukA, стафилококкового полипептида LukB и/или стафилококкового димерного полипептида LukAB). Используемый в настоящем документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает желаемый биологический или лекарственный ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество можно определить эмпирически и в обычном порядке, по отношению к заявленной цели.

Используемый в настоящем документе термин «субъект, нуждающийся в терапевтическом или профилактическом иммунитете» относится к субъекту, которого желательно лечить, т.е. предотвращать, излечивать, замедлять или уменьшать тяжесть симптомов, связанных со *Staphylococcus*, в течение определенного периода времени. Используемый в настоящем документе термин «субъект, нуждающийся в иммунном ответе» относится к субъекту, для которого желателен иммунный ответ против любого штамма *Staphylococcus*, экспрессирующего LukAB и/или SpA.

Используемый в настоящем документе термин в отношении полипептида варианта белка А (SpA) *Staphylococcus aureus* и мутантного полипептида субъединицы стафилококкового лейкоцидина (например, стафилококкового полипептида LukA, стафилококкового полипептида LukB и/или стафилококкового димерного полипептида LukAB), терапевтически эффективное количество означает количество вариантного полипептида белка А (SpA) *Staphylococcus aureus* и мутантного полипептида субъединицы стафилококкового лейкоцидина (например, стафилококкового полипептида LukA, стафилококкового полипептида LukB и/или стафилококкового димерного полипептида LukAB), которое модулирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, иммуногенная композиция дополнительно содержит адъювант.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, терапевтически эффективное количество относится к количеству терапии, достаточной для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) снижения или облегчение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (ii) сокращения продолжительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (iii)

профилактики прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) вызова регрессии заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (v) профилактики развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (vi) профилактики рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (vii) уменьшения госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или симптом, связанный с ним; (viii) уменьшения продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или симптом, связанный с ним; (ix) увеличения выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, или симптомом, связанным с ним; (xi) ингибирования или ослабления заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним, у субъекта; и/или (xii) усиления или улучшения профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозировка могут варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, способ введения, участок-мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли субъект человеком или животным, вводят ли другие лекарства и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Лечебные дозы оптимально титруются для оптимизации безопасности и эффективности.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, композиции, описанные в настоящем документе, составлены таким образом, чтобы они подходили для предполагаемого пути введения субъекту. Например, композиции, описанные в настоящем документе, могут быть составлены таким образом, чтобы они подходили для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечение» и «лечение» предназначены для обозначения улучшения или обращения по меньшей мере одного измеримого физического параметра, связанного со инфекцией *Staphylococcus*, который не обязательно различим у субъекта, но может быть различим у субъекта. Термины «лечить», «лечение» и «лечение» могут также относиться к вызыванию регрессии, профилактике прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, «лечить», «лечение» и «лечение» относятся к облегчению, профилактике развития или возникновения или сокращению продолжительности одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием, нарушением или состоянием, таким как как лихорадка, озноб, волдыри, фурункулы, сыпь, покраснение кожи и абсцессы. В конкретном варианте осуществления, термины «лечить», «лечение» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, «лечить»,

«лечить», и «лечение» относятся к увеличению продолжительности жизни субъекта, страдающего заболеванием, нарушением или состоянием. В конкретном варианте осуществления, термины «лечить», «лечение» и «лечение» относятся к устранению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, представлены композиции, используемые для лечения и/или профилактики инфекции *Staphylococcus* у субъекта, нуждающегося в этом. Для лечения и/или профилактики инфекции *Staphylococcus* композиции можно использовать в комбинации с другим лечением, включая, но не ограничиваясь ими по меньшей мере один антибиотик. По меньшей мере, один антибиотик может быть, например, выбран из группы, состоящей из стрептомицина, ципрофлоксацина, доксициклина, гентамицина, хлорамфеникола, триметоприма, сульфаметоксазола, ампициллина, тетрациклина и их комбинаций.

Используемый в настоящем документе термин «в комбинации» в контексте введения двух или нескольких видов терапии субъекту относится к применению более чем одного вида терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок при котором субъекту вводят терапевтические средства. Например, первое терапевтическое средство (например, описанную в настоящем документе композицию) можно вводить до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часов, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель до), одновременно или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часов, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель после) введения второй терапии субъекту.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Изобретение также представляет следующие неограничивающие варианты осуществления.

Вариант 1 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую:

(a) полипептид варианта белка А (SpA) *Staphylococcus aureus*, где полипептид варианта SpA содержит по меньшей мере один домен А, В, С, D или E SpA; и

(b) мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина, содержащий:

(i) мутантный полипептид LukA,

(ii) мутантный полипептид LukB, и/или

(iii) мутантный димерный полипептид LukAB,

где (i), (ii) и/или (iii) имеют одну или более аминокислотных замен, делеций или их комбинации,

так что способность мутантных полипептидов LukA, LukB и/или LukAB образовывать поры на поверхности эукариотических клеток нарушается, тем самым снижая токсичность мутантного полипептида LukA и/или LukB или мутантного

димерного полипептида LukAB по сравнению с соответствующим полипептидом LukA и/или LukB дикого типа или димерным полипептидом LukAB.

Вариант 2 представляет собой иммуногенную композицию по варианту 1, где полипептид варианта SpA имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая нарушает связывание Fc, и по меньшей мере, вторую аминокислотную замену, которая нарушает связывание V_{H3}.

Вариант осуществления 3 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 1 или 2, где полипептид варианта SpA содержит домен D SpA и имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности SEQ ID NO:58.

Вариант осуществления 4 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 3, где полипептид варианта SpA имеет одну или более аминокислотных замен в положениях аминокислот 9 или 10 в SEQ ID NO:58.

Вариант осуществления 5 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 3 или 4, где полипептид варианта SpA дополнительно содержит домен E, A, B или C SpA.

Вариант осуществления 6 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 5, где полипептид варианта SpA содержит домены E, A, B и C SpA и имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности SEQ ID NO:54.

Вариант осуществления 7 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 5 или 6, где каждый домен E, A, B и C SpA имеет одну или более аминокислотных замен в положениях, соответствующих положениям аминокислот 9 и 10 в SEQ ID NO:58.

Вариант осуществления 8 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 4-7, где аминокислотная замена представляет собой лизиновый остаток вместо глутаминового остатка.

Вариант осуществления 9 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 5-8, где каждый домен D, E, A, B и C SpA имеет одну или более аминокислотных замен в положениях, соответствующих положениям аминокислот 36 и 37 в SEQ ID NO:58.

Вариант осуществления 10 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 1, где полипептид варианта SpA содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:82 или SEQ

ID NO:88.

Вариант осуществления 11 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-4, где указанный полипептид варианта SpA содержит по меньшей мере один домен A, B, C, D или E SpA, и где по меньшей мере один домен имеет (i) лизиновые замены для глутаминовых остатков, соответствующие положениям 9 и 10 в домене D SpA (SEQ ID NO: 58), и (ii) глутаматную замену, соответствующую положению 33 в домене D SpA (SEQ ID NO: 58).

Вариант осуществления 12 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 11, в которой полипептид варианта SpA, по сравнению с отрицательным контролем, не обеспечивает определенной перекрестной связи IgG и IgE в крови или активации базофилов.

Вариант осуществления 13 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 11 или 12, в которой полипептид варианта SpA имеет пониженную аффинность связывания K_A для V_{H3} из IgG человека по сравнению с полипептидом варианта SpA (SpA_{ККАА}), который содержит лизиновые замены глутаминовых остатков в каждом домене A, B, C, D и E SpA, соответствующие положениям 9 и 10 в домене D SpA (SEQ ID NO: 58), и аланиновые замены остатков аспарагиновой кислоты в каждом домене A, B, C, D и E SpA, соответствующие положениям 36 и 37 домена D SpA (SEQ ID NO:58).

Вариант осуществления 14 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-13, где полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A для V_{H3} из IgG человека, которая снижена по меньшей мере в 2 раза по сравнению с SpA_{ККАА}.

Вариант осуществления 15 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-14, в которой вариантный полипептид SpA имеет аффинность связывания K_A для V_{H3} из IgG человека составляет менее $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Вариант осуществления 16 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-15, где полипептид варианта SpA не имеет замен ни в одном из доменов A, B, C, D или E SpA, соответствующих положениям аминокислот 36 и 37 в домене D SpA.

Вариант осуществления 17 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 11-16, где единственными заменами в полипептиде варианта SpA являются (i) и (ii).

Вариант осуществления 18 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую:

(а) полипептид варианта белка A (SpA) *Staphylococcus aureus*,

где указанный вариант SpA содержит полипептид по меньшей мере в одном домене A, B, C, D или E SpA, и где указанный домен имеет (i) лизиновые замены для глутаминовых остатков в по меньшей мере одном домене A, B, C, D или E SpA, соответствующие положениям 9 и 10 в домене D SpA (SEQ ID NO: 58), и (ii) треониновую

замену по меньшей мере в одном домене А, В, С, D или Е SpA, соответствующую положению 33 в домене D SpA (SEQ ID NO: 58), где полипептид, по сравнению с отрицательным контролем, не вызывает определенной перекрестной связи IgG и IgE в крови или не активирует базофилы; и

(b) мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина, содержащий:

- (1) мутантный полипептид LukA,
- (2) мутантный полипептид Luk B и/или
- (3) мутантный димерный полипептид LukAB,

где (1), (2) и/или (3) имеют одну или более аминокислотных замен, делеций или их комбинации,

так что способность мутантных полипептидов LukA, LukB и/или LukAB образовывать поры на поверхности эукариотических клеток нарушается, тем самым снижая токсичность мутантного полипептида LukA и/или LukB или мутантного димерного полипептида LukAB по сравнению с соответствующим полипептидом LukA и/или LukB дикого типа или димерным полипептидом LukAB.

Вариант осуществления 19 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 18, в которой полипептид варианта SpA имеет пониженную аффинность связывания K_A для V_{H3} IgG человека по сравнению с полипептидом варианта SpA (SpA_{KKAA}), содержащим лизиновые замены для глутаминовых остатков в каждом домене SpA AE, соответствующие положениям 9 и 10 в домене D SpA (SEQ ID NO:58) и аланиновую замену для остатков аспарагиновой кислоты в каждом домене А-Е SpA, соответствующую положениям 36 и 37 домена D SpA (SEQ ID NO:58).

Вариант осуществления 20 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 18 или 19, где полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A для V_{H3} из IgG человека, которая снижена по меньшей мере в 2 раза по сравнению с SpA_{KKAA}.

Вариант осуществления 21 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 18-20, где полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A для V_{H3} из IgG человека менее $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Вариант осуществления 22 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 18-21, где полипептид варианта SpA не имеет замен ни в одном из доменов А, В, С, D или Е SpA, соответствующих положениям аминокислот 36 и 37 в домене D SpA.

Вариант осуществления 23 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 18-22, где единственными заменами в полипептиде варианта SpA являются (i) и (ii).

Вариант осуществления 24 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов реализации 1-5 или 18-22, где полипептид варианта SpA содержит SEQ ID NO:66 или SEQ ID NO:71.

Вариант осуществления 25 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-5 или 18-22, где полипептид варианта SpA содержит SEQ ID NO:66.

Вариант осуществления 26 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-5 или 18-22, где полипептид варианта SpA содержит SEQ ID NO:60.

Вариант осуществления 27 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 18-23, где иммуногенная композиция содержит SEQ ID NO:61.

Вариант осуществления 28 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую:

(а) полипептид варианта белка А (SpA) *Staphylococcus aureus*,

где вариант SpA содержит полипептид по меньшей мере в одном домене А, В, С, D и Е SpA, и где указанный домен имеет (i) лизиновые замены для глутаминовых остатков, соответствующие положениям 9 и 10 домена D SpA (SEQ ID NO:58) в каждом из доменов А, В, С, D и Е, и (ii) по меньшей мере, одну другую аминокислотную замену, соответствующую положению 29 и/или 33 домена D SpA (SEQ ID NO:58) в каждом из доменов А, В, С, D и Е, где вариант SpA имеет аффинность связывания K_D с V_{H3} из IgG человека, более чем $1,0 \times 10^{-4}$ М, и/или аффинность связывания K_D с V_{H3} из IgE человека, превышающую $1,0 \times 10^{-6}$ М; и

(b) мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина, содержащий:

(1) мутантный полипептид LukA,

(2) мутантный полипептид Luk B и/или

(3) мутантный димерный полипептид LukAB,

где (1), (2) и/или (3) имеют одну или более аминокислотных замен, делеций или их комбинации,

так что способность мутантных полипептидов LukA, LukB и/или LukAB образовывать поры на поверхности эукариотических клеток нарушается, тем самым снижая токсичность мутантного полипептида LukA и/или LukB или мутантного димерного полипептида LukAB по сравнению с соответствующим полипептидом LukA и/или LukB дикого типа или димерным полипептидом LukAB.

Вариант осуществления 29 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 28, где полипептид варианта SpA содержит аминокислотную замену, соответствующую положению 29 домена D SpA (SEQ ID NO:58) в каждом из доменов А, В, С, D и Е.

Вариант осуществления 30 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 28, где полипептид варианта SpA содержит аминокислотную замену, соответствующую положению 33 домена D SpA (SEQ ID NO: 58) в каждом из доменов А, В, С, D и Е.

Вариант осуществления 31 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 29, где полипептид варианта SpA содержит аминокислотную замену, соответствующую положениям 29 и 33 домена D SpA (SEQ ID NO: 58) в каждом из доменов A, B, C, D и E.

Вариант осуществления 32 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов воплощения 28-31, где полипептид варианта SpA содержит аминокислотную замену, соответствующую одному или обоим положениям 36 и 37 домена D SpA (SEQ ID NO: 58) в каждом из доменов A, B, C, D и E.

Вариант осуществления 33 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 32, где полипептид варианта SpA содержит аминокислотную замену, соответствующую положениям 36 и 37 домена D SpA (SEQ ID NO: 58) в каждом из доменов A, B, C, D и E.

Вариант осуществления 34 представляет собой иммуногенную композицию по вариантам осуществления 32 или 33, где аминокислотные замены, соответствующие положениям 36 и 37 домена D SpA (SEQ ID NO: 58), представляют собой аланиновые остатки вместо остатков аспарагиновой кислоты.

Вариант осуществления 35 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 28-34, где полипептид варианта SpA содержит домены вариантов A, B, C, D и E, которые по меньшей мере на 70% идентичны аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58.

Вариант осуществления 36 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 35, где полипептид варианта SpA содержит варианты доменов A, B, C, D и E, которые по меньшей мере на 80% идентичны аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58.

Вариант осуществления 37 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 36, где полипептид варианта SpA содержит варианты доменов A, B, C, D и E, которые по меньшей мере на 90% идентичны аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58.

Вариант осуществления 38 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 37, где полипептид варианта SpA содержит варианты доменов A, B, C, D и E, которые не содержат каких-либо аминокислотных замен в SEQ ID NO: 58, за исключением соответствующих положений 9, 10, 29, 33, 36 и/или 37.

Вариант осуществления 39 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 38, где полипептид варианта SpA содержит домены вариантов A, B, C, D и E, состоящие только из аминокислотных замен, соответствующих положениям 9, 10 и 29 SEQ ID NO: 58.

Вариант осуществления 40 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 38, где полипептид варианта SpA содержит домены вариантов A, B, C, D и E, состоящие только из аминокислотных замен, соответствующих положениям 9, 10 и 33 SEQ ID NO: 58.

Вариант осуществления 41 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 38, где полипептид варианта SpA содержит варианты доменов А, В, С, D и Е, состоящие только из аминокислотных замен, соответствующих положениям 9, 10, 29 и 33 SEQ ID NO: 58.

Вариант осуществления 42 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 38, где полипептид варианта SpA содержит домены вариантов А, В, С, D и Е, состоящие только из аминокислотных замен, соответствующих положениям 9, 10, 29, 36 и 37 SEQ ID NO: 58.

Вариант осуществления 43 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 38, где полипептид варианта SpA содержит домены вариантов А, В, С, D и Е, состоящие только из аминокислотных замен, соответствующих положениям 9, 10, 33, 36 и 37 SEQ ID NO: 58.

Вариант осуществления 44 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 38, где полипептид варианта SpA содержит домены вариантов А, В, С, D и Е, состоящие только из аминокислотных замен, соответствующих положениям 9, 10, 29, 33, 36 и 37 SEQ ID NO: 58.

Вариант осуществления 45 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 29-44, где замена аминокислоты, соответствующей положению 29 SEQ ID NO: 58, представляет собой аланин, лейцин, пролин, фенилаланин, глутаминовую кислоту, аргинин, лизин, серин, треонин или глутамин.

Вариант осуществления 46 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 45, где замена аминокислоты, соответствующей положению 29 SEQ ID NO: 58, представляет собой аланин, фенилаланин или аргинин.

Вариант осуществления 47 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 30-44, где замена аминокислоты, соответствующей положению 33 SEQ ID NO: 58, представляет собой аланин, фенилаланин, глутаминовую кислоту, лизин или глутамин.

Вариант осуществления 48 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 29-44, где замена аминокислоты, соответствующей положению 33 SEQ ID NO: 58, представляет собой фенилаланин, глутаминовую кислоту или глутамин.

Вариант осуществления 49 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 28-48, где полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_D для Vh3 более чем $1,0 \times 10^{-2}$ М.

Вариант осуществления 50 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 49, где полипептид варианта SpA содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60 или SEQ ID NO:61.

Вариант осуществления 51 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 1, 18 или 28, где полипептид варианта SpA содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 72-88.

Вариант осуществления 52 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-51, где мутантный полипептид LukA содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к последовательности любой из SEQ ID NO: 1-28.

Вариант осуществления 53 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 52, где мутантный полипептид LukA содержит делецию аминокислотных остатков, соответствующих аминокислотным положениям 342-351 любой из SEQ ID NO: 1-14 и аминокислотным положениям 315-324 любой из SEQ ID NO: 15-28.

Вариант осуществления 54 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-53, где мутантный полипептид LukB содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к последовательности любой из SEQ ID NO:29-53.

Вариант осуществления 55 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-54, где мутантный димерный полипептид LukAB содержит мутантный полипептид LukA, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к любой из SEQ ID NO:1-28; и мутантный полипептид LukB, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к любой из SEQ ID NO: 29-53.

Вариант осуществления 56 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-55, где мутантный димерный полипептид LukAB содержит мутантный полипептид LukA, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к полипептиду LukA, имеющему делецию аминокислотных остатков, соответствующих положениям 315-324 SEQ ID NO: 16, и мутантный полипептид LukB, содержащий аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

Вариант осуществления 57 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-56, где мутантный димерный полипептид LukAB содержит мутантный полипептид LukA с делецией аминокислотных остатков, соответствующих положениям 315-324 SEQ ID NO: 16; и мутантный LukB полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53.

Вариант осуществления 58 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-57, где мутантный димерный полипептид LukAB содержит мутантный полипептид LukA с аминокислотной заменой D39A, соответствующей SEQ ID NO: 15, и полипептид LukB с аминокислотной заменой R23E, соответствующей SEQ ID NO: 42.

Вариант осуществления 59 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-58, дополнительно содержащую адъювант.

Вариант осуществления 60 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 59, где адъювант содержит сапонины.

Вариант осуществления 61 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 60, где сапонин представляет собой QS21.

Вариант осуществления 62 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 61, где адъювант содержит агонист TLR4.

Вариант осуществления 63 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 62, где агонист TLR4 представляет собой липид A или его аналог или производное.

Вариант осуществления 64 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 63, где агонист TLR4 содержит MPL, 3D-MPL, RC529, GLA, SLA, E6020, PET-липид A, PHAD, 3D-PHAD, 3D-(6-ацил)-PHAD, ONO4007 или OM-174.

Вариант осуществления 65 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 62, где агонист TLR4 содержит GLA.

Вариант осуществления 66 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 59, где адъювант содержит MPL, QS21 и липосомы.

Вариант осуществления 67 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 59 или 62, где адъювант составлен в виде эмульсии масло-в-воде, такой как MF59 или AS03.

Вариант осуществления 68 представляет собой иммуногенную композицию по вариантам осуществления 59, 62 или 65, где адъювант составлен в виде эмульсии масло-в-воде, содержащей сквален.

Вариант осуществления 69 представляет собой иммуногенную композицию по

варианту осуществления 65, где адъювант дополнительно содержит QS21 и липосомы.

Вариант осуществления 70 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 59, где адъювант содержит GLA-SE.

Вариант осуществления 71 представляет собой иммуногенную композицию по варианту осуществления 59, где адъювант содержит GLA-SLQ.

Вариант осуществления 72 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-71, дополнительно содержащую по меньшей мере один стафилококковый антиген или его иммуногенный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из CP5, CP8, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, EsxAB(слияние), SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB, Coa, Hla, mHla, MntC, rTSST-1, rTSST-1v, TSST-1, SasF, vWbp, vWh витронектин-связывающего белка, Aaa, Aap, Ant, аутолизинглюкозаминидазы, аутолизинамидазы, Can, витронектин-связывающего белка, Aaa, Aap, Ant, аутолизинглюкозаминидазы, аутолизинамидазы, Can, коллаген-связывающего белка, Csa1A, EFB, эластин-связывающего белка, EPB, FbpA, фибриноген-связывающего белка, фибронектин-связывающего белка, FhuD, FhuD2, FnbA, FnbB, GehD, HarA, HBP, иммунодоминантного ABC транспортера, IsaA/PisA, рецептора ламинина, липазы GehD, MAP, Mg²⁺ транспортера, аналога МНС II, MRPII, NPase, активирующего белка РНК III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF, SdrG, SdrH, экзотоксинов SEA, экзотоксинов SEB, mSEB, SitC, Ni ABC транспортера, связывающего белка SitC/MntC/слюны, SsaA, SSP-1, SSP-2, Spa5, SpAKKAA, SpAkR, Sta006, Sta011, PVL, LukED и Hlg.

Вариант осуществления 73 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов осуществления 1-72, дополнительно содержащую Hla, стафилококковый антиген.

Вариант осуществления 74 представляет собой одну или более выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид варианта белка А (SpA) *Staphylococcus aureus* и мутантный полипептид Luk А, мутантный полипептид Luk В или мутантный димерный полипептид LukAB по любому из вариантов осуществления 1-73.

Вариант осуществления 75 представляет собой вектор, содержащий выделенные нуклеиновые кислоты по варианту осуществления 74.

Вариант осуществления 76 представляет собой выделенную клетку-хозяин, содержащую вектор по варианту осуществления 75.

Вариант осуществления 77 представляет собой способ лечения или профилактики инфекции *Staphylococcus* у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом эффективного количества иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 1-73, одной или нескольких выделенных нуклеиновых кислот по варианту осуществления 74, вектора по варианту осуществления 75 или клетки-хозяина по варианту осуществления 76.

Вариант осуществления 78 представляет собой способ индукции иммунного ответа на бактерию *Staphylococcus* у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение

субъекту, нуждающемуся в этом эффективного количества иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 1-73, одной или нескольких выделенных нуклеиновых кислот по варианту осуществления 74, вектора по варианту осуществления 75 или клетки-хозяина по варианту осуществления 76.

Вариант осуществления 79 представляет собой способ деколонизации или профилактики колонизации или повторного заселения бактерией *Staphylococcus* у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 1-73, одной или нескольких выделенных нуклеиновых кислот по варианту осуществления 74, вектора по варианту осуществления 75 или клетки-хозяина по варианту осуществления 76.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 Стафилококковый белок А способствует персистентной колонизации мышей *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus персистентно колонизирует носоглотку примерно у трети популяции людей, тем самым способствуя внебольничным и внутрибольничным инфекциям. В настоящее время антибиотики используются для деколонизации лиц с повышенным риском инфицирования. Однако эффективность антибиотиков ограничена повторной колонизацией и селекцией штаммов, резистентных к лекарственным средствам. Колонизация носа вызывает IgG ответы против стафилококковых поверхностных антигенов, однако эти антитела не могут предотвратить последующую колонизацию или заболевание. В этом примере описывается *S. aureus* WU1, изолят типа ST88 с мультилокусной последовательностью, который постоянно колонизирует носоглотку мышей. В настоящем документе сообщается, что стафилококковый белок А (SpA) необходим для персистенции *S. aureus* WU1 в носоглотке. По сравнению с животными, колонизированными *S. aureus* дикого типа, мыши, колонизированные вариантом Δspa, показывали увеличенные IgG ответы против детерминант стафилококковой колонизации. Иммунизация мышей не токсикогенным вариантом SpA, который не может перекрестно сшивать В-клеточные рецепторы и отклонять ответы антител, вызывает антитела, нейтрализующие белок А, которые способствуют ответу IgG против колонизирующего *S. aureus* и уменьшают персистенцию патогена.

Результаты

Золотистый стафилококк WU1.

Вспышка инфекций препуциальных желез у самцов мышей C57BL/6 наблюдают в колонии для разведения животных. Образцы собирают из аденита препуциальных желез (PGA) и из носоглотки самцов и самок мышей C75BL/6J и анализируют путем роста на маннитно-солевом агаре (MSA) и агаре Бэрда-Паркера (BPA). Типирование мультилокусной последовательности и генотипирование spa показали, что животные колонизированы *S. aureus* ST88 spa генотипом t186, который также ответственен за PGA у самцов мышей. *S. aureus* CC88 с генотипом spa t186 был описан ранее как стабильно

колонирующие изоляты от лабораторных мышей в США (37). Другие генотипы *sra* включают t325, t448, t690, t755, t786, t2085, t2815, t5562, t11285 и t12341 (37). Новозеландский изолят JSNZ несет отдельный генотип *sra* t729 (37). Тем по меньшей мере, как *S. aureus* JSNZ, так и WU1 имеют общие гены капсульного полисахарида типа 8 и лишены гена *mesA*, а также суперантигенов Т-клеток, кодируемых мобильным генетическим элементом (MGE) (37). Далее, *hly*-конвертирующий фаг, который экспрессирует гены специфичного для человека кластера ускользания от иммунологического надзора 1 (IEC1) *sak* (стафилокиназа), *chp* (CHIPS, белок, ингибирующий хемотаксис *S. aureus*) и *scn* (SCIN-A, стафилококковый ингибитор комплемента А), отсутствует в геноме WU1, что дает интактный ген, кодирующий α -гемолизин (*hly*) (38). Примечательно, что IEC2, кодируемый WU1, несет гомолог *scn* *scb/scc* (SCIN-B/-C) вместе с *hla* (α -гемолизином) и *ssl12-14* (стафилококковый суперантиген-подобным 12-14) (39). В отличие от других изолятов CC88, которые стабильно колонизируют мышей (37), геном WU1 содержит ген *blaZ*. При анализе генов, кодирующих поверхностные белки, заякоренные сортазой, наблюдают, что *S. aureus* WU1 несет гены для детерминант, ранее ассоциированных с назальной колонизацией, включая *ClfB*, *IsdA*, *SdrC*, *SdrD* и *SasG* (ТАБЛИЦА 2).

Таблица 2. Консервативность белковых продуктов выбранных открытых рамок считывания в геномах *S. aureus* WU1, JSNZ и Newman

Белок	Аминокислотная идентичность (%) продукта гена WU1	
	JSNZ	Newman
SpA	99	98
ClfA	100	93
ClfB	100	96
FnBPA	100	82
FnBPB	87	87
IsdA	100	100
IsdB	99	98
SdrC	100	100
SdrD	95	95
SdrE	100	98
EsxA	100	100
EsxB	100	100
SasA	100	99
SasD	100	99
SasF	100	98
SasI	99	100

SasG	100	69
SasK	100	93 ^a
Coa	98	98
vWbp	100	71
Hla	78	99
SCIN	100	45 ^b
Eap	100	99
Efb	100	99
Ebh	99	98
TarS	100	98

a. По сравнению со штаммом *S. aureus* 04-02981

b. По сравнению со штаммом *S. aureus* USA300

Образование абсцесса *S. aureus* было связано с детерминантами бактериальной агглютинации с фибрином (40, 41). Агглютинация требует двух продуктов, секретлируемых *S. aureus*, которые активируют протромбин хозяина для превращения фибриногена в фибрин: коагулазы (Coa) и белка, связывающего фактор фон Виллебранда (vWbp) (40). Фактор агглютинации А (ClfA) связывает фибриноген и покрывает стафилококки фибриновыми фибриллами, генерируемыми коагулазой, тем самым препятствуя поглощению и уничтожению *S. aureus* фагоцитами хозяина (41, 42). Ген *clfA* идентичен у *S. aureus* WU1 и JSNZ, при этом демонстрирует аллель-специфические различия с *clfA* от *S. aureus* Newman (ТАБЛИЦА 2), клинического изолята человека CC8, который обычно используется для лабораторных экспериментов с контрольным заражением на мышах (43). Наблюдаемые различия в *clfA* тем не менее являются кладо-специфическими, поскольку они могут быть обнаружены в штаммах CC88, выделенных либо от хозяина-человека, либо от хозяина-мыши (данные не показаны). Генные продукты *coa* *S. aureus* WU1, JSNZ и Newman практически идентичны (ТАБЛИЦА 2). Напротив, генный продукт *vwb* *S. aureus* WU1 и JSNZ значительно отличается от *S. aureus* Newman с наибольшей изменчивостью последовательности в протромбин-связывающих доменах D1 и D2 (Фиг. 1A) и не распознается поликлональными антителами, индуцированными против Newman vWbp (Фиг. 1B). Секретлируемый vWbp из двух штаммов CC88 мог быть распознан сывороткой, которая была индуцирована против консервативного С-концевого домена vWbp из штамма USA300 (Фиг. 1C). В отличие от *S. aureus* Newman, который секретрирует большое количество Coa и быстро агглютинирует плазму человека и мыши, *S. aureus* WU1 и JSNZ секретрируют меньше Coa и агглютинируют плазму мыши быстрее, чем плазму человека, по сравнению со штаммом Newman (Фиг. 1B, 1D, 1E). Коагулазная активность *S. aureus* Newman зависит от экспрессии *coa* и *vwb*, поскольку соответствующие мутанты Δ *coa*, Δ *vwb* и Δ *coa* Δ *vwb* демонстрируют дефекты агглютинации в плазме мыши и человека (Фиг. 1D, 1E). В совокупности эти данные

позволяют предположить, что аллель ST88 гена *vwb* в *S. aureus* WU1 и JSNZ могут способствовать эффективной протромбин-опосредованной коагуляции и агглютинации фибрина в плазме мыши, что может поддерживать патогенез инвазивных заболеваний, таких как PGA.

***S. aureus* WU1 персистентно колонизирует носоглотку мышей.**

Чтобы проанализировать *S. aureus* WU1 на его способность колонизировать мышей, когорты ($n=10$) самок животных C57BL/6 анализируют путем нанесения мазков из глотки и фекального материала на ВРА. Наивных мышей, у которых не было роста бактерий на ВРА, анестезируют и инокулируют пипетированием. 10 мкл суспензий 1×10^8 КОЕ *S. aureus* WU1 в фосфатно-солевом буфере (PBS) в правую ноздрю. Животных анализируют на наличие колоний путем взятия мазка из ротоглотки с недельными интервалами, т. е. через 7, 14, 21, 28, 35 и 42 дня после инокуляции. Мазки наносят на ВРА, инкубируют для образования колоний и подсчитывают (Фиг. 2А). Даже без предварительного лечения антибиотиками или отбора антибиотиков, *S. aureus* WU1 колонизирует экспериментальных животных с нагрузкой в диапазоне 1,2-2,9 \log_{10} КОЕ на мазок в течение 42 дней (Фиг. 2А). Чтобы подтвердить персистентную колонизацию *S. aureus* WU1, колонии, полученные через 42 дня, анализируют с помощью генотипирования MLST и *sra*. Данные показали, что мыши все еще колонизированы ST88 *sra* t186, что указывает на то, что *S. aureus* WU1 персистентно колонизирует носоглотку мышей C57BL/6. В качестве контроля, ложные инокуляции PBS когорт животных C57BL/6J в отдельных клетках, которые содержат в той же комнате для животных и на тех же стеллажах для клеток, что и животные, колонизированные *S. aureus* WU1, не приводят к стафилококковой колонизации носоглотки (Фиг. 2А). Образцы стула мышей на 42 день гомогенизируют в PBS и высевают на маннитно-солевой агар (МСА) для подсчета КОЕ (Фиг. 2В). Образцы стула мышей, колонизированных *S. aureus* WU1, содержат 5,1-7,3 \log_{10} КОЕ г-1 фекалий, что указывает на то, что желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) также был колонизирован штаммом *S. aureus* WU1. В качестве контроля, ложно инокулированные (PBS) мыши не содержали *S. aureus* в образцах их стула (Фиг. 2В).

Колонизация *S. aureus* WU1 запускает ответ сывороточного IgG у мышей. В более ранней работе была получена антигенная матрица *S. aureus*, которая состоит из 25 консервативных секретируемых белков. Каждый из 25 рекомбинантных белков с аффинной меткой очищают и иммобилизуют на мембранном фильтре (44). Для измерения иммунных ответов хозяина во время колонизации, у наивных животных или животных, колонизированных *S. aureus* WU1, берут кровь через 15 дней после инокуляции, и ответы сывороточного IgG анализируют путем инкубации с антигенной матрицей *S. aureus*. Связывание IgG определяют с IRDye 680-конъюгированным анти-мышинным IgG козы (LICOR) и количественно анализируют с помощью инфракрасной визуализации. Этот эксперимент продемонстрировал, что колонизация *S. aureus* WU1 приводит к увеличению сывороточного IgG, направленного против заякоренных сортазой поверхностных белков

ClfA, ClfB, IsdA и IsdB, и гигантского внеклеточного матрикс-связывающего белка (Ebh), детерминанты размера клеток и синтеза пептидогликана *S. aureus* (45) (ТАБЛИЦА 3).

ТАБЛИЦА 3. Ответы IgG в сыворотке у мышей C57BL/6J, колонизированных *S. aureus* WU1 или его Δ sra вариантом

	Антигены	WU1 (колонизированные)		WU1 Δ sra (колонизированные)		WU1 Δ sra (очищенные)	
		Кратность изменения ^b	р-значение ^c (к наивным)	Кратность изменения ^b	р-значение ^c (к колонии WU1)	Кратность изменения ^b	р-значение ^c (к колонизированным WU1 Δ sra)
Заякоренный на клеточной стенке поверхностный белок	SpA _{ККАА}	1,3±0,08	нс	1,1±0,06	нс,	1,1±0,49	нс,
	ClfA	5,3±2,77	<0,0001	4,3±0,83	нс,	3,5±1,69	нс,
	ClfB	4,8±0,72	0,001	3,9±1,28	нс,	17,4±4,70	< 0,0001
	Ebh	3,7±0,50	0,0454	2,8±0,62	нс,	3,9±1,56	нс,
	FnbpA	1,9±0,89	нс	1,3±0,79	нс	2,6±0,96	нс
	FnbpB	2,6±1,33	нс	2,3±0,85	нс	4,3±0,96	нс
	IsdA	4,5±0,84	0,0036	2,1±0,22	нс	13,0±0,44	<0,0001
	IsdB	5,2±1,43	0,0002	2,7±0,83	нс	2,8±1,18	нс
	SdrC	1,1±0,14	нс	1,5±0,45	нс	1,7±0,69	нс
	SdrD	1,5±1,08	нс	1,0±0,25	нс	1,2±0,35	нс
	SdrE	1,8±0,52	нс	2,9±0,65	нс	1,4±0,60	нс
	SasA	3,0±1,33	нс	1,1±0,44	нс	3,3±1,14	нс
	SasB	5,1±2,22	нс	1,0±0,34	нс	5,7±4,42	нс
	SasD	2,7±1,47	нс	0,7±0,23	нс	1,3±0,59	нс
	SasF	1,2±0,61	нс	0,9±0,63	нс	1,2±0,32	нс
	SasG	2,1±0,24	нс	1,2±0,47	нс	10,3±1,19	< 0,0001
SasI	1,4±0,75	нс	1,2±0,08	нс	1,4±0,53	нс	
SasK	2,5±0,26	нс	1,3±0,30	нс	1,7±1,09	нс	

Секретированный белок	Coa	2,7±0,29	нс	1,2±0,45	нс	1,5±0,45	нс
	vWbp	2,0±0,97	нс	1,4±0,59	нс	1,7±0,89	нс
	Hla	1,8±0,65	нс	1,2±0,46	нс	1,2±0,34	нс
	SCIN	4,3±1,23	0,0071	2,8±1,80	нс	1,4±0,49	нс
	Eap	1,3±0,20	нс	0,8±0,97	нс	1,2±0,31	нс
	Efb	2,9±1,68	нс	2,6±1,63	нс	1,6±0,52	нс
	EsxA	2,6±1,73	нс	1,6±1,00	нс	2,6±0,35	нс
	EsxB	2,8±0,28	нс	1,6±0,19	нс	1,9±0,21	нс

а. Когорты мышей C57BL/6J инокулированы интраназально 10^8 КОЕ указанных штаммов *S. aureus*. Через 15 дней после инокуляции у животных берут кровь и образцы сыворотки анализируют на ответ антитела на стафилококковые антигены.

б. Кратность изменения рассчитывают путем деления средней интенсивности сигнала группы инокулированных мышей на среднюю интенсивность сигнала группы наивных мышей. Данные представлены в виде среднего±стандартное отклонение.

с. р-значения рассчитаны с использованием двухфакторного ANOVA с критериями множественного сравнения Тьюки, нс=несущественно

***S. aureus* WU1 требует стафилококкового белка А для персистентной колонизации.**

Подобно *S. aureus* Newman SpA, продукт гена *sra* *S. aureus* WU1 состоит из пяти IgBD и несет единственную аминокислотную замену в 278 остатке. Эксперименты с иммуноблоттингом показали, что штаммы *S. aureus* Newman и WU1 продуцируют аналогичные количества SpA (Фиг. 3А). Используя аллельную рекомбинацию, изобретатели получают Δsra мутант *S. aureus* WU1. Как было измерено с помощью иммуноблоттинга, продуцирование SpA было отменено в Δsra мутанте, и этот дефект был восстановлен за счет передающейся через плазмиды экспрессии *sra* дикого-типа (pSpA) (Фиг. 3А). В качестве контроля загрузки используют иммуноблоттинг с антителами против сортазы А (SrtA) (Фиг. 3А). При инокуляции в правую ноздрю мышей и анализе на колонизацию мазком из ротоглотки на 7 день, мутант Δsra первоначально колонизировал животных C57BL/6J аналогично штамму дикого типа WU1 (Фиг. 3В), однако в более поздние моменты времени, особенно на 35 и 42 день, мутант Δsra колонизировал меньше животных, чем штамм WU1 дикого типа (Фиг. 3В). Во время роста бактерий *S. aureus* высвобождает фрагменты SpA, связанные с пептидогликаном, в окружающую среду (46). В мышинной модели внутривенного заражения *S. aureus*, высвобожденный SpA активирует пролиферацию В-клеток и усиливает секрецию молекул VH3 идиотипа IgM и IgG (33). Однако расширенные IgG идиотипа VH3 не распознают стафилококковые антигены (33). Молекулярная основа этой В-клеточной суперантигенной активности основана на SpA-опосредованном перекрестном связывании В-клеточных рецепторов идиотипа VH3,

которое запускает пролиферацию В-клеток в CD4 Т-хелперные клетки и RIPK2 киназа-зависимым образом (33, 47). У животных, инфицированных мутантными стафилококками Δ spa, отсутствует экспансия идиотипического иммуноглобулина VH3 и наблюдается повышенное количество патоген-специфических IgG, тем самым запуская иммунные ответы, которые защищают от последующей инфекции *S. aureus* (48). Затем возник вопрос, связана ли колонизация Δ spa мутантом WU1 с измененными реакциями IgG в сыворотке. Сыворотку животных, колонизированных в течение 15 дней, анализируют на связывание IgG с компонентами антигенной матрицы *S. aureus* (ТАБЛИЦА 3). В этом эксперименте выявлено повышение уровня антител против ClfB, IsdA и SasG у животных, которые впоследствии были деколонизированы, но не у животных, оставшихся колонизированными мутантом Δ spa (ТАБЛИЦА 3). В совокупности эти данные позволяют предположить, что колонизация носоглотки мышей C57BL/6 Δ spa мутантными стафилококками связана с повышенным ответом IgG против ключевых детерминант колонизации, что, по-видимому, способствует удалению Δ spa мутанта *S. aureus* из носоглотки.

Антитела, нейтрализующие белок А, влияют на персистентную колонизацию *S. aureus*.

Иммунизация мышей белком А дикого типа не вызывает образования сывороточных антител IgG, которые связывают и нейтрализуют способность его пяти IgBD связывать либо домен Fc γ молекул IgG, либо вариант тяжелой цепи иммуноглобулина идиотипа VH3 (44). SpA_{ККАА} представляет собой вариант с 20 аминокислотными заменами в пяти IgBD SpA, которые отменяют связывание Fc γ , а также уменьшают ассоциацию с иммуноглобулином идиотипа VH3 (44). Тем не менее, SpA_{ККАА} сохраняет общее содержание α -спирали и антигенную структуру белка А. В результате, иммунизация мышей адъювантом SpA_{ККАА} вызывает образование высокого титра белка А, нейтрализующего IgG (44). Эти антитела блокируют антиопсоническую и В-клеточную суперантигенную активность белка А во время инфекции *S. aureus*, широко усиливая ответы IgG против стафилококковых антигенов и стимулируя развитие защитного иммунитета (44). Чтобы проверить, влияют ли или нет антитела, нейтрализующие белок А, на колонизацию *S. aureus*, мышей C57BL/6 иммунизируют с добавленным в качестве адъюванта SpA_{ККАА} или только с адъювантом. По сравнению с ложно иммунизированными животными, животные, получавшие SpA_{ККАА}, показывали высокий титр нейтрализующих антител к белку А (ТАБЛИЦА 4). При инокуляции *S. aureus* WU1, как ложные, так и иммунизированные SpA_{ККАА} животные первоначально были колонизированы аналогичным образом, поскольку мазки из ротоглотки показали средние колонизирующие нагрузки, которые существенно не различались на 7 и 14 дни после инокуляции (Фиг. 4). Однако, начиная с 21 дня, мыши, иммунизированные SpA_{ККАА}, деколонизировались чаще, чем ложно иммунизированные животные (Фиг. 4). При изучении ответов сывороточного IgG и сравнении необработанных мышей, колонизация *S. aureus* WU1 у ложно обработанных животных приводит к ответам антител против ClfB,

IsdA, IsdB, SasD и SasF (ТАБЛИЦА 4). У животных, которые сохраняли колонизацию *S. aureus* WU1, иммунизация SpA_{ККАА} приводит к ответам антител против ClfA, Coa, vWBP и Hla (ТАБЛИЦА 4). По сравнению с мышами, вакцинированными SpA_{ККАА}, животные, которые впоследствии были деколонизированы, демонстрируют повышенный сывороточный IgG против ClfA, ClfB, фибронектин-связывающих белков А (FnBPA) и В (FnBPB), IsdB, Coa и SasG (ТАБЛИЦА 4). Вместе эти данные показывают, что вакцинация SpA_{ККАА} вызывает усиленный ответ IgG в сыворотке у мышей, которые колонизированы *S. aureus*. Кроме того, SpA_{ККАА} вакцина индуцирует антитела против многих различных стафилококковых антигенов, включая известные факторы колонизации (ClfB, IsdA и SasG). Вместе эти индуцированные SpA_{ККАА} вакциной IgG ответы против колонизирующих стафилококков, по-видимому, способствуют деколонизации носоглотки.

ТАБЛИЦА 4. Влияние иммунизации SpA_{ККАА} на ответы IgG в сыворотке у мышей C57BL/6, колонизированных *S. aureus* WU1

	Антигены	SpA _{ККАА} иммунизированные (колонизированные)		SpA _{ККАА} иммунизированные (очищенные)		Ложно иммунизированные PBS (колонизированные)	
		Кратность изменения ^b	р-значение ^d (к PBS)	Кратность изменения ^b	р-значение ^d (к иммунизированным SpA _{ККАА} колонизированным)	Кратность изменения ^c	р-значение ^d (к наивным)
Заякоренный на клеточной стенке поверх	SpA _{ККАА}	121,3±64,98	<0,0001	126,3±13,35	<0,0001	0,9±0,16	нс
	ClfA	3,8±0,49	<0,0001	5,7±2,28	0,0069	1,3±0,65	нс
	ClfB	1,1±0,28	нс	14,8±1,12	<0,0001	4,3±1,49	<0,0001
	Ebh	1,0±0,15	нс	1,3±0,57	нс	1,3±0,43	нс
	FnbpA	1,1±0,34	нс	6,4±1,86	<0,0001	1,1±0,29	нс
	FnbpB	1,5±0,33	нс	10,6±1,0	<0,0001	1,2±0,72	нс

ноστι ый белок	IsdA	1,8±0,46	нс	2,8±0,59	нс	2,0±0,43	нс
	IsdB	1,7±0,37	нс	5,8±2,75	< 0,0001	2,1±0,96	нс
	SdrC	1,4±0,67	нс	1,5±0,61	нс	1,2±0,45	нс
	SdrD	1,1±0,39	нс	1,5±0,36	нс	1,2±0,23	нс
	SdrE	1,2±0,36	нс	1,8±0,94	нс	1,2±0,22	нс
	SasA	1,8±0,36	нс	1,6±0,28	нс	0,8±0,80	нс
	SasB	1,9±0,90	нс	1,1±0,42	нс	1,0±0,24	нс
	SasD	1,3±0,46	нс	1,0±0,44	нс	2,4±0,53	0,0023
	SasF	2,4±0,34	нс	1,7±0,55	нс	2,6±1,59	0,004
	SasG	0,9±0,15	нс	5,5±1,04	<0,0001	1,1±0,32	нс
	SasI	2,1±0,46	нс	1,8±0,02	нс	1,3±0,22	нс
	SasK	2,3±0,62	нс	2,7±0,38	нс	1,1±0,02	нс
Секре ти рован ный белок	Coa	3,0±1,31	0,0049	5,8±0,87	<0,0001	1,2±0,43	нс
	vWbp	5,7±1,34	<0,0001	6,6±2,82	нс	1,4±0,65	нс
	Hla	2,9±0,08	0,0070	3,6±0,36	нс	1,1±0,58	нс
	SCIN	2,1±0,77	нс	1,4±0,21	нс	1,0±0,37	нс
	Eap	1,7±0,38	нс	1,1±0,22	нс	0,9±0,23	нс
	Efb	1,5±0,47	нс	1,49±0,25	нс	0,98±0,2 7	нс
	EsxA	2,4±0,65	нс	3,22±1,81	нс	0,82±0,2 6	нс
EsxB	2,5±0,35	нс	3,75±1,08	нс	1,46±0,2 5	нс	

а. Когорты мышей линии C57BL/6J иммунизируют 50 мкг рекомбинантного SpA_{ККАА}, эмульгированного с CFA или PBS-имитацией в CFA, и на 11 день ревакцинируют 50 мкг рекомбинантного SpA_{ККАА}, эмульгированного с IFA или PBS-имитацией в IFA. На 24 день мышей интраназально инокулируют 10⁸ КОЕ указанных штаммов *S. aureus* и еженедельно берут мазок из горла для подсчета бактериальной нагрузки. Через 15 дней после инокуляции у животных берут кровь и образцы сыворотки анализируют на антитела к антигенам стафилококка.

б. Кратность изменения рассчитывают путем деления средней интенсивности сигнала группы, иммунизированной SpA_{ККАА}, на среднюю интенсивность сигнала группы, ложно иммунизированной PBS. Данные представлены в виде среднего±стандартное отклонение.

Колонизация *S. aureus* WU1 мышей BALB/c. Чтобы проверить, ограничена ли колонизация *S. aureus* WU1 мышами C57BL/6, авторы изобретения инокулируют когорты ($n=20$) наивных мышей BALB/c 1×10^8 КОЕ *S. aureus* WU1 в правую ноздрю и измеряют колонизацию носоглотки с помощью культур мазков. Как и у мышей C57BL/6, *S. aureus* WU1 персистентно колонизирует мышей BALB/c (Фиг. 5). Иммунизация мышей BALB/c SpA_{ККАА} не влияет на первоначальную колонизацию *S. aureus* WU1. Однако по сравнению с ложно иммунизированными животными, вакцинация SpA_{ККАА} способствует деколонизации мышей BALB/c (Фиг. 5).

SpA_{ККАА} вакцина влияет на колонизацию мышей *S. aureus* JSNZ.

Затем возник вопрос, влияют ли антитела, нейтрализующие белок А, также на колонизацию мышей *S. aureus* JSNZ. В отличие от штаммов Newman и WU1, продукт гена *sra* *S. aureus* JSNZ содержит только четыре IgBD (37). Предыдущие исследования показали, что SpA варианты с четырьмя IgBD ассоциированы со сниженной В-клеточной суперантигенной активностью по сравнению с пятью IgBD, обычно ассоциированными с колонизацией носоглотки человека *S. aureus* (33). При инокуляции в правую ноздрю анестезированной мыши, *S. aureus* JSNZ эффективно колонизирует носоглотки мышей BALB/c в течение 42 дней (Фиг. 6). Вакцинация SpA_{ККАА} не влияет на начальную колонизацию *S. aureus* JSNZ. Однако по сравнению с ложно иммунизированными мышами, мыши BALB/c с антителами к сывороточному нейтрализующему белку А более часто деколонизировали JSNZ *S. aureus*, начиная с 21 дня (Фиг. 6). Вместе эти данные свидетельствуют о том, что JSNZ *S. aureus* также требует опосредованной белком А суперантигенной В-клеточной активности для постоянной колонизации мышей.

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

Среды и условия роста бактерий.

S. aureus выращивают в триптическом соевом бульоне (TSB) или на триптическом соевом агаре (TSA) при 37°C. Для экспериментов по изучению колонизации носоглотки мышей, образцы мазков из горла выращивают на агаре Бэрда-Паркера при 37°C, как указано. Для экспериментов по изучению колонизации ЖК тракта *S. aureus*, образцы стула выращивают на маннитно-солевом агаре при 37°C. Штаммы *Escherichia coli* DH5 α и BL21 (DE3) выращивают в бульоне Лурия (LB) или агаре при 37°C. Ампициллин (100 мкг/мл для *E. coli*) и хлорамфеникол (10 мкг/мл для *S. aureus*) используют для селекции плазмид.

Генотипирование *S. aureus*.

Изолят *S. aureus* WU1 получают из абсцессов носоглотки и препуциальной железы мышей в животноводческом комплексе авторов изобретения. Штамм JSNZ *S. aureus* мыши предоставлен Dr. Siouxsie Wiles (36). Геномная ДНК стафилококка выделена с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). SpA генотипирование и типирование мультилокусной последовательности (MLST) выполняют, как описано ранее (85). Коротко, для *sra* типирования геномную ДНК штамма WU1 *S. aureus* подвергают ПЦР амплификации с праймерами 1095F (5'AGACGATCCTTCGGTGAGC3') (SEQ ID NO:89) и 1517R (5'GCTTTTGCAATGTCATTTACTG3') (SEQ ID NO:90) (86). Продукт

ПЦР очищают с помощью Nucleospin Gel и набора PCR Clean-up, секвенируют с праймерами 1095F и 1517R и анализируют с помощью программного обеспечения Ridom. Для MLST типирования, геномную ДНК штамма *S. aureus* WU1 ПЦР амплифицируют с праймерами arc-up (5'TTGATTACACCAGCGCGTATTGTC3') (SEQ ID NO:91), arc-dn (5'AGGTATCTGCTTCAATCAGCG3') (SEQ ID NO:92), aro-up (5'ATCGGAAATCСТАТТТCACATTC3') (SEQ ID NO:93), arc-dn (5'GGTGTGTGATTAATAACGATATC3') (SEQ ID NO:94), glp-up (5'СТАGGAАСТGCAATCTTAATCC3') (SEQ ID NO:95), glp-dn (5'TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC3') (SEQ ID NO:96), gmk-up (5'ATCGTTTTATCGGGACCATC3') (SEQ ID NO:97), gmk-dn (5'TCATTAАСТACAACGTAATCGTA3') (SEQ ID NO:98), pta-up (5'GTТААААТCGTATTACCTGAAGG3') (SEQ ID NO:99), pta-dn (5'GACCSTTTTGTGAAAAGCTTAA3') (SEQ ID NO:100), tpi-up (5'TCGTTCATTCTGAACGTCGTGA3') (SEQ ID NO:101), tpi-dn (5'TTTGCACSTTCTAACAATTGTAC3') (SEQ ID NO:102), yqi-up (5'CAGCАТАСAGGACACСТАТТGGC3') (SEQ ID NO:103) и yqi-dn (5'CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC3') (SEQ ID NO:104) (см., например: saureus.mlst.net/misc/info.asp). Продукт ПЦР очищают с помощью Nucleospin Gel и набора PCR Clean-up kit, ПЦР амплифицируют и секвенируют и анализируют с помощью онлайн программного обеспечения (см., например: saures.mlst.net/). Файлы полногеномных последовательностей для штамма JSNZ *S. aureus* предоставлены Dr. Silva Holtfreter. Подготовку библиотеки Truseq DNA-seq и секвенирование Illumina MiSeq выполняют с геномной ДНК *S. aureus* WU1 в Environmental Sample Preparation and Sequencing Facility at Argonne National Laboratory. Последовательности анализируют с использованием программного обеспечения Geneious.

Мутанты *S. aureus*.

Аллельную рекомбинацию с плазмидой pKOR1 используют для делеции spa гена *S. aureus* WU1 (87). Для конструирования Δspa мутанта, два фрагмента ДНК длиной 1 т.п.н. выше и ниже spa гена амплифицируют из хромосомы *S. aureus* WU1 с праймерами ext1F (5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAТТТААГААГАТТGTTTCAGATTTA TG3') (SEQ ID NO:105), ext1R (5'ATTTGTAAAGTCATCATAATATAACGAATTATGTATTGCAATACTAAAATC3') (SEQ ID NO:106), ext2F (5'CGTCGCGAАСТАТААТАААААСАААСААТАСАСААСGATAGATATC3') (SEQ ID NO:107) и ext2R (5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCAACGAACGCCTAAAGAAATTGTCTTT GC3') (SEQ ID NO:108). Две фланкирующие области сливают вместе в последующей ПЦР, и конечный продукт ПЦР клонируют в pKOR1 с использованием набора BP Clonase II (Invitrogen). Полученные плазмиды последовательно переносят в *E.coli* DH5α, штамм *S.aureus* RN4220 и, наконец, штамм *S.aureus* WU1, и температуру сдвигают до 40°C,

блокируя репликацию плазмид и способствуя их встраиванию в хромосому (87). Рост при 30°C используют для усиления аллельной замены. Мутации в генах *sra* подтверждают секвенированием ДНК продуктов ПЦР амплификации.

Анализ агглютинации.

Анализы агглютинации проводят, как описано ранее (88). Коротко, ночные культуры штаммов *S. aureus* разводят 1:100 в свежем TSB и выращивают при 37°C в течение 6 часов. Бактерии из 1 мл культуры (нормализованной до OD₆₀₀ 4,0) инкубируют с SYTO 9 (1:500) (Invitrogen) в течение 15 мин, дважды промывают 1 мл PBS и суспендируют в 1 мл PBS. Бактерии смешивают 1:1 с обработанной цитратом плазмой человека или плазмой мыши на предметных стеклах микроскопа. и инкубируют в течение 30 мин. Образцы просматривают, и изображения получают на микроскопе с использованием флюоресценции полного внутреннего отражения живых клеток IX81 с объективом 20x (Olympus). Для каждого образца получают по меньшей мере 10 изображений. Области комплексов агглютинации на каждом изображении измеряют и количественно оценивают с использованием программного обеспечения ImageJ.

Иммуноблотинг.

Ночные культуры штаммов *S. aureus* разводят 1:100 в свежем TSB (с хлорамфениколом в присутствии плазмид) и выращивают при 37°C до OD₆₀₀ 0,5-1,0. Клетки из 1 мл культуры центрифугируют, суспендируют в PBS и инкубируют с 20 мкг/мл лизостафина (AMBI) при 37°C в течение 1 ч. Белки в цельноклеточном лизате осаждают 10% трихлоруксусной кислотой и 10 мкг дезоксихолевой кислотой, промывают ледяным ацетоном, сушат на воздухе, суспендируют в 100 мкл 0,5 М Tris HCl (pH 6,8) и 100 мкл буфера для образцов SDS-PAGE [100 мМ Tris HCl (pH 6,8), 4% SDS, 0,2% бромфенолового синего, 200 мМ дитиотреитола] и кипятят в течение 10 мин. Белки отделяют на 12% SDS-PAGE и электропереносят на мембрану PVDF. Мембраны PVDF блокируют 5% молоком в солевом растворе, забуференным Tri, с Tween-20 (TBST) [20 мМ трис-HCl (pH 7,6), 137 мМ NaCl, 0,1% Tween-20]. Анти-ClfA 2A12.12 моноклональное антитело мыши (разведение 1:2000) и конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) анти-мышинный IgG (Cell Signaling, разведение 1:10000) используют для обнаружения ClfA. Для определения Coa используют анти-Coa поликлональные антитела кролика (разведение 1:1000) и HRP-конъюгированные анти-кроличьи IgG (разведение 1:10000). Для определения vWbp используют два разных анти-vWbp поликлональных антитела кролика (разведение 1:1000), которые распознают полноразмерный vWbp из *S. aureus* Newman или C-концевой домен vWbp, соответственно, и HRP-конъюгированные анти-кроличьи IgG (разведение 1:10000). Для определения SpA используют HRP-конъюгированное IgM человека в TBST (разведение 1:10000). Для определения SrtA используют анти-SrtA поликлональные антитела кролика (разведение 1:10000) и HRP-конъюгированные анти-кроличьи IgG (разведение 1:10000). Окрашенные антителами мембраны промывают TBST и инкубируют с хемилюминесцентным субстратом SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) и проявляют на высокоэффективных

хемилюминесцентных пленках Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

Очистка рекомбинантных белков.

E. coli BL21(DE3), несущую плазмиды pET15b+ для экспрессии His-меченого SpA_{ККАА}, а также 24 стафилококковых антигена (ClfA, ClfB, FnBPA, FnBPB, IsdA, IsdB, SasA, SasB, SasD, SasF, SasG, SasI, SasK, SdrC, SdrD, SdrE, EsxA, EsxB, SCIN, Eap, Efb, Hla, Coa, vWbp и Ebh) выращивают в течение ночи, разводят 1:100 в свежей среде и выращивают при 37°C до ~OD₆₀₀ 0,5. Культуры индуцируют 1 mM изопропил-β-d-тиогалактопиранозидом и выращивают в течение дополнительных 3 ч. Клетки осаждают, повторно суспендируют в колоночном буфере (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl), и разрушают с помощью пресса Френча при 14000 фт/дюйм². Лизаты очищают от мембран и нерастворимых компонентов ультрацентрифугированием при 40000 x g. Очищенные лизаты подвергают аффинной хроматографии Ni-NTA, и белки элюируют в колоночном буфере, содержащем последовательно более высокие концентрации имидазола (от 100 до 500 mM). Элюаты подвергают диализу с PBS, и чистоту белка подтверждают с помощью окрашенного Кумасси SDS-PAGE. Концентрации белка определяют с помощью анализа на бицинхониновую кислоту (Thermo Scientific).

Колонизация носоглотки мышей.

Ночные культуры штаммов *S. aureus* WU1 и его мутанта Δspa разводят 1:100 в свежем TSB и выращивают в течение 2 ч при 37°C. Клетки центрифугируют, промывают и суспендируют в PBS. Самок семинедельных мышей BALB/c, C57BL/6J или B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J (The Jackson Laboratory) анестезируют внутрибрюшинной инъекцией 100 мг/мл кетамина и 20 мг/мл ксилазина на килограмм массы тела. 1x10⁸ КОЕ *S. aureus* (в 10 мкл объеме) пипеткой вводят в правую ноздрю каждой мыши. На 7, 14, 21, 28, 35 и 42 день после инокуляции у мышей берут мазок из ротоглотки, и образцы мазка наносят на агар Бэрда-Паркера и инкубируют для подсчета бактерий. На 15 день после инокуляции у мышей берут кровь через пункцию периорбитальной вены для получения сыворотки для анализа ответа на антитела с использованием матрицы стафилококкового антигена. На 42 день после прививки образцы стула собирают и гомогенизируют в PBS. Гомогенаты высевают на маннитно-солевой агар и инкубируют для подсчета бактерий. Все эксперименты на мышах проводят в соответствии с институциональными рекомендациями после рассмотрения и одобрения протокола эксперимента Институциональным комитетом по биобезопасности (IBC) и Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC) в Чикагском университете. Эксперименты на животных повторяют по меньшей мере один раз, чтобы обеспечить воспроизводимость данных.

Активная иммунизация.

Четырехнедельных мышей иммунизируют путем подкожной инъекции 50 мкг SpA_{ККАА}, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда (CFA; Difco), и повторно вакцинируют 50 мкг того же антигена, эмульгированного в неполном адьюванте Фрейнда (IFA) через 11 дней после начальной иммунизации. На 21 день у иммунизированных

мышей берут кровь через пункцию периорбитальной вены для получения сыворотки для ELISA. На 24 день мышам интраназально инокулируют 1×10^8 КОЕ штаммов *S. aureus* WU1 или JSNZ и контролируют на предмет колонизации носоглотки.

Матрица стафилококкового антигена.

Нитроцеллюлозные мембраны блоттируют 2 мкг аффинно очищенных стафилококковых антигенов. Мембраны блокируют 5% дегранулированным молоком, инкубируют с разведенной сывороткой мыши (разведение 1:10000) и IRDye 680-конъюгированным анти-мышиним IgG козы (LI-COR). Интенсивность сигнала количественно определяют с использованием системы инфракрасной визуализации Odyssey (LI-COR).

Статистический анализ.

Двусторонний ANOVA с критериями множественного сравнения Сидака (программное обеспечение GraphPad) выполняют для анализа статистической значимости носоглоточной колонизации, ELISA и данных антигенной матрицы.

ПРИМЕР 2: ВАРИАНТЫ СТАФИЛОКОККОВОГО БЕЛКА А

Следующие анализы можно использовать для оценки вариантов SpA, описанных в настоящем документе, на предмет их эффективности в способах и композициях по настоящему изобретению.

Анализ

Вакцинная защита в моделях абсцесса у мышей, смертельной инфекции у мышей и пневмонии у мышей. Для изучения инфекционного заболевания, вызванного *S. aureus*, создают три животных модели, которые можно использовать в настоящем документе для изучения уровня защитного иммунитета, обеспечиваемого за счет образования антител, специфичных к белку А.

Абсцесс у мышей - мышей BALB/c (24-дневные самки, 8-10 мышей в группе, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) иммунизируют путем внутримышечной инъекции в заднюю лапу очищенного белка (Chang et al., 2003; Schneewind et al., 1992). Очищенный SpA и/или вариант SpA вводят в дни 0 (эмульгирование 1:1 с полным адьювантом Фрейнда) и 11 (эмульгирование 1:1 с неполным адьювантом Фрейнда). Образцы крови берут путем ретроорбитального кровотока в дни 0, 11 и 20. Сыворотку исследуют с помощью ELISA на титры IgG для специфической связывающей активности варианта. Иммунизированных животных заражают на 21 день ретроорбитальной инъекцией 100 мкл суспензии *S. aureus* Newman или *S. aureus* USA300 (1×10^7 КОЕ). Для этого, ночные культуры *S. aureus* Newman разводят в соотношении 1:100 в свежем триптическом соевом бульоне и выращивают в течение 3 ч при 37°C. Стафилококки центрифугируют, промывают дважды и разводят в PBS для получения A_{600} 0,4 (1×10^8 КОЕ на мл). Разведения подтверждают экспериментально, высеванием на агар и образованием колоний. Мышей анестезируют внутрибрюшинной инъекцией 80-120 мг кетамина и 3-6 мг ксилазина на килограмм массы тела и инфицируют ретроорбитальной инъекцией. На 5 или 15 день после заражения, мышей подвергают эвтаназии путем вдыхания сжатого CO₂.

Почки удаляют и гомогенизируют в 1% Triton X-100. Аликвоты разводят и высевают на агаровую среду для трехкратного определения КОЕ. Для гистологии, ткань почки инкубируют при комнатной температуре в 10% формалине в течение 24 ч. Ткани заливают в парафин, делают тонкие срезы, окрашивают гематоксилинлеозином и исследуют под микроскопом.

Летальная инфекция мышей - мышей BALB/c (24-дневные самки, 8-10 мышей в группе, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) иммунизируют путем внутримышечной инъекции в заднюю лапу очищенного SpA или варианта SpA. Вакцину вводят в дни 0 (эмульгирование 1:1 с полным адьювантом Фрейнда) и 11 (эмульгирование 1:1 с неполным адьювантом Фрейнда). Образцы крови берут путем ретроорбитального кровотоечения на 0, 11 и 20 дни. Сыворотку исследуют с помощью ELISA для титров IgG со специфической связывающей активностью варианта. Иммунизированных животных заражают на 21 день ретроорбитальной инъекцией 100 мкл суспензии *S. aureus* Newman или *S. aureus* USA 300 (15×10^7 КОЕ). Для этого ночные культуры *S. aureus* Newman разводят в соотношении 1:100 в свежем трипсиновом соевом бульоне и выращивают в течение 3 ч при 37°C. Стафилококки центрифугируют, промывают дважды, разводят в PBS с получением A_{600} 0,4 (1×10^8 КОЕ на мл) и концентрируют. Разведения проверяют экспериментально путем посева на агар и образования колоний. Мышей анестезируют внутрибрюшинной инъекцией 80-120 мг кетамина и 3-6 мг ксилазина на килограмм массы тела. Иммунизированных животных заражают на 21 день путем внутрибрюшинной инъекции 2×10^{10} КОЕ штамма *S. aureus* Newman или $3-10 \times 10^9$ КОЕ клинических изолятов *S. aureus*. За животными наблюдают в течение 14 дней, и регистрируют летальное заболевание.

Модель пневмонии мыши - штаммы *S. aureus* Newman или USA300 (LAC) выращивают при 37°C в трипсиновом соевом бульоне/агаре до OD_{660} 0,5. Аликвоты культуры по 50 мл центрифугируют, промывают PBS и суспендируют в 750 мкл PBS для исследований смертности ($3-4 \times 10^8$ КОЕ на 30 мкл объема) или 1250 мкл PBS (2×10^8 КОЕ на 30 мкл объема) для бактериальной нагрузки и гистопатологических экспериментов. Для инфекции легких, 7-недельных мышей C57BL/6J (The Jackson Laboratory) анестезируют перед инокуляцией 30 мкл суспензии *S. aureus* в левую ноздрю. Животных помещают в клетку в положении лежа на спине для выздоровления и наблюдают в течение 14 дней. Для активной иммунизации, 4-недельные мыши получают 20 мкг варианта SpA в CFA в день 0 внутримышечно, с последующей бустерной дозой 20 мкг варианта в неполном адьюванте Фрейнда (IFA) на 10 день. Животных заражают *S. aureus* на 21 день. Сыворотку собирают перед иммунизацией и на 20 день для оценки выработки специфических антител. Для пассивной иммунизации, 7-недельные мыши получают 100 мкл либо NRS (нормальной сыворотки кролика), либо SpA-вариант-специфической антисыворотки кролика путем внутрибрюшинной инъекции за 24 ч до заражения. Для оценки патологических коррелятов пневмонии, инфицированных животных умерщвляют принудительной ингаляцией CO_2 перед удалением обоих легких. Правое легкое

гомогенизируют для подсчета бактериальной нагрузки в легких. Левое легкое помещают в 1% формалин и парафин, заливают тонкими срезами, окрашивают гематоксилином-эозином и анализируют под микроскопом.

Антитела кролика - очищенный вариант SpA используют в качестве иммуногена для получения антисыворотки кролика. Белок эмульгируют с CFA для инъекции в день 0 с последующими бустерными инъекциями с белком, эмульгированным с IFA, в 21 и 42 дни. Затем антител кролика определяют ELISA. Очищенные антитела получают аффинной хроматографией сыворотки кролика на сефарозе варианта SpA. Концентрацию элюированных антител измеряют по абсорбции при A_{280} , и титры специфических антител определяют с помощью ELISA.

Активная иммунизация вариантами SpA. - Для определения эффективности вакцины, животных активно иммунизируют очищенным вариантом SpA. В качестве контроля, животных иммунизируют одним адьювантом. Титры антител против препаратов белка А определяют, используя вариант SpA в качестве антигенов. Используя модели инфекционных заболеваний, описанные выше, измеряют любое снижение бактериальной нагрузки (абсцесс и пневмония мыши), гистопатологические признаки стафилококкового заболевания (абсцесс и пневмония мыши) и защиту от летального заболевания (летальная провокация и пневмония мыши).

Пассивная иммунизация аффинно очищенными поликлональными антителами кролика, образованными против вариантов SpA. Для определения защитного иммунитета антител кролика, специфичных к белку А, мышей пассивно иммунизируют очищенными антителами кролика, полученными из варианта SpA. Оба этих препарата антител очищают с помощью аффинной хроматографии с использованием иммобилизованного варианта SpA. В качестве контроля, животных пассивно иммунизируют антителами rV10 (защитным антигеном от летальных заболеваний, не влияющим на исход стафилококковых инфекций). Определяют титры антител ко всем препаратам белка А, используя в качестве антигена вариант SpA. Используя модели инфекционных заболеваний, описанные выше, измеряют снижение бактериальной нагрузки (абсцесс и пневмония мыши), гистопатологические признаки стафилококковой инфекции (абсцесс и пневмония мыши) и защиту от летального заболевания (летальная провокация и пневмония мыши).

Бактериальные штаммы и рост. Штаммы *Staphylococcus aureus* Newman и USA300 выращивают в триптическом соевом бульоне (TSB) при 37°C. Штаммы *Escherichia coli* DH5 α и BL21 (DE3) выращивают в бульоне Лурия-Бертани (LB) с 100 мкг мл⁻¹ ампициллина при 37°C.

Антитела кролика. Варианты SpA получают в соответствии со стандартной рекомбинантной технологией или протоколами синтеза, и очищенный антиген ковалентно связывают с HiTrap NHS-активированными HP колонками (GE Healthcare). Антигенную матрицу используют для аффинной хроматографии 10-20 мл сыворотки кролика при 4°C. Заряженную матрицу промывают 50 колоночными объемами PBS, антитела элюируют

элюирующим буфером (1 М глицин, pH 2,5, 0,5 М NaCl) и немедленно нейтрализуют 1 М Tris-HCl, pH 8,5. Очищенные антитела диализуют в течение ночи против PBS при 4°C.

Фрагменты F(ab)₂. Аффинно очищенные антитела смешивают с 3 мг пепсина при 37°C в течение 30 минут. Реакцию гасят 1 М Tris-HCl, pH 8,5, и фрагменты F(ab)₂ аффинно очищают с помощью конъюгированных со специфическими антигенами HiTrap NHS-активированных HP колонок. Очищенные антитела подвергают диализу в течение ночи против PBS при 4°C, наносят на гель SDS-PAGE и визуализируют с окрашиванием Кумасси синим.

Активная и пассивная иммунизация. Мышей BALB/c (3-недельных самок, Charles River Laboratories) иммунизируют 50 мкг белка, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда (Difco) внутримышечной инъекцией. Для бустерных иммунизаций, белки эмульгируют в неполном адьюванте Фрейнда и вводят через 11 дней после начальной иммунизации. На 20 день после иммунизации у 5 мышей берут кровь для получения сыворотки на титры специфических антител с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Аффинно очищенные антитела в PBS вводят инъекцией в концентрации 5 мг/кг⁻¹ веса экспериментального животного в брюшную полость мышей BALB/c (6-недельных самок, Charles River Laboratories) за 24 часа до заражения *S. aureus*. Кровь животных собирают с помощью пункции перiorбитальной вены. Клетки крови удаляют с помощью гепаринизированных микрогематокритных капиллярных пробирок (Fisher), и микропробирки для разделения сыворотки Z-gel (Sarstedt) используют для сбора и измерения титров антигенспецифических антител с помощью ELISA.

Абсцесс почки у мышей. Ночные культуры *S. aureus* Newman или USA300 (LAC) разводят 1:100 в свежем TSB и выращивают в течение 2 часов при 37°C. Стафилококки осаждают, промывают и суспендируют в PBS при OD₆₀₀ 0,4 (~1x10⁸ КОЕ мл⁻¹). Инокулят количественно определяют, распределяя аликвоты образца на TSA и подсчитывая образовавшиеся колонии. Мышей BALB/c (6-недельных самок, Charles River Laboratories) анестезируют внутрибрюшинной инъекцией 100 мг мл⁻¹ кетамина и 20 мг/мл⁻¹ ксилазина на килограмм массы тела. Мышей заражают ретроорбитальной инъекцией 1x10⁷ КОЕ *S. aureus* Newman или 5x10⁶ КОЕ *S. aureus* USA300. На 4 день после заражения, мышей умерщвляют вдыханием CO₂. Обе почки удаляют, и стафилококковую нагрузку в одном органе анализируют путем гомогенизации почечной ткани с PBS, 1% Triton X-100. Серийные разведения гомогената распределяют на TSA и инкубируют для образования колоний. Оставшийся орган исследуют с помощью гистопатологии. Коротко, почки фиксируют в 10% формалине на 24 часа при комнатной температуре. Ткани заливают парафином, делают тонкие срезы, окрашивают гематоксилином-эозином и исследуют с помощью световой микроскопии для подсчета абсцессов. Все эксперименты на мышах проводят в соответствии с институциональными рекомендациями после рассмотрения и одобрения протокола эксперимента Институциональным комитетом по биобезопасности (IBC) и Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC)

Чикагского университета.

Связывание с белком А. Для связывания IgG человека, аффинные колонки Ni-NTA предварительно заряжают 200 мкг очищенных белков (варианты SpA) в буфере для колонки. После промывки, в колонку загружают 200 мкг IgG человека (Sigma). Образцы белка собирают из промывок и элюатов и подвергают гель-электрофорезу в SDS-PAGE с последующим окрашиванием Кумасси синим. Очищенные белки (варианты SpA) наносят на планшеты MaxiSorp ELISA (NUNC) в 0,1 М карбонатном буфере (pH 9,5) в концентрации 1 мкг мл⁻¹ в течение ночи при 4°C. Затем планшеты блокируют 5% цельным молоком с последующей инкубацией с серийными разведениями пероксидаза-конъюгированными фрагментами IgG, Fc или F(ab)₂ человека в течение одного часа. Планшеты промывают и проявляют с использованием реагентов OptEIA ELISA (BD). Реакции гасят 1 М фосфорной кислотой, и значения A₄₅₀ используют для расчета полумаксимальных значений титра и доли связывания.

Анализ связывания фактора фон Виллебранда (vWF). Очищенные белки (варианты SpA) покрывают и блокируют, как описано выше. Планшеты инкубируют с vWF человека в концентрации 1 мкг мл⁻¹ в течение двух часов, затем промывают и блокируют IgG человека в течение еще часа. После промывки, планшеты инкубируют с серийными разведениями пероксидаза-конъюгированных антител, направленных против vWF человека, в течение одного часа. Планшеты промывают и проявляют с использованием реагентов OptEIA ELISA (BD). Реакции гасят 1 М фосфорной кислотой, и значения A₄₅₀ используют для расчета полумаксимального титра и доли связывания. Для анализа ингибирования, планшеты инкубируют с аффинно очищенными фрагментами F(ab)₂, специфичными для варианта SpA, в концентрации 10 мкг мл⁻¹ в течение одного часа до анализа связывания лигандов.

Апоптоз спленоцита. Аффинно очищенные белки (150 мкг варианта SpA) вводят инъекцией в брюшную полость мышей BALB/c (6-недельных самок, Charles River Laboratories). Через четыре часа после инъекции, животных умерщвляют ингаляцией CO₂. Их селезенки удаляют и гомогенизируют. Клеточный дебрис удаляют с помощью клеточного сита, и суспендированные клетки переносят в лизирующий буфер ACK (0,15 М NH₄Cl, 10 мМ KHCO₃, 0,1 мМ ЭДТК) для лизиса эритроцитов. Белые клетки крови осаждают центрифугированием, суспендируют в PBS и окрашивают 1:250 разведенным анти-CD19 моноклональным антителом, конъюгированным с R-PE (Invitrogen) на льду и в темноте в течение одного часа. Клетки промывают 1% FBS и фиксируют с 4% формалином в течение ночи при 4°C. На следующий день клетки разводят в PBS и анализируют с помощью проточной цитометрии. Оставшийся орган исследуют для гистопатологии. Коротко, селезенки фиксируют в 10% формалине в течение 24 часов при комнатной температуре. Ткани заливают парафином, делают тонкие срезы, окрашенные набором для обнаружения апоптоза (Millipore) и изучают с помощью световой микроскопии.

Количественное определение антител. Сыворотки собирают у здоровых людей-

добровольцев или мышей BALB/c, которых либо инфицируют *S. aureus* Newman, или USA300 в течение 30 дней, либо иммунизируют вариантом SpA, как описано выше. IgG человека/мыши (Jackson Immunology Laboratory), вариант SpA и CRM₁₉₇ подвергают блоттингу на нитроцеллюлозной мембране. Мембраны блокируют 5% цельным молоком с последующей инкубацией с сывороткой человека или мыши. Конъюгированный с IRDye 700DX, аффинно очищенный анти-человеческий/мышинный IgG (Rockland) используют для количественного определения интенсивности сигнала с помощью системы инфракрасной визуализации Odyssey™ (Li-cor). Эксперименты с кровью людей-добровольцев включают протоколы, которые были рассмотрены, одобрены и выполнены под контролем Институционального наблюдательного совета (IRB) Чикагского университета.

Статистический анализ. Для анализа статистической значимости данных о почечном абсцессе, ELISA и В-клеточном суперантигене выполняют двусторонний t-критерий Стьюдента.

С помощью этих анализов тестируют варианты, описанные в настоящем документе (например, показанные на фиг. 12-15). Могут быть выполнены дополнительные анализы, такие как SPR анализ для определения аффинности связывания новых вариантов SpA с VH3-IgG человека и VH3-IgE человека по сравнению с контролями SpA, SpA/ККАА, а также SpA/ККАА/F (SpA*31). Также можно проверить технологичность (выход очищенных вариантов SpA*/грамм клеточной пасты *E. coli*). CD спектроскопию можно провести для проверки содержания α -спиралей в сравнении с SpA и SpA/ККАА. Также можно определить стабильность белка при очистке и хранении при переменной температуре (4, 25 и 37°C в течение 1-7 дней).

Для тестирования безопасности и эффективности лекарственного средства можно провести анализ высвобождения гистамина базилика (Фиг. 16). Этот тест известен в данной области техники (см., например, Kowal, K. et al., 2005. Allergy and Asthma Proc. Vol. 26, No. 6). Коротко, сыворотку и/или базофилы человека инкубируют в течение 60 мин при 37°C. Высвобождение гистамина измеряют из стимулированных (добавлением вариантов SpA) и не стимулированных клеток, и результаты выражают как высвобождение гистамина в долях от общего содержания гистамина. В некоторых аспектах, высвобождение гистамина >16,5% является положительным результатом теста как у детей, так и у взрослых пациентов.

ПРИМЕР 3: ВАРИАНТЫ SPA ВАКЦИНЫ С УЛУЧШЕННОЙ БЕЗОПАСНОСТЬЮ

Результаты

Аминокислотные замены в Gly²⁹ кандидатных вакцин SpA

Авторы стремятся экспериментально идентифицировать аминокислотные замены в положении Gly²⁹ SpA-IgBD, которые вызывают наибольшее снижение аффинности между IgG человека и SpA_{КК}, т.е. пять IgBD (EDABC), несущие также аминокислотные замены Gln^{9,10}Lys, которые нарушают взаимодействие между SpA и Fc γ (48). Для достижения этой

цели изобретатели сконструировали девятнадцать различных плазмид, кодирующих N-концевой полигистидин-меченый SpA_{Q9,10K/G29X}, где X представляет собой любую из 19 природных аминокислот (за исключением глицина), предоставленных генетическим кодом Белки SpA_{Q9,10K/G29X} очищают аффинной хроматографией на смоле Ni-NTA, элюируют, подвергают диализу, концентрацию определяют с помощью анализа ВСА и связывают в равной концентрации (250 нМ) с чипом Bio-Rad ProteOn HTGchip. Каждый чип подвергают экспериментам с поверхностным плазмонным резонансом с серийными разведениями IgG человека или контрольного PBS. Ассоциацию IgG человека с кандидатными вакцинами SpA, загруженными на чип, записывают, и данные трансформируют для получения констант ассоциации для каждого белка (таблица 5). В качестве контроля, изобретатели количественно определяют константы ассоциации SpA дикого типа ($K_A 1,081 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) и SpA_{KKAA} для IgG человека ($K_A 5,022 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Для белков SpA_{Q9,10K/G29X}, четыре аминокислотные замены в Gly²⁹ вызывают значительное увеличение константы ассоциации: Gly²⁹Ser ($K_A 9,398 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), Gly²⁹Lys ($K_A 9,738 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), Gly²⁹Ile ($K_A 10,070 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) и Gly²⁹Ala ($K_A 11,310 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), что позволяет предположить, что эти варианты более прочно связывались с тяжелыми цепями V_{H3} варианта IgG человека, чем SpA_{KKAA} (таблица 5). Наблюдения для SpA_{Q9,10K/G29A} были для нас неожиданными. Замена Gly²⁹Ala в конструкции ZZZZ для коммерческой очистки антител (MabSelectSure™) снижает связывание с V_{H3}-IgG (150), в то время как Gly²⁹Ala в контексте Gln^{9,10}Lys в составе SpA-IgBD может способствовать умеренному повышению аффинности к V_{H3}-IgG. По сравнению с SpA_{KKAA}, десять аминокислотных замен на Gly²⁹ не вызывают существенной разницы в константе ассоциации с: Gly²⁹Thr, Gly²⁹Leu, Gly²⁹Glu, Gly²⁹Pro, Gly²⁹Phe, Gly²⁹Met, Gly²⁹Val, Gly²⁹Trp, Gly²⁹Asp, Gly²⁹Arg, Gly²⁹Asn и Gly²⁹Tyr (таблица 5). Другие три аминокислотные замены в Gly²⁹ снижают константу ассоциации: Gly²⁹His ($K_A 1,435 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), Gly²⁹Cys ($K_A 1,743 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) и Gly²⁹Gln ($K_A 2,057 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) к IgG человека по сравнению с SpA_{KKAA} (таблица 4). Таким образом, аминокислотные замены в Gly²⁹ не оказывают универсального эффекта на связывание SpA-IgBD с IgG человека. Некоторые замены аминокислот на Gly²⁹ увеличивают аффинность между IgG человека и SpA_{Q9,10K/G29X}, в то время как другие либо нейтральны (не оказывают существенного влияния), либо снижают аффинность.

Аминокислотные замены в Ser33 кандидатных вакцин SpA

Для идентификации аминокислотных замен в положении Ser³³ SpA-IgBD, которые вызывают наибольшее снижение аффинности между IgG человека и SpA_{KK}, изобретатели сконструировали девятнадцать различных плазмид, кодирующих N-концевой полигистидин-меченый SpA_{Q9,10K/G33X}, где X представляет собой любую из 19 природных аминокислот (за исключением серина), предоставленных генетическим кодом Белки SpA_{Q9,10K/G33X} очищают аффинной хроматографией на смоле Ni-NTA, элюируют, подвергают диализу, концентрацию определяют с помощью анализа ВСА и связывают в равной концентрации (250 нМ) с чипом Bio-Rad ProteOn HTGchip. Каждый чип подвергают экспериментам с поверхностным плазмонным резонансом с серийными

разведениями IgG человека или контрольного PBS. Ассоциацию IgG человека с кандидатными вакцинами SpA, загруженными на чип, записывают, и данные трансформируют для получения констант ассоциации для каждого белка (таблица 5). Две аминокислотные замены в положении Ser³³ вызывают увеличение аффинности к IgG человека: IgG: Ser³³Gly (K_A 11,180 x 10⁵ M⁻¹) и Ser³³Ala (K_A 10,540 x 10⁵ M⁻¹), что указывает на то, что эти варианты проявляют большую аффинность к IgG человека, чем SpA_{ККАА} (предположительно, из-за повышенной аффинности к тяжелым цепям V_{H3} варианта) (таблица 6). Четырнадцать аминокислотных замен в Ser³³ не вызывают существенной разницы в константе ассоциации: Ser³³Tyr, Ser³³Leu, Ser³³Trp, Ser³³Val, Ser³³His, Ser³³Asn, Ser³³Met, Ser³³Arg, Ser³³Asp, Ser³³Phe, Ser³³Gln, Ser³³Pro, Ser³³Cys и Ser³³Lys (таблица 5). Три аминокислотные замены в положении Ser³³ снижают сродство к IgG человека и SpA_{Q9,10K/S33X}: Ser³³Thr (K_A 0,386 x 10⁵ M⁻¹), Ser³³Glu (K_A 0,496 x 10⁵ M⁻¹) и Ser³³Ile (K_A 1,840 x 10⁵ M⁻¹) (таблица 6). Таким образом, замена некоторых аминокислот в Ser³³ увеличивает сродство между IgG человека и SpA_{Q9,10K/S33X}, тогда как другие либо нейтральны (не оказывают существенного влияния), либо уменьшают ассоциацию с IgG человека. Из тех, которые уменьшают аффинность между IgG человека, Ser³³Glu и Ser³³Thr, демонстрируют наибольшее снижение константы ассоциации (таблица 5).

Комбинирование аминокислотных замен в Gly29, Ser33 и Asp36,37 в кандидатных вакцинах SpA

По сравнению с одиночными аминокислотными заменами на Ser³³, вызывают ли комбинации аминокислотных замен в положениях Gly²⁹, Ser³³ или Asp^{36,37} IgBD дальнейшее снижение аффинности к IgG человека, или множественные замены вызывают парадоксальные эффекты, которые также могут повышать аффинность между двумя белками? Чтобы ответить на этот вопрос, изобретатели сравнивают константы ассоциации трех белков с аминокислотными заменами в положении Ser³³: SpA_{Q9,10K/S33E} (пониженная аффинность), SpA_{Q9,10K/S33F} (аффинность не изменена) и SpA_{Q9,10K/S33Q} (аффинность не изменена) - с теми, которые несут дополнительные аминокислотные замены в Gly²⁹ и/или Asp^{36,37} (таблица 6). Для SpA_{Q9,10K/S33E} (K_A 0,496 x 10⁵ M⁻¹), никакого дополнительного эффекта не наблюдается при добавлении замен Gly²⁹Ala (K_A 1,265 x 10⁵ M⁻¹), Gly²⁹Phe (K_A 1,575 x 10⁵ M⁻¹), Asp^{36,37}Ala (K_A 0,568 x 10⁵ M⁻¹), Gly²⁹Ala/Asp^{36,37}Ala (K_A 1,892 x 10⁵ M⁻¹) или Gly²⁹Arg (K_A 4,840 x 10⁵ M⁻¹). Однако, объединение Asp^{36,37}Ala либо с Gly²⁹Phe (K_A 14,850 x 10⁵ M⁻¹), либо с Gly²⁹Arg (K_A 10,240 x 10⁵ M⁻¹) повышает аффинность SpA_{Q9,10K/S33E} к IgG человека (таблица 7). При анализе для SpA_{Q9,10K/S33F} (K_A 3,902 x 10⁵ M⁻¹), константа ассоциации которого существенно не отличается от константы ассоциации SpA_{ККАА}, авторы изобретения наблюдают аналогичные эффекты. Ни одна из замен не изменила аффинность SpA_{Q9,10K/S33F} для IgG человека, за исключением случаев, когда Asp^{36,37}Ala комбинируют либо с Gly²⁹Phe (SpA_{Q9,10K/S33Q/D36,37A/Gly29F} K_A 12,470 x 10⁵ M⁻¹), что в настоящем документе снова увеличивает аффинность исходной вакцины к IgG человека (таблица 7). Таким образом, комбинирование аминокислотных замен на Gly²⁹, Ser³³ и Asp^{36,37} SpA-IgBD, предсказуемым образом не снижают аффинность к IgG

человека. В каждом случае, аффинность кандидатной рекомбинантной вакцины SpA необходимо определять экспериментально.

SpA-KR представляет собой вариант SpA_{ККАА} с двумя дополнительными аминокислотными заменами в E домене IgBD, который несет N-концевое удлинение из шести остатков с аминокислотной последовательностью ADAQQN (Международная патентная заявка WO 2015/144653 AI). Изобретатели - Fabio Bagnoli, Luigi Fiaschi и Maria Scarselli (Glaxo-SmithKline INC.) - предположили, что два глутаминовых остатка (QQ) в гексапептидном удлинении E домена SpA_{ККАА} могут представлять собой дополнительный сайт связывания IgG человека, не уточняя, где эти остатки могут связываться с иммуноглобулином, т. е. тяжелыми цепями Fc γ или V_{H3}, или обеспечивая экспериментальное доказательство такого связывания. При анализе его аффинности к IgG человека, константа ассоциации SpA-KR (K_A $5,464 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) существенно не отличалась от таковой для SpA_{ККАА}, что свидетельствует о том, что SpA-KR может также проявлять перекрестно-сшивающую активность в отношении V_{H3}-IgG (таблица 7). SpA_{RRVV} представляет собой вариант вакцины SpA, который описан в патентной заявке EP3101027A1 (OLYMVAX INC.). Подобно SpA_{ККАА}, SpA_{RRVV} содержит аминокислотные замены в Gln^{9,10} и Asp^{36,37} каждого из пяти IgBD SpA, хотя эти замены заменяют Gln^{9,10} на аргинин (Arg или R) и Asp^{36,37} с валином (Val или V). При анализе его аффинности к IgG человека, константа ассоциации SpA_{RRVV} (K_A $5,609 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) аналогична константе SpA_{ККАА}, что свидетельствует о том, что SpA_{RRVV} может также проявлять активность перекрестного связывания для V_{H3}-IgG (таблица 7).

Перекрестно-сшивающая активность вариантов вакцины SpA для V_{H3}-идиотипических и Fab-фрагментов IgG человека

Ключевым вопросом безопасности для клинической разработки вакцин SpA является отсутствие активности перекрестного связывания с V_{H3}-идиотипическими IgE и IgG на поверхности базофилов и тучных клеток, что в противном случае вызывает высвобождение гистамина и анафилаксию (140, 142, 145). Для количественной оценки V_{H3}-перекрестно-сшивающей активности кандидатных вакцин SpA, авторы изобретения используют очищенный IgG человека (54% тяжелых цепей V_{H3}-идиотипического варианта), переваренный папаином, и V_{H3}-клональные Fab фрагменты, очищенные аффинной хроматографией на SpA_{КК} (75) (таблица 8). При исследовании с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для измерения аффинности с SpA и его вариантами, IgBD белка A дикого типа (SpA) проявляют мощную перекрестно-сшивающую активность (K_A $1,44 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, таблица 8). Аффинность для V_{H3}-Fab уменьшается для SpA_{ККАА} (K_A $8,27 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) и SpA-KR (K_A $6,42 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), хотя оба варианта сохраняют значительную перекрестно-сшивающую активность по сравнению с SpA_{Q9,10K/S33E} (K_A $41,24 \text{ M}^{-1}$) и SpA_{Q9,10K/S33T} (K_A $43,55 \text{ M}^{-1}$) (таблица 8). SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} проявляют свойства связывания, сходные с контролем PBS (*m.e.* значения, полученные без добавления лиганда). Таким образом, аминокислотные замены Ser³³Glu и Ser³³Thr устраняют перекрестно-сшивающую активность V_{H3}-IgE и V_{H3}-IgG в

кандидатных вакцинах SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T}, соответственно.

Fcγ-связывающая активность вариантов вакцины SpA

Deisenhofer раскрыл кристаллическую структуру домена SpA В (IgBD-B), связанного с Fcγ человека, и определил интерфейс между двумя молекулами (154). Четыре водородные связи способствуют взаимодействию между SpA (нумерация домена В, фигура 20В) и Fcγ: Gln⁹ (IgG Ser²⁵⁴), Gln¹⁰ (IgG Gln³¹¹), Asn¹¹ (IgG Asn⁴³⁴) и Tyr¹⁴ (IgG Leu⁴³²) (54). Эти остатки В домена консервативны во всех пяти IgBD (фигура 20), что подразумевает универсальный механизм связывания Fcγ (43). В более ранних работах было показано, что замена Gln^{9,10}Lys в IgBD-D или во всех пяти IgBD SpA снижает связывание SpA_{КК} (SpA_{Q9,10К}) с IgG Fcγ человека, мыши и морской свинки (76, 43). Поскольку недавно сконструированные варианты SpA-вакцины, SpA_{Q9,10К/S33E} и SpA_{Q9,10К/S33T}, сохраняют аминокислотные замены Gln^{9,10}Lys в своих пяти IgBD, авторы изобретения предположили, что эти варианты также должны проявлять значительные дефекты связывания с Fcγ человека. Для подтверждения этой гипотезы, изобретатели используют очищенный IgG человека, переваренный папаином, и очищенные полученные фрагменты Fcγ (таблица 9). При исследовании с использованием биослойного интерферометра (BLI) для измерения аффинности с SpA и его вариантами, IgBD белка А дикого типа проявляют высокую аффинность к Fcγ (K_A 5,17×10⁷ М⁻¹). Fcγ-связывающая активность устранена для SpA_{ККАА} (K_A 32,68 М⁻¹), SpA-KR (K_A 39,12 М⁻¹), SpA_{Q9,10К/S33E} (K_A 32,68 М⁻¹) и SpA_{Q9,10К/S33T} (K_A 39,91 М⁻¹), соответственно. Таким образом, замены Ser³³Glu и Ser³³Thr не нарушают действие Gln^{9,10}Lys на связывание Fcγ в спирали 1 SpA_{Q9,10К/S33E} and SpA_{Q9,10К/S33T} (таблица 9).

Мышиная модель анафилактической активности кандидатных вакцин SpA

Клинические и экспериментальные исследования показали, что гиперпроницаемость сосудов является отличительной чертой анафилаксии (155, 156). Активированные тучные клетки или базофилы высвобождают вазоактивные медиаторы, включая гистамин и фактор активации тромбоцитов, которые индуцируют анафилактическую реакцию гиперпроницаемости сосудов, вызывая вазодилатацию и нарушение эндотелиального барьера (156). Эти события можно измерить на мышинной модели анафилактической сосудистой гиперпроницаемости в виде экстравазации внутривенно введенного красителя Evans Blue в экспериментальные участки (ткани уха), примированные за 24 часа до этого с помощью внутрикожной инъекции 2 мкг V_{H3}-идиотипический IgG человека (157). Затем проводят количественную оценку просачивания Evans Blue из сосудов в ткань уха (нг красителя/мг ткани) в когортах из пяти животных, рассчитывают средние значения и стандартное отклонение (СО), и данные анализируют на наличие статически значимых различий. Плазма мышей C57BL/6 дикого типа содержит только 5-10% иммуноглобулина тяжелыми цепями V_{H3}-идиотипического варианта (48). По этой причине мыши, в отличие от морских свинок (20-30% тяжелых цепей V_{H3}-идиотипических вариантов), устойчивы к SpA-индуцированному анафилактическому шоку (140). Поэтому авторы изобретения выбрали мышей μMT для

своего исследования; у животных отсутствуют функциональные В-клеточные рецепторы IgM, развитие В-клеток останавливается на стадии пре-В-клеток, и они не могут продуцировать IgG в плазме (158). Мышей μ MT используют в качестве реципиентов для внутрикожной инъекции 2 мкг V_{H3} -идиотипического IgG человека в ткань уха. Через 24 часа мышам внутривенно вводят 200 мкг SpA, вариантов вакцины SpA или буферного контроля (PBS). Через пять минут после обработки SpA, мышам внутривенно вводят 2% раствор Evans Blue для оценки проницаемости сосудов в тканях уха. Через 30 минут животных подвергают эвтаназии, ткань уха вырезают, сушат и экстрагируют формамидом для спектрофотометрического количественного определения красителя. По сравнению с PBS контролем [34,73 (\pm) 8,474 нг Evans Blue/мг ткани уха], обработка SpA вызывает анафилактическую гиперпроницаемость сосудов, выделяя 124,9 нг/мг (\pm 26,54 нг/мг) Evans Blue (PBS к SpA, $P < 0,0001$) (фигура 22). В когортах животных, предварительно обработанных внутрикожной инъекцией V_{H3} -IgG человека, внутривенное введение SpA_{ККАА} также вызывает гиперпроницаемость сосудов [70,31 нг/мг (\pm 23,04 нг/мг); PBS к SpA_{ККАА}, $P < 0,01$], хотя и на более низком уровне, чем SpA дикого типа (SpA к SpA_{ККАА}, $P < 0,0001$) (фигура 22). Напротив, внутривенное введение 200 мкг SpA_{Q9,10K/S33E} [38,57 нг/мг (\pm 15,07 нг/мг); SpA_{Q9,10K/S33E} к PBS, не существенно] или SpA_{Q9,10K/S33T} [41,43 нг/мг (\pm 13,15 нг/мг); SpA_{Q9,10K/S33T} к PBS, не существенно] не вызывает гиперпроницаемость сосудов в местах, обработанных V_{H3} -идиотипическим IgG человека у мышей μ MT (фигура 22). В качестве сравнения, кандидатная вакцина SpA-KR вызывает анафилактическую гиперпроницаемость сосудов, сходную с гиперпроницаемостью SpA_{ККАА} (фигура 22). Таким образом, в отличие от SpA и SpA_{ККАА}, которые вызывают гиперпроницаемость сосудов через перекрестное связывание V_{H3} -идиотипического IgG, связанное с активирующим Fc ϵ RI на тучных клетках и базофилах или Fc γ R на других эффекторных клетках, SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} не могут перекрестно сшивать V_{H3} -идиотипический IgG, чтобы вызвать анафилактические реакции у мышей μ MT в местах, предварительно обработанных V_{H3} -идиотипическим IgG человека.

Перекрестное сшивание кандидатной вакцины SpA V_{H3} -IgE

Базофилы и тучные клетки являются двумя основными эффекторными клетками анафилактических ответов и секретируют провоспалительные медиаторы при антиген-опосредованном перекрестном сшивании IgE с их поверхностными рецепторами Fc ϵ RI. Штамм *S. aureus* Cowan I, экспрессирующий SpA в избытке или растворимый очищенный SpA, может активировать базофилы, чтобы индуцировать высвобождение гистамина. Этот стимулирующий эффект зависит от Fab связывающей активности белка A (145). Для изучения потенциального эффекта перекрестного сшивания кандидатных вакцин SpA с циркулирующими IgE или IgG, связанными на поверхности базофилов, добавляют варианты вакцины, очищенные в PBS, к свежеполученной крови человека, антикоагулированной ЭДТК в течение 30 мин. SpA дикого типа используют в качестве положительного контроля. PBS используют в качестве отрицательного контроля. Клетки окрашивают анти-CD123, анти-CD203с, анти-HLA-DR (удаление дендритных клеток и

моноцитов) и анти-CD63. Базофилы идентифицируют путем гейтирования для SSC^{low}CD203c⁺/CD123⁺/HLA-DR⁻ клеток. Активация базофилов CD123 выражается как доля CD63, и корректируется на отрицательный и положительный контроли. По сравнению с контролем PBS (4,39% активированных базофилов), обработки SpA или SpA_{ККАА} вызывают значительное увеличение CD63⁺ активированной популяции базофилов, 32,05% (PBS к SpA, P<0,0001) и 10,66% (PBS к SpA_{ККАА}, P<0,01), соответственно (таблица 10). В отличие от SpA_{ККАА}, SpA_{Q9,10K/S33E} [5,38%; SpA_{Q9,10K/S33T} к SpA_{ККАА}, P<0,05] или SpA_{Q9,10K/S33T} [4,57%; SpA_{Q9,10K/S33T} к SpA_{ККАА}, P<0,01] были неспособны активировать базофилы и вели себя так же, как контроль PBS (таблица 10). В этом анализе, кандидатные вакцины SpA-KR [8,15%] и SpA_{RRVV} [10,16%] показали активацию базофилов, аналогичную SpA_{ККАА}. Таким образом, SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} не могут перекрестно сшивать циркулирующие в крови IgE и не могут сенсibiliзировать базофилы путем связывания высокоаффинных рецепторов FcεRI. В отличие от SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T}, SpA_{ККАА}, SpA-KR и SpA_{RRVV} кандидатные вакцины сохраняют значительную активность в отношении перекрестного связывания IgE, что инициирует нежелательную системную анафилактическую реакцию.

Функциональный ответ тучных клеток измеряют с помощью запускаемой антигеном β-гексозаминидазы и высвобождения гистамина. Для этого анализа используют линию тучных клеток человека LAD2. Тучные клетки (2x10⁵ клеток/мл) сенсibiliзируют после инкубации в течение ночи со 100 нг/мл VH3 IgE до стимуляции вариантами вакцины SpA (10 мкг) в течение 30 минут, и измеряют высвобождение β-гексозаминидазы (фигура 23А) или гистамина (фигура 23В). Инкубация с SpA дикого типа индуцирует примерно 35% высвобождения β-гексозаминидазы. SpA_{ККАА} и SpA-KR вакцины вызывают 10,32% и 9,87% высвобождения β-гексозаминидазы, соответственно, без существенной разницы (SpA-KR к SpA_{ККАА}, не существенно). Эти снижения являются существенными при сравнении с SpA дикого типа (SpA к SpA_{ККАА}, P<0,0001; SpA к SpA-KR, P<0,0001). Еще, SpA_{ККАА} и SpA-KR вакцины сохраняют активность высвобождения β-гексозаминидазы выше уровней отрицательного контроля (SpA_{ККАА} к PBS, P<0,0001; SpA-KR к PBS, P<0,0001) (фигура 23А). Для сравнения, SpA_{Q9,10K/S33E} [6,46%; SpA_{Q9,10K/S33E} к SpA_{ККАА}, P<0,01] и SpA_{Q9,10K/S33T} [4,43%; SpA_{Q9,10K/S33T} к SpA_{ККАА}, P<0,0001] вызывают значительно меньшее высвобождение β-гексозаминидазы по сравнению с SpA_{ККАА}. SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} демонстрируют такое же высвобождение β-гексозаминидазы, как контроль PBS (фигура 23А).

Аналогичные результаты получают при оценке высвобождения гистамина (фигура 23В). SpA стимулирует самый высокий уровень высвобождения гистамина, вакцины SpA_{ККАА} и SpA-KR сохраняют активность высвобождения гистамина выше контрольных уровней PBS, и обе, SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} ведут себя как PBS отрицательного контроля [SpA к PBS, или SpA_{ККАА}, или SpA-KR, или SpA_{Q9,10K/S33E}, или SpA_{Q9,10K/S33T}, P<0,0001; SpA_{ККАА} к SpA-KR или SpA_{Q9,10K/S33E}, не существенно; SpA_{ККАА} к SpA_{Q9,10K/S33T} или PBS, P<0,05; SpA_{Q9,10K/S33T} к SpA-KR, P<0,01].

В заключение, SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} утратили способность активировать тучные клетки, сенсibilизированные V_{H3}-идиотипическим IgE, и представляют собой кандидатные вакцины с профилем безопасности, подходящим для клинических испытаний на людях.

Иммуногенность и эффективность кандидатных вакцин SpA в модели колонизации *S. aureus*

По сравнению с когортами мышей C57BL/6, которые иммунизированы только адьювантом (имитация), иммунизация SpA_{ККАА} или SpA_{Q9,10K/S33E} или SpA_{Q9,10K/S33T} создает SpA-нейтрализующие антитела (фигура 25A). Как и ожидалось, иммунизация SpA_{ККАА} индуцирует деколонизацию *S. aureus* WU1 из носоглотки и желудочно-кишечного тракта мышей C57BL/6, начиная с 21 дня после интраназальной колонизации (фигуры 24A, 24B, 24C). Кроме того, у деколонизированных мышей, иммунизация SpA_{ККАА} ассоциирована с увеличением патоген-специфических IgG (включая анти-ClfB, анти-IsdA, анти-IsdB, анти-SasG) антител, которые ассоциированы с деколонизацией *S. aureus* [(102) и данные не показаны]. Сходные результаты наблюдают после иммунизации мышей C57BL/6 SpA_{Q9,10K/S33E}. По сравнению с имитированным контролем, вакцинация SpA_{Q9,10K/S33E} способствует деколонизации *S. aureus* WU1 из носоглотки и желудочно-кишечного тракта C57BL/6 аналогично вакцинации SpA_{ККАА} (фигура 24B, 24C). У деколонизированных мышей, вакцинация SpA_{Q9,10K/S33E} ассоциируется с повышением патоген-специфических IgG (включая анти-ClfB, анти-IsdA, анти-IsdB, анти-SasG; данные не показаны). По сравнению с животными, иммунизированными SpA_{ККАА}, вакцинация SpA_{Q9,10K/S33E} вызывает одинаковые уровни деколонизации *S. aureus*, что позволяет предположить, что две вакцины демонстрируют одинаковую защитную эффективность в модели колонизации мышей. Вакцинация SpA_{Q9,10K/S33T} вызывает аналогичные уровни деколонизации *S. aureus*, как и при вакцинации SpA_{ККАА} и SpA_{Q9,10K/S33E} (данные не показаны). Когда когорты животных иммунизируют в одни и те же дни SpA_{ККАА} или SpA_{Q9,10K/S33E} или SpA_{Q9,10K/S33T}, примерно 50% животных становятся деколонизированными в носоглотке и желудочно-кишечном тракте, в то время как все животные, получившие только адьювант (имитация), остаются колонизированными (Фигура 24D, 24E). Эти данные дополнительно демонстрируют, что все три кандидатные вакцины действуют аналогично в модели колонизации *S. aureus*.

Эффективность кандидатных вакцин SpA на мышинной модели инфекции *S. aureus* в кровотоке

Более ранняя работа показала, что иммунизация мышей BALB/C SpA_{ККАА} вызывает SpA-специфические антитела, которые защищают животных от внутривенного заражения кровотока MRSA USA300 LAC и последующего образования абсцессов в почечных тканях (43). По сравнению с ложно иммунизированными мышами (только адьювант), иммунизация SpA_{ККАА}, SpA_{Q9,10K/S33E} или SpA_{Q9,10K/S33T} вызывает значительно более высокий титр антител против SpA_{ККАА}, против SpA_{Q9,10K/S33E} или против SpA_{Q9,10K/S33T} (фигура 25A). Титры SpA-специфических антител, индуцированные

иммунизацией SpA_{ККАА} у мышей BALB/c, были значительно выше при анализе ELISA для SpA_{ККАА}, чем при анализе для SpA_{Q9,10K/S33E} или SpA_{Q9,10K/S33T} (SpA_{ККАА} к SpA_{Q9,10K/S33E}, $P < 0,0001$; SpA_{ККАА} к SpA_{Q9,10K/S33T}, $P < 0,0001$). Аналогичным образом, титры SpA-специфических антител, индуцированные иммунизацией SpA_{Q9,10K/S33E} у мышей BALB/c, были значительно выше при анализе ELISA для SpA_{Q9,10K/S33E}, чем при анализе для SpA_{ККАА} или SpA_{Q9,10K/S33T} (SpA_{ККАА} к SpA_{Q9,10K/S33E}, $P < 0,001$; SpA_{Q9,10K/S33E} к SpA_{Q9,10K/S33T}, $P < 0,05$), в то время как SpA-специфические титры антител, индуцированные иммунизацией SpA_{Q9,10K/S33T} у BALB/c мышей были значительно выше при анализе ELISA SpA_{Q9,10K/S33T}, чем при анализе SpA_{ККАА} или SpA_{Q9,10K/S33E} (SpA_{ККАА} к SpA_{Q9,10K/S33T}, $P < 0,05$; SpA_{Q9,10K/S33E} к SpA_{Q9,10K/S33T}, $P < 0,05$) (Фигура 25А). Эти результаты позволяют предположить, что некоторые, но не все, эпитопы антител, продуцируемых SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T}, при вакцинации BALB/c мышей отличаются от полученных при вакцинации SpA_{ККАА}, и *наоборот*. Как сообщалось ранее (43), по сравнению с ложно иммунизированными мышами, вакцинация SpA_{ККАА} снижает бактериальную нагрузку MRSA USA300 LAC и количество абсцессов у BALB/c мышей (фигура 25В; $P < 0,0001$). Вакцинация SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} обеспечивает аналогичную защиту от инфекции кровотока MRSA USA300 LAC по сравнению с вакцинацией SpA_{ККАА}. По сравнению с ложно иммунизированными животными, иммунизация SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} снижает бактериальную нагрузку и количество абсцессов у мышей BALB/c (фигура 25С; $P < 0,0001$). Таким образом, вакцинация SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} вызывает аналогичную защиту против инфекции кровотока MRSA USA300 LAC и связанного с ней абсцесса у мышей, как ранее сообщалось для кандидатной вакцины SpA_{ККАА} (43).

Связывание кандидатных вакцин SpA с SpA-нейтрализующим моноклональным антителом 3F6

Моноклональное антитело гибридомы мыши (hMAb) 3F6 (IgG2a) получают с использованием спленоцитов мышей BALB/c, иммунизированных SpA_{ККАА} (84). Ген hMAb 3F6 секвенируют и клонируют в вектор экспрессии для очистки рекомбинантного rMAb 3F6 из HEK293 F клеток (146). Как hMAb3F6, так и rMAb 3F6 связываются с тройным спиральным изгибом каждого из пяти SpA IgBD (E, D, A, B и C) и нейтрализуют их способность связывать IgG или IgM человека (84, 146). Внутривенное введение hMAb3F6 или rMAb 3F6 в дозе 5 мг/кг защищает мышей BALB/c от почечного абсцесса, связанного с инфекцией кровотока *S. aureus*, и бактериальной репликации (бактериальной нагрузки) (84, 146). Далее, внутривенное введение rMAb 3F6 (5 мг/кг) мышам C57BL/6 индуцирует деколонизацию *S. aureus* WU1 из носоглотки и желудочно-кишечного тракта предварительно колонизированных животных (146). В настоящем документе, изобретатели задали вопрос, связывает ли rMAb 3F6 SpA SpA_{Q9,10K/S33E} или SpA_{Q9,10K/S33T} с такой же аффинностью, как SpA_{ККАА}, родственный антиген, из которого получено моноклональное антитело (84). При измерении ELISA с фиксированными концентрациями лигандов и серийными разведениями rMAb 3F6, авторы изобретения получили константы аффинности SpA_{ККАА} ($K_a 1.51 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) SpA_{Q9,10K/S33E} ($K_a 1.42 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$)

¹) and SpA_{Q9,10K/S33T} (K_a $1.34 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) для связывания с вакцинами-кандидатами SpA (Фигура 26). Эти данные предполагают, что аминокислотные замены Ser³³Glu и Ser³³Thr не влияют на связывание гMAb 3F6, нейтрализующего SpA. Кроме того, аминокислотные замены Ser³³Glu и Ser³³Thr не разрушают защитный SpA эпитоп, что определяется связыванием гMAb 3F6.

Обсуждение

Авторы настоящего изобретения показывают, что кандидатные вакцины против *S. aureus* - SpA_{ККАА} и SpA-KR - сохраняют значительное связывание с V_{H3}-идиотипическим иммуноглобулином при использовании в качестве лиганда F(ab)2 фрагмента IgG человека. При анализе тучных клеток человека (клетки LAD2), покрытых V_{H3}-IgG, SpA_{ККАА} и SpA-KR запускают перекрестное сшивание V_{H3}-Ig, что измеряется высвобождением β -гексозаминидазы и гистамина (145). В мышинной модели анафилактической сосудистой гиперпроницаемости, биологические эффекты такого высвобождения гистамина можно измерить как экстравазацию красителя Evans Blue в анатомические участки введения V_{H3}-IgG у мышей μ MT. Вместе эти наблюдения вызывают опасения по поводу безопасности кандидатных вакцин SpA как потенциальных активаторов анафилактических реакций у людей.

Чтобы решить проблемы, связанные с вакцинами SpA, изобретатели сконструировали два новых антигена, SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T}, с улучшенными профилями безопасности. SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} не имеют аффинности для V_{H3}-идиотипических иммуноглобулинов, демонстрируют сниженную или отсутствующую активность в отношении высвобождения гистамина из тучных клеток человека, покрытых V_{H3}-IgE, и не способствуют экстравазации красителя Evans Blue в ответ на инъекцию V_{H3}-IgG мышам μ MT. Иммунизация BALB/c мышей SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} вызывает такие же уровни SpA-специфических IgG ответов, как SpA_{ККАА}. При анализе эффективности вакцины на мышинных моделях, вакцинация SpA_{Q9,10K/S33E} или SpA_{Q9,10K/S33T} обеспечивает такие же уровни защиты от колонизации *S. aureus* или инвазивной инфекции кровотока, как и вакцина SpA_{ККАА} (43). Кроме того, аминокислотные замены Ser³³Glu и Ser³³Thr не нарушают защитные эпитопы IgBD, которые определены колонизацией *S. aureus* - и инвазивное, защищающее от заболевания моноклональное антитело 3F6 (84, 146). Основываясь на этих наблюдениях, авторы изобретения выдвинули гипотезу о том, что кандидатные вакцины против *S. aureus* SpA_{Q9,10K/S33E} и SpA_{Q9,10K/S33T} могут быть пригодны для разработки в качестве вакцин клинического класса для клинической безопасности и тестирования эффективности против колонизации *S. aureus* и инвазивного заболевания.

Материалы и способы

Бактериальные штаммы и условия роста. Штаммы *S. aureus* USA300 (LAC) и WU1 выращивают в триптическом соевом бульоне (TSB) или триптическом соевом агаре (TSA) при 37°C. Штаммы *Escherichia coli* DH5 α и BL21(DE3) выращивают при 37°C в среде лизогенного бульона (LB) с 100 мкг/мл ампициллина и 1 mM изопропил- β -d-1-

тиогалактопиранозид (IPTG) для продуцирования рекомбинантных белков.

Конструирование вариантов SpA. Кодирующая последовательность вариантов SpA синтезирована компанией Integrated DNA Technologies, Inc. Последовательности и плазида pET15b+ расщеплены Nde I и Bam HI, соответственно. Затем два переваренных продукта лигированы и трансформированы в *Escherichia coli* DH5 α для создания клонов, экспрессирующих рекомбинантные белки с N-концевой гексагистидиновой (His6) меткой. Кандидатные клоны подтверждают секвенированием ДНК. Правильные плазмиды трансформируют в *E. coli* BL21 (DE3) для продуцирования кандидатных вариантов SpA.

Очистка белков. Культуры *E. coli* (2 литра), выращенные в LB с добавлением ампициллина и IPTG до поглощения при 600 нм (A600) 2,0, центрифугируют (10000 x g в течение 10 минут). Осажденные клетки суспендируют в буфере А (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl), и полученные суспензии лизируют в прессе Френча при 14000 фт./д² (Thermo Spectronic, Rochester, NY). Неразрушенные клетки удаляют центрифугированием (5000 x g, 15 минут), и сырые лизаты подвергают ультрацентрифугированию (100000 x g, 1 час при 4°C). Растворимые рекомбинантные белки подвергают гравитационной хроматографии на Ni-NTA агарозе (QIAGEN) с упакованной колонкой объемом 1 мл, предварительно уравновешенной буфером А. Колонки промывают 20 объемами слоя буфером А, 20 объемами слоя буфером А, содержащим 10 mM имидазола, и элюируют 6 мл буфера А, содержащего 500 mM имидазола. Аликвоты элюированных фракций смешивают с равными объемами буфера для образцов и разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле с 15% додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Рекомбинантные белки подвергают диализу против фосфатно-солевого буфера (PBS), и их концентрации определяют с помощью анализа с бицинхониновой кислотой (Pierce). Для исследований иммунизации на животных и для инкубации с клеточными линиями, препараты рекомбинантных белков подвергают воздействию центрифугирующих колонок для удаления эндотоксинов (Pierce) для удаления загрязняющих LPS. Чистоту образцов проверяют с помощью набора для анализа эндотоксинов ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (Genscript).

Очистка антител. Для очистки VH3 IgG, плазму человека (20 мл), приготовленную с использованием цельной крови человека, подвергают аффинной хроматографии над смолой белка G (Genscript) для удаления IgM, IgD и IgA человека. Иммуноглобулины, элюированные из смолы белка G, подвергают второй аффинной хроматографии, SpA_{КК}-сопряженной смолой, для обогащения VH3 IgG [SpA_{КК} не может связывать Fc γ домен IgG (48)]. Смолу белка G и SpA_{КК}-сопряженную смолу промывают 20 колоночными объемами PBS, и связанные белки элюируют 0,1 М глицином, pH 3,0, нейтрализуют 1 М трис-HCl, pH 8,5, и диализуют против PBS в течение ночи. Для очистки VH3 IgE, клеточную линию человека HEK 293F используют для временной экспрессии pVITRO1-Транстузумаб-IgE-к. Клетки выращивают в среде DMEM/HIGH GLUCOSE с 10% FCS, 2 mM глутамина, пенициллином (5000 ЕД/мл) и стрептомицином (100 мкг/мл). Клетки, трансфицированные pVITRO1-Транстузумаб-IgE-к с использованием PEI,

инкубируют при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для стабильной экспрессии IgE, клетки культивируют в среде Freestyle 293, в течение 7 дней и собирают при 12000 x g в течение 20 минут. Супернатант очищают над 2 мл смолы белка L (Genscript). Смолу промывают 20 колоночными объемами PBS и связывают VH3 IgE, элюируя 0,1 М глицином, pH 3,0, нейтрализуют 1 М Tris-HCl, pH 8,5, и диализуют против PBS в течение ночи.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Эксперименты SPR, показанные в таблицах 5, 6, 7 и 9, проводят на ProteOn™ XPR36 с чипом ProteOn HTG. Подвижным буфером является PBS с 0,05% Tween-20. Поверхности сенсорного чипа активируют с 2 мМ сульфатом никеля и регенерируют 300 мМ ЭДТК, соответственно. 500 нМ тестируемых изделий (SpA дикого типа или вариантов) иммобилизуют при скорости потока 25 мкл/мин. Для измерения взаимодействия с SpA дикого типа, лиганды (очищенные иммуноглобулины) используют в концентрациях 500, 400, 300, 200 и 100 нМ. Для измерения взаимодействия с вариантами SpA, лиганды используют в концентрациях 4, 3, 2, 1 и 0,5 мкМ. Скорости ассоциации и диссоциации измеряют при непрерывной скорости потока 30 мкл/мин и анализируют с использованием модели бистабильной реакции. Константы ассоциации определяют из трех независимых экспериментов.

Биослойная интерферометрия (BLI). Эксперимент BLI, показанный в таблице 9, проводят с использованием биослойного интерферометра BLItz. Тестируемые кандидаты (25-50 нМ) иммобилизуют на датчике Ni-NTA в течение 120 секунд. Датчик уравнивают PBS в течение 80 секунд, погружают в растворы, содержащие лиганд в концентрациях 20, 15, 10 и 0 мкМ в течение 120 секунд (фаза ассоциации), затем на 120 секунд в PBS (фаза диссоциации). Данные получают с использованием программного обеспечения для сбора данных BLI 9.0 (FortéBIO) и анализируют с использованием программного обеспечения для анализа данных 9.0.0.14 (FortéBIO). Сообщаемые значения ассоциации рассчитывают из подогнанной модели кривых.

Иммуноферментный анализ (ELISA). Титровальные микропланшеты (NUNC MaxiSorp) покрывают очищенными антигенами при 1 мкг/мл (для измерения титров антител в тестируемых сыворотках) или при 0,5 мкг/мл (для измерения взаимодействия с антителами 3F6) в 0,1 М карбонатном буфере (pH 9,5) при 4°C в течение ночи. Лунки блокируют и инкубируют с тестируемой сывороткой или антителами 3F6 перед инкубацией с конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) IgG мыши или человека (1 мкг/мл, Jackson ImmunoResearch). Все планшеты инкубируют со специфическими вторичными антителами мыши, конъюгированными с HRP (Fisher Scientific) и проявляют с использованием реагента OptEIA (BD Biosciences). Полумаксимальные титры рассчитывают с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Константу ассоциации рассчитывают по модели нелинейной регрессии (подгонка кривой) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Все эксперименты проводят в трех повторах для расчета средних значений и стандартной ошибки среднего, и повторяют для воспроизводимости.

Анафилактический ответ у мышей μ MT. Мышей с мутацией μ MT приобретают

в Jackson Laboratory и разводят в Чикагском университете. Когорты из 5 шестинедельных самок мышей на группу сенсibilизируют внутрикожной инъекцией в ухо VH3 IgG (2 мкг в 20 мкл PBS) и через 24 часа внутривенно под наркозом вводят кетамин-ксилазин (100 мг - 20 мг/кг) в периорбитальный венозный синус правой глаза с PBS, SpA или его вариантами (200 мкг в 100 мкл PBS). После 5-минутной стимуляции тестируемым препаратом, животным внутривенно вводят в периорбитальный венозный синус левого глаза 100 мкл 2% Evans blue. Животных умерщвляют, уши рассекают, сушат и экстрагируют в формамиде в течение 24 часов при 65°C. Экстравазацию Evans blue в ткани уха (сосудистую проницаемость) количественно определяют путем измерения поглощения при 620 нм.

Эксперименты по активации базофилов человека. Кровь (10 мл) получают от здоровых доноров и немедленно смешивают с 1 мл ЭДТК 0,1 М, pH 7,5. SpA дикого типа или кандидатные варианты вакцин (1 мкг) или PBS добавляют к 1 мл ЭДТК аликвотам крови, и образцы инкубируют в течение 1 часа при 37°C при вращении. Аликвоты образцов обрабатывают буфером для лизиса RBC (Biolegend), центрифугируют (350 x g) и супернатанты удаляют. Осадки в дебрисах промывают холодным PBS и ресуспендируют в PBS с 5% FBS для окрашивания анти-CD123-FITC, анти-HLA-DA-PerCP, анти-CD63-PE и анти-CD203c-APC (Biolegend) в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин. Все окрашенные образцы анализируют с использованием BD LSRII 3-8 (BD Biosciences). Общее количество базофилов получают путем гейтирования из SSc^{low}/CD203c⁺/CD123⁺/HLA-DR-клеток, и активированные базофилы выбирают из пула CD63⁺CD203c⁺. Эксперименты проводят в трех повторах и повторяют по меньшей мере три раза с использованием разных здоровых доноров.

Дегрануляция тучных клеток. Тучные клетки человека (LAD2) [любезно предоставленные Dr. Kirshenbaum из NIAID] сенсibilизируют путем инкубации 2×10^5 клеток с 100 нг VH3 IgE в течение ночи при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки собирают и дважды промывают буфером HEPES, содержащим 0,04% сывороточного альбумина крупного рогатого скота (BSA) для удаления свободного IgE. Клетки суспендируют в том же буфере в концентрации 2×10^5 клеток/мл и стимулируют SpA или тестируемыми образцами в течение 30 мин перед анализом на высвобождение β-гексозаминидазы и гистамина. Клетки осаждают, и отработанную среду переносят в свежую пробирку, в то время как клетки в дебрисе лизируют 0,1% Triton X-100. Активность β-гексозаминидазы в отработанной среде и Triton X-100 лизированных клетках измеряют, добавляя колориметрический субстрат pNAG (п-нитрофенил-N-ацетил-β-D-глюкозаминид, полученный от Sigma; конечная концентрация 3,5 мг/мл при pH 4,5) в течение 90 мин. Реакцию гасят добавлением 0,4 М глицина pH 10,7 и записывают поглощение при λ=405 нм. Результаты выражают в виде доли содержания β-гексозаминидазы, высвобождаемой в отработанной среде, по отношению к общему количеству (отработанная среда+клетки, лизированные Triton X-100). Эксперименты проводят в трех повторах и повторяют по меньшей мере три раза. Гистамин измеряют с применением ферментного иммуноанализа

(SpiBio Bertin Pharma). Коротко, лунки титровального микропланшета покрывают антигистаминным антителом мыши и инкубируют в течение 24 часов с меченым веществом (ацетилхолинэстераза, связанная с гистамином), смешанным с экспериментальным экстрактом. Планшеты промывают и реагент Элмана (ацетилхолинэстеразный субстрат) добавляют в лунки. Образование продукта определяют записью абсорбции при 412 нм. Абсорбция при 412 нм пропорциональна количеству меченого вещества, связанного с лункой, и обратно пропорциональна количеству гистамина, присутствующего в экспериментальном экстракте. Все пробы проводят дважды.

Активная иммунизация мышей. Животных BALB/c или C57BL/6J (возраст 3 недели, самки мышей, 15 животных в группе) иммунизируют PBS или 50 мкг очищенного свободного от эндотоксинов белка SpA_{ККАА} или SpA_{Q9,10K/S33E} или SpA_{Q9,10K/S33T}, эмульгированного в соотношении 5:2:3 антиген:CFA:IFA и усиленного 50 мкг белков, эмульгированных в соотношении 1:1 антиген:IFA, через 11 дней после первой иммунизации. На 20 день у мышей берут кровь и собирают сыворотку для оценки титра антител к кандидатным вакцинам с помощью ELISA. На 21 день мышей либо инокулируют для колонизации носоглотки, либо инфицируют внутривенной инъекцией бактерий.

Колонизация носоглотки мыши. Ночные культуры штамма *S. aureus* WU1 разводят 1:100 в свежем TSB и выращивают в течение 2 ч при 37°C, как описано (102). Клетки центрифугируют, промывают и суспендируют в PBS. 10 иммунизированных самок мышей C57BL/6J на группу (Jackson Laboratory) анестезируют внутрибрюшинной инъекцией кетамина-ксилазина (100-20 мг/кг) и 1×10^8 КОЕ *S. aureus* (в объеме 10 мкл) пипетируют в правую ноздрю каждой мыши. С недельными интервалами после инокуляции, у мышей берут мазок из ротоглотки и образцы стула собирают и гомогенизируют в PBS. Образцы мазков и гомогенаты образцов стула распределяют на маннитно-солевом агаре (MSA) для подсчета бактерий. В конце эксперимента, у мышей берут кровь через пункцию перiorбитальной вены для получения сыворотки для анализа ответа на антитела с использованием матрицы стафилококкового антигена, как описано (43). Коротко, нитроцеллюлозные мембраны подвергают блоттингу с 2 мкг аффинно-очищенных стафилококковых антигенов. Мембраны блокируют 5% дегранулированным молоком и инкубируют с разведенной сывороткой мыши (разведение 1:10000) и IRDye 680-конъюгированным анти-мышинным IgG козы (Li-Cor). Интенсивность сигнала количественно определяют с использованием системы инфракрасной визуализации Odyssey (Li-Cor). Все эксперименты на животных проводят дважды. Двусторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критериями множественного сравнения Сидака (программное обеспечение GraphPad) проводят для анализа статистической значимости данных колонизации носоглотки и стула, ELISA и антигенной матрицы.

Модель абсцесса почки у мышей. Ночные культуры *S. aureus* USA300 (LAC) разводят 1:100 в свежем TSB и выращивают в течение 2 ч при 37°C. Стафилококки

осаждают, промывают и суспендируют в PBS. Инокулят количественно оценивают распределением аликвот образцов TSA и подсчетом колоний, образовавшихся при инкубации. Группы из 15 мышей BALB/c, иммунизированных свободным от эндотоксинов белком SpA_{ККАА} или SpA_{Q9,10K/S33E} или SpA_{Q9,10K/S33T}, приготовленным в PBS, или ложно иммунизированных (контроль PBS), анестезируют и инокулируют 5×10^6 КОЕ *S. aureus* USA300 (LAC) в периорбитальный венозный синус правого глаза. На 15 день после заражения, мышей умерщвляют ингаляцией CO₂. Обе почки удаляют, и стафилококковую нагрузку в одном органе анализируют путем гомогенизации почечной ткани с PBS, 0,1% Triton X-100. Серийные разведения гомогената наносили на TSA и инкубируют для образования колоний. Оставшийся орган исследуют с помощью гистопатологии. Коротко, почки фиксируют в 10% формалина в течение 24 ч при комнатной температуре. Ткани заливают в парафин, делают тонкие срезы, окрашивают гематоксилином-эозином и исследуют с помощью световой микроскопии для подсчета абсцессов. Все эксперименты на животных проводят дважды, и статистический анализ рассчитывают с помощью t-критериев (и непараметрических тестов) Graphpad Prism.

Заявление об этике. Эксперименты с кровью людей-добровольцев проводят в соответствии с протоколом, проверенным, одобренным и контролируемым Институциональным наблюдательным советом (IRB) Чикагского университета. Все эксперименты на мышах проводят в соответствии с институциональными рекомендациями после рассмотрения и утверждения экспериментального протокола Институциональным комитетом по биобезопасности (IBC) и Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC) Чикагского университета.

Статистический анализ. Для фигур 22, 23, 25 и таблиц 5-10, однофакторный ANOVA с апостериорным критерием (критерий множественного сравнения Бонферрони или Даннетта) используют для получения статистической значимости между средними значениями нескольких групп. Для фигуры 24, двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с критериями множественного сравнения Сидака (программное обеспечение GraphPad) проводят для анализа статистической значимости колонизации мышей и данных матрицы стафилококкового антигена. Все данные анализируют с помощью Prism (GraphPad Software, Inc.), и значения P менее 0,05 считаются значимыми.

Таблицы

Таблица 5: Измерения аффинности с кандидатными вакцинами SpA дикого типа, SpA_{ККАА} и SpA_{Q9,10K/G29X} и IgG человека[#]

SpA _{Q9,10K/G29X} ^a	K _A (x10 ⁵ M ⁻¹) ^b	CO (x10 ⁻⁵) ^c	P значение ^d
SpA _{Q9,10K/G29H}	1,435	0,2799	*
SpA _{Q9,10K/G29C}	1,743	0,8619	*
SpA _{Q9,10K/G29T}	1,982	0,9146	нс
SpA _{Q9,10K/G29Q}	2,057	0,9600	*

SpA _{Q9,10K/G29L}	3,146	1,3860	нс
SpA _{Q9,10K/G29E}	3,182	1,5300	нс
SpA _{Q9,10K/G29P}	3,396	1,4410	нс
SpA _{Q9,10K/G29F}	3,460	1,5860	нс
SpA _{Q9,10K/G29M}	3,893	0,7868	нс
SpA _{Q9,10K/G29V}	4,350	1,0830	нс
SpA _{Q9,10K/G29W}	4,508	0,7448	нс
SpA _{Q9,10K/G29D}	5,478	1,0150	нс
SpA _{Q9,10K/G29R}	6,056	0,9814	нс
SpA _{Q9,10K/G29N}	6,231	0,7696	нс
SpA _{Q9,10K/G29Y}	8,367	3,326	нс
SpA _{Q9,10K/G29S}	9,398	4,298	***
SpA _{Q9,10K/G29K}	9,738	2,345	**
SpA _{Q9,10K/G29I}	10,070	4,398	**
SpA _{Q9,10K/G29A}	11,310	3,119	***
SpA_{ККАА}	5,022	2,150	
SpA	1081	16,34	

^a Исследуемые образцы иммобилизуют на чипе Bio-Rad ProteOn HTG и подвергают измерениям поверхностного плазмонного резонанса с возрастающими концентрациями IgG человека и пропускают через каждый канал чипа. Данные анализируют из трех независимых экспериментальных определений.

^b Данные используют для получения константы ассоциации (K_A) для каждого тестируемого изделия.

^c Данные используют для получения стандартного отклонения (CO) для каждого тестируемого изделия.

^d Данные анализируют с помощью однофакторного ANOVA с критерием множественного сравнения Даннета между каждым тестируемым изделием и SpA_{ККАА}. Символы: нс, не существенно, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Таблица 6. Измерения аффинности с кандидатными вакцинами SpA дикого типа, SpA_{ККАА} и SpA_{Q9,10K/S33X} и IgG человека[#]

SpA _{Q9,10K/S33X} ^a	K_A ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$) ^b	CO ($\times 10^5$) ^c	P значение ^d
SpA _{Q9,10K/S33E}	0,496	0,0439	**
SpA _{Q9,10K/S33T}	0,386	0,1218	***
SpA _{Q9,10K/S33Y}	1,571	0,7497	нс

SpA _{Q9,10K/S33I}	1,840	1,1290	*
SpA _{Q9,10K/S33L}	2,051	0,7592	нс
SpA _{Q9,10K/S33W}	2,356	0,6373	нс
SpA _{Q9,10K/S33V}	2,471	1,2060	нс
SpA _{Q9,10K/S33H}	2,784	0,6087	нс
SpA _{Q9,10K/S33N}	3,066	1,0100	нс
SpA _{Q9,10K/S33M}	3,177	1,3750	нс
SpA _{Q9,10K/S33R}	3,463	1,7950	нс
SpA _{Q9,10K/S33D}	3,824	1,7100	нс
SpA _{Q9,10K/S33F}	3,902	1,8040	нс
SpA _{Q9,10K/S33Q}	4,068	2,8350	нс
SpA _{Q9,10K/S33P}	4,218	2,2560	нс
SpA _{Q9,10K/S33C}	4,577	0,6927	нс
SpA _{Q9,10K/S33K}	5,124	2,1810	нс
SpA _{Q9,10K/S33A}	10,540	5,0520	***
SpA _{Q9,10K/S33G}	11,180	5,2040	***
SpA_{ККАА}	5,022	0,0439	
SpA	1081 ⁻¹	16,34	

^a Исследуемые образцы иммобилизуют на чипе Bio-Rad ProteOn HTG и подвергают измерениям поверхностного плазмонного резонанса с возрастающими концентрациями IgG человека и пропускают через каждый канал чипа. Данные анализируют из трех независимых экспериментальных определений.

^b Данные используют для получения константы ассоциации (K_A) для каждого тестируемого изделия.

^c Данные используют для получения стандартного отклонения (CO) для каждого тестируемого изделия.

^d Данные анализируют с помощью однофакторного ANOVA с критерием множественного сравнения Даннета между каждым тестируемым изделием и SpA_{ККАА}. Символы: нс, не существенно, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Таблица 7. Константа ассоциации для связывания с IgG человека вариантов SpA_{Q9,10K/S33X} или Q9,10K/G29X в комбинации с другими аминокислотными заменами#

Исходный вариант	K_A ($\times 10^5 M^{-1}$) ^b	CO ^c	P значен ие ^d	Исходный вариант SpA с дополнительным	K_A ($\times 10^5 M^{-1}$) ^b	CO ($\times 10^5 M^{-1}$) ^c	P значен ие ^e
------------------	--	-----------------	--------------------------------	---------------------------------------	--	---	--------------------------------

SpA^a				и заменами^a			
SpAQ9,10K/ S33E	0,496	0,04 4	*	SpAQ9,10K/S33E/D36,37 A	0,568	0,1185	HC
				SpAQ9,10K/S33E/G29A	1,265	0,6947	HC
				SpAQ9,10K/S33E/D36,37 A/G29A	1,892	0,6793	HC
				SpAQ9,10K/S33E/G29F	1,575	0,4060	HC
				SpAQ9,10K/S33E/D36,37 A/G29F	14,850	13,480	***
				SpAQ9,10K/S33E/G29R	4,840	1,1960	HC
				SpAQ9,10K/S33E/D36,37 A/G29R	10,240	5,2600	*
SpAQ9,10K/ S33Q	4,068	2,83 5	HC	SpAQ9,10K/S33Q/D36,37 A	3,930	1,9290	HC
				SpAQ9,10K/S33Q/G29A	2,563	1,3670	HC
				SpAQ9,10K/S33Q/D36,37 A/G29A	4,893	3,8360	HC
				SpAQ9,10K/S33Q/G29F	1,275	0,7355	HC
				SpAQ9,10K/S33Q/D36,37 A/G29F	12,470	8,8810	*
				SpAQ9,10K/S33Q/G29R	2,333	0,4245	HC
				SpAQ9,10K/S33Q/D36,37 A/G29R	6,378	4,6820	HC
SpAQ9,10K/ S33F	3,902	1,80 4	HC	SpAQ9,10K/S33F/D36,37 A	3,634	2,6420	HC
				SpAQ9,10K/S33F/G29A	1,190	0,4299	HC
				SpAQ9,10K/S33F/D36,37 A/G29A	нераство римый		
				SpAQ9,10K/S33F/G29F	2,440	0,7657	HC
				SpAQ9,10K/S33F/D36,37 A/G29F	нераство римый		
				SpAQ9,10K/S33F/G29R	1,903	0,8693	HC
				SpAQ9,10K/S33F/D36,37 A/G29R	9,056	4,9730	*

SpA _{Q9,10K/S33K}	5,124	2,18 1	нс	SpA _{Q9,10K/S33K/D36,37A}	8,048	4,1050	нс
SpA _{Q9,10K/S33A}	10,540	5,05 2	***	SpA _{Q9,10K/S33A/D36,37A}	18,830	18,320	нс
SpA _{Q9,10K/G29F}	3,460	1,58 6	нс	SpA _{Q9,10K/G29F/D36,37A}	3,723	1,5100	нс
SpA _{Q9,10K/G29R}	6,056	0,98 1	нс	SpA _{Q9,10K/G29R/D36,37A}	6,808	3,6840	нс
SpA _{Q9,10K/G29A}	11,310	3,11 9	**	SpA _{Q9,10K/G29A/D36,37A}	1,78	0,5098	***
SpA-KR	5,464	0,76 7	нс				
SpA _{RRVV}	5,609	2,35 5	нс				
SpA _{ККАА}	5,022	2,15 0	-				

^a Исследуемые образцы иммобилизуют на чипе Bio-Rad ProteOn HTG и подвергают измерениям поверхностного плазмонного резонанса с возрастающими концентрациями IgG человека и пропускают через каждый канал чипа. Данные анализируют из трех независимых экспериментальных определений.

^b Данные используют для получения константы ассоциации (K_A) для каждого тестируемого изделия.

^c Данные используют для получения стандартного отклонения (CO) для каждого тестируемого изделия.

^{d,e} Данные анализируют с помощью однофакторного ANOVA с критерием множественного сравнения Даннета между каждым тестируемым изделием и SpA_{ККАА}^d и между тестируемым изделием (колонка 5) и исходной вакцины (колонка 1)^e. Символы: нс, не существенно, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Таблица 8. Константа ассоциации для связывания каждой комбинированной мутации с фрагментом F(ab)₂ IgG человека

SpA вариант ^a	K_A (M ⁻¹) ^b	CO ^c	P значение ^d
SpA	$1,44 \times 10^7$	$8,193 \times 10^6$	-
SpA _{ККАА}	$8,27 \times 10^4$	$2,76 \times 10^4$	-
SpA-KR	$6,42 \times 10^4$	$3,80 \times 10^4$	нс
SpA _{Q9,10K/S33E}	41,24	5,386	***

SpA _{Q9,10K/S33T}	43,55	5,737	***
----------------------------	-------	-------	-----

^a Исследуемые образцы иммобилизуют на чипе Bio-Rad ProteOn HTG и подвергают измерениям поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с возрастающими концентрациями F(ab)₂ фрагмента IgG человека. Данные анализируют из трех независимых экспериментальных определений.

^b Данные используют для получения константы ассоциации (K_A) для каждого тестируемого изделия.

^c Данные используют для получения стандартного отклонения (CO) для каждого тестируемого изделия.

^d Данные анализируют с помощью однофакторного ANOVA с критерием множественного сравнения Даннета между каждым тестируемым изделием и SpA_{ККАА}. Символы: нс, не существенно, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001; ****P<0,0001.

Таблица 9. Константа ассоциации для связывания каждой комбинации мутации с Fc_γ фрагментом IgG человека

SpA вариант ^a	K_A (M ⁻¹) ^b	CO ^c	P значение ^d
SpA	5,17x10 ⁷	8,995x10 ⁶	-
SpA _{ККАА}	32,91	16,291	-
SpA _{Q9,10K/S33E}	32,68	16,414	нс
SpA _{Q9,10K/S33T}	39,91	17,081	нс
SpA-KR	39,12	13,348	нс

^a Исследуемые образцы иммобилизуют на датчике Ni-NTA и подвергают биослойной интерферометрии (BLI) с увеличивающимися концентрациями Fc фрагмента IgG человека. Данные анализируют из трех независимых экспериментальных определений.

^b Данные используют для получения константы ассоциации (K_A) для каждого тестируемого изделия.

^c Данные используют для получения стандартного отклонения (CO) для каждого тестируемого изделия.

^d Данные анализируют с помощью однофакторного ANOVA с критерием множественного сравнения Даннета между каждым тестируемым изделием и SpA_{ККАА}. Символы: нс, не существенно, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001; ****P<0,0001.

Таблица 10. Активация базофилов человека кандидатными вариантами SpA и вакцины

SpA вариант/ PBS ^a	PBS	SpA	SpA _{КК} AA	SpA _{Q9,10K/S33} E	SpA _{Q9,10K/S33} T	SpA- KR	SpA _{RR} VV
%	4,39	32,05	10,66	5,38	4,57	8,15	10,16

активированных базофилов	±0,88 4	±0,91 9	±1,612	±0,318	±0,877	±1,018	±0,905
<i>P</i> значение к PBS ^b	-	****	**	нс	нс	нс	**
<i>P</i> значение к SpA _{ККАА} ^c		****	-	*	**	нс	нс

^a Тестируемые изделия инкубируют с базофилами человека, и данные отображают как долю активированных базофилов от общей популяции базофилов (100%).

^{b, c} Однофакторный ANOVA с критерием множественного сравнения Бонферрони проводят для статистического анализа, который сравнивает тестируемое изделие и PBS^b или тестируемое изделие и SpA_{ККАА}^c. Символы: нс, не существенно, **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001; *****P*< 0,0001.

Пример 4: Иммунные ответы, вызванные иммуногенными композициями, содержащими полипептид варианта SpA и димерный полипептид LukAB, с использованием модели инфицирования хирургической раны у мини-свиней.

Целью эксперимента является оценка того, обеспечивает ли комбинация антигена варианта SpA и мутантного димера LukAB защиту в модели инфицирования хирургической раны *S. aureus* у геттингенских мини-свиней. Тестируемый антиген варианта SpA (SpA*) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. Тестируемый мутантный димер LukAB содержит мутантный полипептид LukA с делецией аминокислотных остатков, соответствующих положениям 315-324 SEQ ID NO: 16, и полипептид LukB, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

Модель мини-свиней используют для оценки и иммуногенности (относительно образования антигенспецифических IgG), и эффективности кандидатных вакцин. Мини-свиней широко используют в исследованиях инфекционных заболеваний, поскольку их иммунная система и структура органов и кожи во многом аналогичны таковым человека (1-5). В модели, после инфицирования раны бактериями *S. aureus* развивается локальная инфекция во всех слоях мышц и кожи в области хирургического вмешательства, и также наблюдается диссеминация в другие внутренние органы и прогрессирование заболевания очень похоже на таковое у людей.

LukAB проявляет такую же токсичность к полиморфоядерным нейтрофилам (PMN) мини-свиней, как и к PMN человека, в отличие от сильно сниженной токсичности к PMN мышей или кроликов из-за видоспецифичности мишени токсина. Кроме того, из-за частого носительства стафилококковых видов свиньями, мини-свиньи часто имеют высокие уровни ранее существовавших антител к стафилококковым антигенам (включая LukAB и другие белки *S. aureus*), подобно взрослым людям и в отличие от большинства лабораторных грызунов. Таким образом, эта модель, вероятно, будет более надежным показателем потенциальной вакцинной защиты у людей, особенно для вакцин,

штам ма	комп лекс	еристи ка	ы		а SpA	омика))	
USA3 00	8	CP5 ⁻ MRSA LukAB ⁺ LukED ⁺ PVL ⁺ Hlg ⁺ Hla ⁺ Spa ⁺	-	Высокий	Высок ий	Умере н ный	Высок ий	Токси ч ный
CC398	398	CP5 ⁺ MSSA LukAB ⁺ LukED ⁻ PVL ⁻ Hlg ⁺ Hla ⁺ Spa ⁺	+	Умеренн ый	Умере н ный	Высок ий	Умере н ный/ низки й	Токси ч ный

Ответы антител, индуцированные против LukAB и SpA*

Упомянутые выше группы мини-свиней иммунизируют в трех случаях, с интервалом в три недели, LukAB (100 мкг) + адъювант, или SpA* (50 мкг) + адъювант, или комбинацией LukAB (100 мкг) и SpA* (50 мкг) + адъювант. Контрольную группу животных иммунизируют только адъювантом. Животных заражают *S. aureus* через три недели после третьей иммунизации. Образцы крови собирают перед каждой иммунизацией, до заражения и через равные промежутки времени до 8 дней после заражения (фиг. 27) и анализируют на ответ антител против LukAB и SpA* с помощью ELISA. Из-за коротких интервалов отбора образцов после заражения, на фиг. 28 показаны результаты только на 8 день после заражения. У животных, иммунизированных только адъювантом, измеримы низкие уровни анти-LukAB антител IgG, что указывает на присутствие ранее существовавших антител к LukAB (фиг. 28 А и С). Иммунизация SpA* + адъювантом приводит к таким же средним геометрическим титрам анти-LukAB антител, как и в контрольной группе адъюванта (фиг. 28). Иммунизация мини-свиней LukAB+адъювантом или LukAB+SpA* + адъювант приводит к более высоким средним геометрическим титрам анти-LukAB IgG по сравнению с контрольной группой адъюванта в обоих исследованиях после трех (день 0) иммунизации (фиг. 28, исследование 1, средние геометрические (GeoMean) титры в день 0: LukAB+адъювант: 222; LukAB+SpA* +

адъювант: 308; группа адъюванта: 32, $P > 0,05$; исследование 2, титры GeoMean в день 0: LukAB+адъювант: 1271; LukAB+SpA*+адъювант: 1671; группа адъюванта=159; $P=0,0181$ и $P=0,0103$, соответственно, к группе адъюванта). Эти результаты показывают, что иммунизация вакцинами, содержащими LukAB, индуцирует образование специфичных к LukAB антител IgG у мини-свиней. Уровни анти-LukAB антител одинаковые у животных, вакцинированных LukAB+адъювантом или LukAB+SpA* + адъювантом. Это указывает на то, что добавление SpA* не влияет на ответы против LukAB.

Мини-свиньи, иммунизированные только адъювантом или LukAB+адъювантом, не имеют измеримых антител против SpA* в любой момент времени. SpA* + адъювант или SpA* + LukAB+адъювант индуцируют значительно повышение анти-SpA* IgG после трех иммунизаций (исследование 1: GeoMean IgG в группе SpA* + адъювант: 217 и группе SpA* + LukAB+адъювант 268. Исследование 2: GeoMean IgG в группе SpA* + адъювант: 100 и группе SpA* + LukAB+адъювант: 71) Эти результаты указывают на индукцию SpA*-специфических антител вакцинами SpA* + адъювант или SpA* + LukAB+адъювант. Это указывает на отсутствие влияния на ответ на SpA* при добавлении LukAB.

Нейтрализация цитотоксической активности токсина LukAB

LukAB представляет собой токсин, который связывается с рецепторами на нейтрофилах, где он образует поры в мембране и приводит к лизису клетки. Для оценки функциональности антител, индуцированных тестируемыми вакцинами, измеряют способность сыворотки вакцинированных мини-свиней ингибировать индуцированный токсином LukAB лизис клеток THP-1. Токсин LukAB дикого типа в анализе получают из клонального комплекса CC8, который гомологичен клональному комплексу LukAB, используемому в вакцине (LukAB CC8 дельта 10C). Фоновые титры IC₅₀ являются определяемыми у мини-свиней, вакцинированных только адъювантом (Исследование 1: День 0 GeoMean IC₅₀=95; Исследование 2: День 0 GeoMean IC₅₀=363). У животных, вакцинированных LukAB+адъювантом или LukAB+SpA* + адъювантом, значительно более высокие GeoMean IC₅₀ титры измеряют после трех иммунизаций (GeoMean IC₅₀ титры после трех иммунизаций до заражения: исследование 1: LukAB+адъювант: 1475; LukAB+SpA* + адъювант: 1643 $P > 0,012$ и $P=0,01$ к группе адъюванта; исследование 2: LukAB+адъювант: 1931; LukAB+SpA* + адъювант: 1717; $P=0,0022$ и $0,0032$, соответственно, к группе адъюванта). Эти результаты, показанные на фиг. 29А и 29В, показывают, что LukAB в вакцине индуцирует функциональные антитела, которые блокируют цитотоксическую активность токсина LukAB.

Эффективность в модели хирургической раневой инфекции на мини-свиньях

Чтобы проверить эффективность вакцин, определяют количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в мышцах и селезенке после трех иммунизаций и заражения *S. aureus*. В двух исследованиях используют два разных штамма заражения, один принадлежит к клональному комплексу CC398, вторым является штамм USA300 из клонального комплекса CC8. Иммунизация только адъювантом приводит к высоким уровням КОЕ в общей мускулатуре после заражения штаммом CC398 (GeoMean log₁₀

КОЕ/г мышцы=6,05). Иммунизация LukAB+адьювантом (GeoMean \log_{10} КОЕ/г мышцы=3,25, $P=0,0036$), SpA* + адьювантом (GeoMean \log_{10} КОЕ/г мышцы=3,22, $P=0,003$) или комбинацией LukAB+SpA* + адьювант (GeoMean \log_{10} КОЕ /г мышцы=2,66, $P=0,0012$) приводит к значительному снижению КОЕ в мышцах по сравнению с группой, получавшей адьювант (фиг. 30А). Также в селезенке наблюдают высокие уровни КОЕ в контрольной группе, иммунизированной только адьювантом (GeoMean \log_{10} КОЕ/г селезенки=2,26). Иммунизация LukAB+адьювантом и SpA* + адьювантом приводит к снижению КОЕ в селезенке (GeoMean \log_{10} КОЕ/г селезенки=0,29 и 0,78, соответственно, $P>0,05$). Значительное снижение КОЕ до нижнего предела количественного определения определяют в селезенке, когда животных иммунизируют комбинацией LukAB+SpA* + адьювант (GeoMean \log_{10} КОЕ/г селезенки=0,2, $P=0,0424$), (фиг. 30В). Результаты показывают, что тестируемая вакцина эффективна в модели инфекции в месте хирургического вмешательства у мини-свиней. Вакцины также снижают распространение бактерий на такие органы, как селезенка, где комбинация LukAB и SpA* продемонстрировала превосходную защиту по сравнению с отдельными антигенами.

Когда мини-свиней иммунизируют только адьювантом, высокое количество КОЕ определяют в общей мускулатуре после заражения штаммом USA300 (GeoMean \log_{10} КОЕ/г мышцы=5,48). Снижение КОЕ в мышце по сравнению с группой адьюванта наблюдают после иммунизации LukAB+адьювантом (GeoMean \log_{10} КОЕ/г мышцы=3,37, $P>0,05$) и SpA* + адьювант (GeoMean \log_{10} КОЕ/г мышцы=2,84). Значительное снижение КОЕ в мышце по сравнению с группой адьюванта определяют, когда животных иммунизируют комбинацией LukAB+SpA* + адьювант (GeoMean \log_{10} КОЕ/г мышцы=1,86, $P=0,0198$), предполагая, что комбинация LukAB и SpA* продемонстрировала превосходную защиту против штамма USA300 по сравнению с одиночными антигенами (фиг. 30С). В селезенке, в целом обнаружены низкие уровни штамма CC8 USA300, которые достоверно не различались между группами (фиг. 30D). В совокупности, данные модели хирургической раневой инфекции показывают, что вакцинная комбинация, включающая LukAB и SpA*, обеспечивает значительную защиту мышц мини-свиньи от заражения двумя клинически значимыми штаммами, ST398 и CC8 USA300.

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ:

Ответы антител против LukAB и SpA, измеренные с помощью иммуноферментного анализа (ELISA): Для измерения уровней антител IgG против LukAB, 96-луночные планшеты maxisorp (Thermo Fisher Scientific) покрывают 1,0 мкг/мл LukAB CC8 в PBS и инкубируют в течение 1 часа при 2-8°C. После промывания PBS+0,05% Tween-20, планшеты блокируют 2,5% обезжиренным молоком, промывают и в лунки добавляют серийные 3-кратные разведения сыворотки, приготовленные в разбавляющем буфере (2,5% (масс./об.) сухого обезжиренного молока в 1xPBS), начиная с 1:100. Планшеты инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре, промывают и добавляют анти-свиное вторичное антитело IgG-HRP (Sigma Aldrich), разведенное

1:20000. После инкубации при комнатной температуре в течение 1, часа планшеты проявляют с субстратом ТМВ (Leinco Technologies). Реакцию останавливают добавлением 1М серной кислоты. Абсорбцию считывают при 450 нм, и значения ЕС₅₀ рассчитывают с использованием 4-PL (4-параметрической логистической регрессии) подгонки кривой в Prism GraphPad V8.4.2.

Для измерения антител против SpA, 96-луночные планшеты maxisorp покрывают 0,25 мкг/мл SpA* в PBS и инкубируют в течение ночи при 2-8°C. Вторичное антитело представляет собой 1:40000 разведение анти-свиного IgG-HRP в блокирующем буфере. Другие стадии такие, как описано выше для измерения ответов анти-LukAB антител. Однофакторный ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета выполняют для проверки статистической значимости между средними геометрическими значениями групп вакцины и группы адьюванта.

Анализ нейтрализации токсина LukAB. Набор Cyto-Tox-One (Promega) используют для измерения высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH) из клеток с поврежденной мембраной. Клетки THP-1 центрифугируют и ресуспендируют с RPMI до плотности 2×10^6 клеток/мл. 50 мкл клеток добавляют в 96-луночные культуральные планшеты, содержащие серийные 3-кратные разведения сыворотки. Токсин LukAB СС8 добавляют в тестируемые лунки до конечной концентрации 40 нг/мл. Лизирующий раствор (Promega) добавляют в лунки контроля лизиса. Планшеты инкубируют в течение 2 ч при 37°C в присутствии 5% CO₂. Планшеты центрифугируют, 25 мкл супернатанта переносят на новый планшет и добавляют 25 мкл реагента CytoTox-ONE (Promega). Планшеты инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре, и в лунки добавляют стоп-раствор (Promega). Планшеты считывают на ридере Biotek Synergy Neo 2 в монохроматическом режиме с длиной волны возбуждения 560 и шириной полосы 5 нм и длиной волны испускания 590 и шириной полосы 10 нм. Прирост установлен на 120-130. Однофакторный ANOVA и критерием множественного сравнения Даннета проводят для тестирования статистической значимости между средними геометрическими величинами групп вакцины и группы адьюванта.

Способы инфицирования хирургической раны мини-свиней: Самцов геттингенских мини-свиней в возрасте от пяти до восьми месяцев (Marshall Biosciences, North Rose, NY) размещают в группах и содержат при 12-часовом цикле свет/темнота с доступом к воде без ограничений. На утро операции, мини-свиней натошак подвергают седации, интубируют и помещают под изофлурановую анестезию на время операции. Операцию проводят на левом бедре, при этом обнажают мышечный слой и 5 мм бескальпильный троакар (Endopath® Xcel, Ethicon Endo-Surgery, Guaynabo, Puerto Rico) вводят на глубину бедренной кости. 20 мкл инокулята (приблизительно $6 \log_{10}$ КОЕ/мл *S. aureus*) вводят в рану (верхняя часть бедренной кости) с помощью 6-дюймовой спинальной иглы MILA (Mila International, Inc., Florence, KY) через троакар, который затем удаляют. Мышцу закрывают одним шелковым швом, и кожу закрывают рассасывающимся швом PDS. Восемь дней спустя, под действием седативных средств,

мини-свиней умерщвляют барбитуратом. После подтверждения смерти, органы обрабатывают отдельно для микробиологии. Образцы гомогенизируют в физиологическом растворе с использованием Bead Ruptor Elite (Omni International, Kennesaw, GA, USA), затем разводят и высевают на чашки TSA с использованием Autoplate 5000 Spiral Plater (Spiral Biotech, Norwood, MA, USA). Планшеты инкубируют в течение 18-24 ч при 37°C, затем считывают на счетчике колоний QCount (Spiral Biotech, Norwood, MA, USA).

Однофакторный ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета проводят для проверки статистических данных между средними геометрическими значениями нескольких групп. Все исследования на животных рассмотрены и одобрены комитетом по уходу и использованию животных Janssen Spring House Institutional Animal Care and Use Committee и размещены в учреждении, аккредитованном AAALAC.

Заключение: Было показано, что вакцинная композиция, содержащая антигены LukAB и SpA* с адьювантом, индуцирует выработку IgG против LukAB и SpA* в модели хирургической раневой инфекции у мини-свиней. повышение анти-LukAB IgG антитела ассоциируют с повышенной нейтрализацией цитотоксической активности токсина LukAB, что является показанием того, что индуцированные антитела IgG являются функциональными. Для тестирования эффективности вакцинной композиции, способность вакцины снижать бактериальную нагрузку в модели хирургической раневой инфекции у мини-свиней определяют с использованием двух генетических различных клинически значимых штаммов *S. aureus*. Иммунизация мини-свиней вакцинной композицией LukAB+SpA* + адьювант приводит к значительному снижению количества колониеобразующих единиц в мышцах после заражения обоими тестируемыми штаммами. Вакцинная композиция также дает значительное снижение КОЕ в селезенке с одним из тестируемых штаммов. Поэтому кандидатная вакцина против *S. aureus*, содержащая мутанты анатоксина LukAB и SpA и адьювант, эффективно защищает от глубоко укоренившейся инфекции *S. aureus* и диссеминации в модели заражения места хирургического вмешательства у мини-свиней.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что в варианты осуществления, описанные выше, могут быть внесены изменения, не отступая от их широкой изобретательской концепции. Поэтому понятно, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но оно предназначено для охвата модификаций в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено настоящим описанием.

ССЫЛКИ

Следующие ссылки, в той мере, в какой они предоставляют типовые процедурные или другие подробности, дополняющие изложенные в настоящем документе, специально включены в настоящий документ посредством ссылки.

33. Kim HK, Falugi F, Missiakas D, Schneewind O. 2016. Peptidoglycan-linked protein A promotes T-cell dependent antibody expansion during *Staphylococcus aureus* infection. Proc

Natl Acad Sci USA 113:5718-5723.

37. Schulz D, Grumann D, Trübe P, Pritchett-Corning K, Johnson S, Reppschläger K, Gumz J, Sundaramoorthy N, Michalik S, Berg S, van den Brandt J, Fister R, Monecke S, Uy B, Schmidt F, Bröker BM, Wiles S, Holtfreter S. 2017. Laboratory mice are frequently colonized with *Staphylococcus aureus* and mount a systemic immune response - note of caution for in vivo infection experiments. *Front Cell Infect Microbiol* 7:152.

38. van Wamel WJ, Rooijackers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on b-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* 188:1310-1315.

39. Jongerius I, Köhl J, Pandey MK, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG, Rooijackers SHM. 2007. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J Exp Med* 204:2461-2471.

40. Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O. 2010. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS Pathog* 6:e1001036.

41. McAdow M, Kim HK, DeDenta AC, Hendrickx APA, Schneewind O, Missiakas DM. 2011. Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. *PLoS Pathog* 7:e1002307.

42. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 11:237-248.

43. Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K. 2007. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes. *J Bacteriol* 190:300-310.

44. Kim HK, Cheng AG, Kim H-Y, Missiakas DM, Schneewind O. 2010. Non-toxicogenic protein A vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *J Exp Med* 207:1863-1870.

45. Cheng AG, Missiakas DM, Schneewind O. 2014. The giant protein Ehb is a cross wall determinant of *Staphylococcus aureus* cell size and complement resistance. *J Bacteriol* 196:971-981.

46. Becker S, Frankel MB, Schneewind O, Missiakas DM. 2014. Release of protein A from the cell wall envelope of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:1574-1579.

47. Goodyear CS, Silverman GJ. 2004. Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11392-11397.

48. Falugi F, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O. 2013. The role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus* mBio 4:e00575-00513.

54. Lucero CA, Hageman J, Zell ER, Bulens S, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Schaffner W, Fridkin SK. 2009. Evaluating the potential public health impact of a *Staphylococcus aureus* vaccine through use of population-

based surveillance for invasive methicillin-resistant *S. aureus* disease in the United States. *Vaccine* 27:5061-5068.

75. Pauli NT, Kim HK, Falugi F, Huang M, Dulac J, Dunand CH, Zheng NY, Kaur K, Andrews S, Huang Y, Dedent A, Frank K, Charnot-Katsikas A, Schneewind O, Wilson PC. 2014. Staphylococcus aureus infection induces protein A-mediated immune evasion in humans. *J Exp Med* 211:2331-2339.

76. Kim HK, Falugi F, Thomer L, Missiakas DM, Schneewind O. 2015. Protein A suppresses immune responses during Staphylococcus aureus bloodstream infection in guinea pigs. *mBio* 6:e02369-02314.

84. Kim HK, Emolo C, DeDent AC, Falugi F, Missiakas DM, Schneewind O. 2012. Protein A-specific monoclonal antibodies and the prevention of Staphylococcus aureus disease in mice. *Infect Immun* 80:3460-3470.

85. DeLeo FR, Chambers HF. 2009. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7:629-641.

86. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. 2003. Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 41:5442-5448.

87. Bae T, Schneewind O. 2005. Allelic replacement in Staphylococcus aureus with inducible counter-selection. *Plasmid* 55:58-63.

88. Thomer L, Becker S, Emolo C, Quach A, Kim HK, Rauch S, Anderson M, Leblanc JF, Schneewind O, Faull KF, Missiakas D. 2014. N-acetylglucosamylation of serine-aspartate repeat proteins promotes Staphylococcus aureus bloodstream infection. *J Biol Chem* 289:3478-3486.

102. Sun Y, Emolo CE, Holtfreter S, Wiles S, Kreiswirth B, Missiakas D, Schneewind O. 2018. Staphylococcal protein A is required for persistent colonization of mice with Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* 200:e00735-17.

140. Gutafson GT, Stalenheim G, Forsgren A, Sjöquist J. 1968. Protein A from Staphylococcus aureus IV. Production of anaphylaxis-like cutaneous and systemic reactions in non-immunized guinea pigs. *J Immunol* 100:530-534.

142. Anderson AL, Sporici R, Lambris J, Larosa D, Levinson AI. 2006. Pathogenesis of B-cell superantigen-induced immune complex-mediated inflammation. *Infect Immun* 74:1196-1203.

145. Marone G, Tamburini M, Giudizi MG, Biagiotti R, Almerigogna F, Romagnani S. 1987. Mechanism of activation of human basophils by Staphylococcus aureus Cowan 1. *Infect Immun* 55:803-809.

146. Chen X, Sun Y, Missiakas D, Schneewind O. 2018. Staphylococcus aureus decolonization of mice with monoclonal antibody neutralizing protein A. *J Infect Dis* in press.

154. Deisenhofer J. 1981. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and

2.8-A resolution. *Biochemistry* 20:2361-2370.

155. Fisher MM. 1986. Clinical observations on the pathophysiology and treatment of anaphylactic cardiovascular collapse. *Anaesth Intensive Care* 14:17-21.

156. Korhonen H, Fisslthaler B, Moers A, Wirth A, Habermehl D, Wieland T, Schütz G, Wettschureck N, Fleming I, Offermanns S. 2009. Anaphylactic shock depends on endothelial Gq/G11. *J Exp Med* 206:411-420.

157. Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Munoz-Planillo R, Hasegawa M, McGavin MJ, Otto M, Inohara N, Nunez G. 2013. Staphylococcus δ -toxin promotes allergic skin disease by inducing mass cell degranulation. *Nature* 503 review:397-401.

158. Kitamura D, Roes J, Kühn R, Rajewsky K. 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350:423-426.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая:

(a) полипептид варианта белка А (SpA) *Staphylococcus aureus*, где полипептид варианта SpA содержит по меньшей мере один домен А, В, С, D или E SpA; и

(b) мутантный полипептид субъединицы стафилококкового лейкоцидина, содержащий:

(i) мутантный полипептид LukA,

(ii) мутантный полипептид LukB, и/или

(iii) мутантный димерный полипептид LukAB,

где (i), (ii) и/или (iii) имеют одну или более аминокислотных замен, делеций или их комбинацию,

так что способность мутантных полипептидов LukA, LukB и/или LukAB образовывать поры на поверхности эукариотических клеток нарушается, тем самым снижая токсичность мутантного полипептида LukA и/или LukB или мутантного димерного полипептида LukAB по сравнению с соответствующим полипептидом LukA и/или LukB дикого типа или димерным полипептидом LukAB.

2. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что полипептид варианта SpA имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая нарушает связывание Fc, и по меньшей мере вторую аминокислотную замену, которая нарушает связывание V_{H3}.

3. Иммуногенная композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что полипептид варианта SpA содержит домен D SpA и имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58.

4. Иммуногенная композиция по п. 3, отличающаяся тем, что полипептид варианта SpA имеет одну или более аминокислотных замен в аминокислотном положении 9 или 10 в SEQ ID NO:58.

5. Иммуногенная композиция по п. 3 или 4, отличающаяся тем, что полипептид варианта SpA дополнительно содержит домен E, A, B или C SpA.

6. Иммуногенная композиция по п. 5, отличающаяся тем, что полипептид варианта SpA содержит домены E, A, B и C SpA и имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:54.

7. Иммуногенная композиция по п. 5 или 6, отличающаяся тем, что каждый домен E, A, B и C SpA имеет одну или более замен аминокислот в положениях, соответствующих положениям аминокислот 9 и 10 в SEQ ID NO:58.

8. Иммуногенная композиция по любому из пп. 4-7, отличающаяся тем, что аминокислотная замена представляет собой лизиновый остаток для остатка глутамина.

9. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что полипептид варианта SpA содержит по меньшей мере один домен А, В, С, D или E SpA, и где по меньшей мере один домен имеет (i) лизиновые замены для глутаминовых остатков, соответствующих положениям 9 и 10 в домене D SpA и (ii) глутаматную замену,

соответствующую положению 33 в домене D SpA, где полипептид, по сравнению с отрицательным контролем, не вызывает определенной перекрестной связи IgG и IgE в крови или активации базофилов.

10. Иммуногенная композиция по п. 9, отличающаяся тем, что полипептид варианта SpA имеет пониженную аффинность связывания K_A с V_{H3} из IgG человека по сравнению с полипептидом варианта SpA (SpA_{KKAA}), содержащим лизиновые замены для глутаминовых остатков в каждом домене A-E SpA, соответствующие положениям 9 и 10 в домене D SpA и аланиновые замены остатков аспарагиновой кислоты в каждом домене A-E SpA, соответствующие положениям 36 и 37 домена D SpA.

11. Иммуногенная композиция по п. 10, отличающаяся тем, что полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A с V_{H3} из IgG человека, которая снижена по меньшей мере в 2 раза по сравнению с SpA_{KKAA}.

12. Иммуногенная композиция по п. 10 или 11, отличающаяся тем, что полипептид варианта SpA имеет аффинность связывания K_A с V_{H3} из IgG человека менее $1 \times 10^5 M^{-1}$.

13. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что полипептид варианта SpA не имеет замен ни в одном из доменов A, B, C, D или E SpA, соответствующих положениям аминокислот 36 и 37 в домене D SpA.

14. Иммуногенная композиция по любому из пп. 9-13, отличающаяся тем, что единственными заменами в полипептиде варианта SpA являются (i) и (ii).

15. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что мутантный полипептид LukA содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO:1-28.

16. Иммуногенная композиция по п. 15, отличающаяся тем, что мутантный полипептид LukA содержит делецию аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 342-351 любой из SEQ ID NO:1-14 и положениям аминокислот 315-324 любой из SEQ ID NO:15-28.

17. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-16, отличающаяся тем, что мутантный полипептид LukB содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную любой из SEQ ID NO:29-53.

18. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что мутантный димерный полипептид LukAB содержит мутантный полипептид LukA с делецией аминокислотных остатков, соответствующих положениям 315-324 в SEQ ID NO:16; и полипептид LukB, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

19. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-18, дополнительно содержащая адъювант.

20. Иммуногенная композиция по п. 19, отличающаяся тем, что адъювант содержит сапонины.

21. Иммуногенная композиция по п. 20, отличающаяся тем, что сапонин представляет собой QS21.

22. Иммуногенная композиция по п. 19, отличающаяся тем, что адъювант содержит агонист TLR4.

23. Иммуногенная композиция по п. 22, отличающаяся тем, что агонист TLR4 представляет собой липид A или его аналог или производное.

24. Иммуногенная композиция по п. 22 или 23, отличающаяся тем, что агонист TLR4 содержит MPL, 3D-MPL, RC529, GLA, SLA, E6020, PET-липид A, PHAD, 3D-PHAD, 3D-(6-ацил)-PHAD, ONO4007 или OM-174.

25. Иммуногенная композиция по п. 24, отличающаяся тем, что агонист TLR4 представляет собой GLA.

26. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-25, дополнительно содержащая по меньшей мере один стафилококковый антиген или его иммуногенный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из CP5, CP8, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, EsxAB(слияние), SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB, Coa, Hla, mHla, MntC, rTSST-1, rTSST-1v, TSST-1, SasF, vWbp, vWh, витронектин-связывающего белка, Aaa, Aap, Ant, аутолизинглюкозаминидазы, аутолизинамидазы, Can, коллаген-связывающего белка, Csa1A, EFB, эластин-связывающего белка, EPB, FbpA, фибриноген-связывающего белка, фибронектин-связывающего белка, FhuD, FhuD2, FnbA, FnbB, GehD, HarA, HBP, иммунодоминантного ABC транспортера, IsaA/PisA, рецептора ламинина, липазы GehD, MAP, Mg²⁺ транспортера, аналога MHC II, MRPII, NPase, активирующего белка РНК III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF, SdrG, SdrH, экзотоксинов SEA, экзотоксинов SEB, mSEB, SitC, Ni ABC транспортера, связывающего белка SitC/MntC/слюны, SsaA, SSP-1, SSP-2, Spa5, SpAKKAA, SpAkR, Sta006, Sta011, PVL, LukED и Hlg.

27. Одна или более выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид варианта белка A (SpA) *Staphylococcus aureus* и мутантный полипептид Luk A, мутантный полипептид Luk B или мутантный димерный полипептид LukAB по любому из пп. 1-26.

28. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 27.

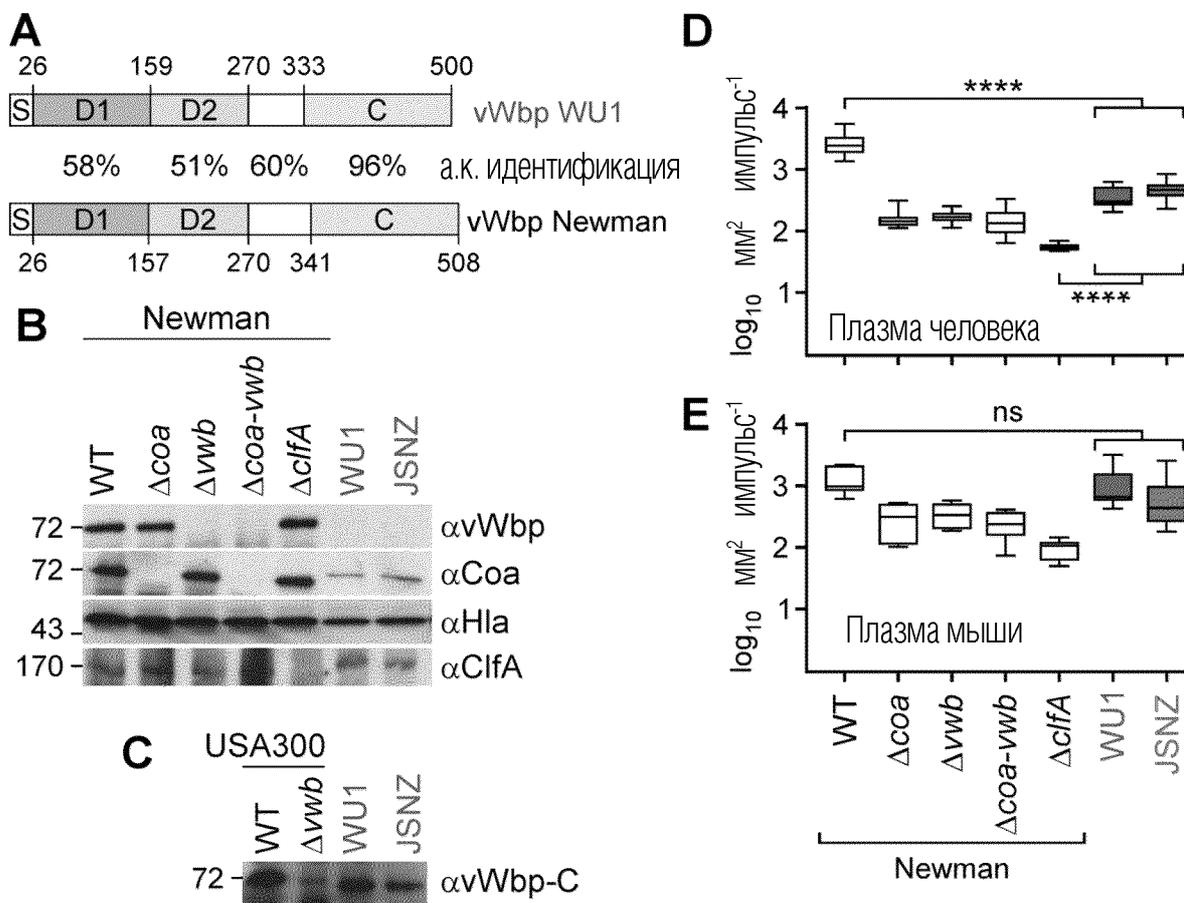
29. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 28.

30. Способ лечения или профилактики инфекции *Staphylococcus* у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 1-26, одной или более выделенных нуклеиновых кислот по 27, вектора по п. 28 или клетки-хозяина по п. 29.

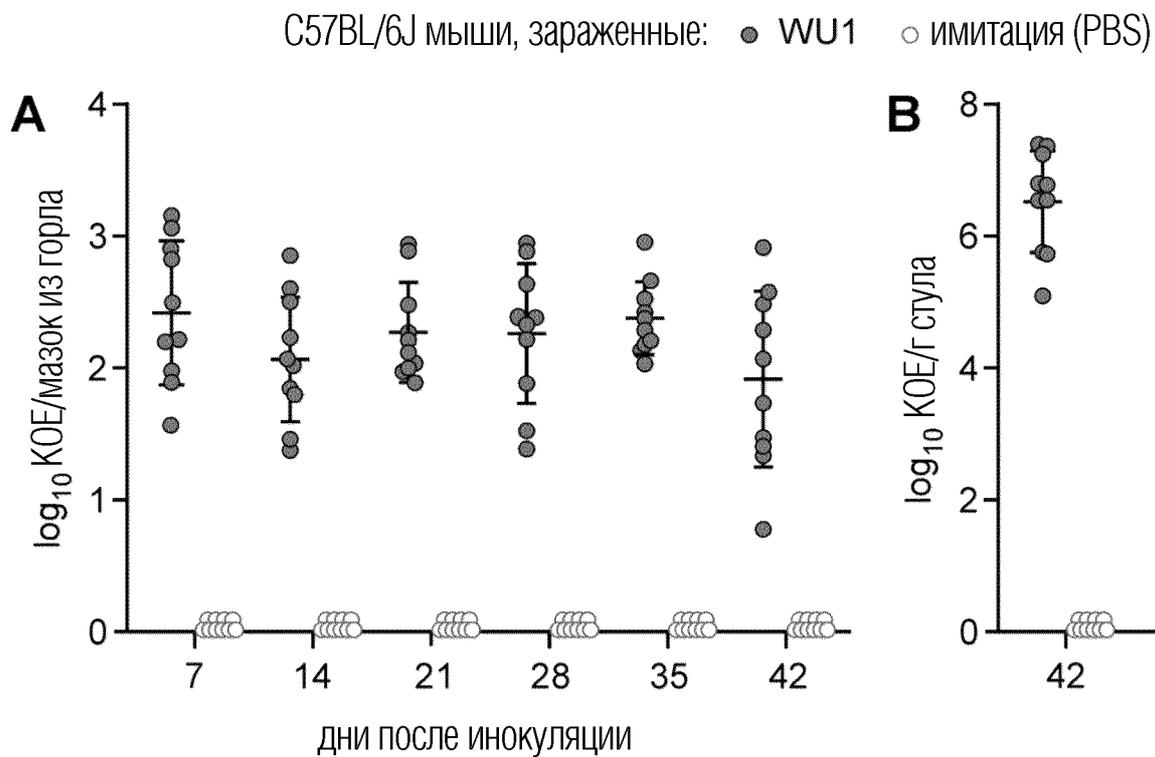
31. Способ индукции иммунного ответа на бактерию *Staphylococcus* у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 1-26, одной или более выделенных нуклеиновых кислот по п. 27, вектора по п. 28 или клетки-хозяина по п. 29.

32. Способ деколонизации или профилактики колонизации или повторной колонизации бактерии *Staphylococcus* у субъекта, нуждающегося в этом, включающий

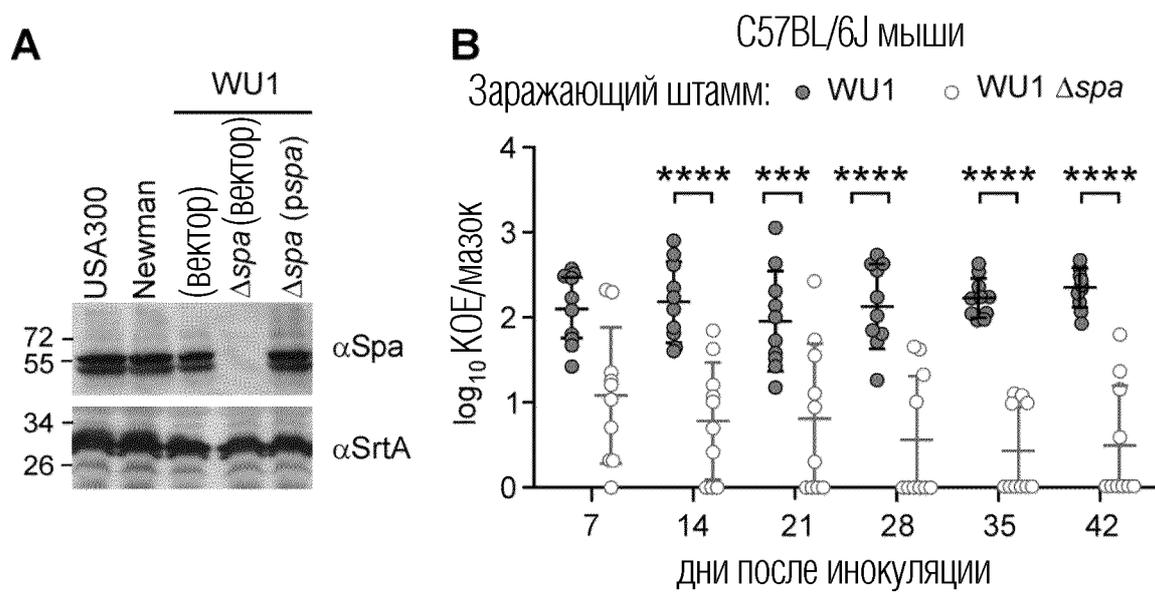
введение субъекту, нуждающемуся в этом эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 1-26, одной или более выделенных нуклеиновых кислот по п. 27, вектора по п. 28 или клетки-хозяина по п. 29.



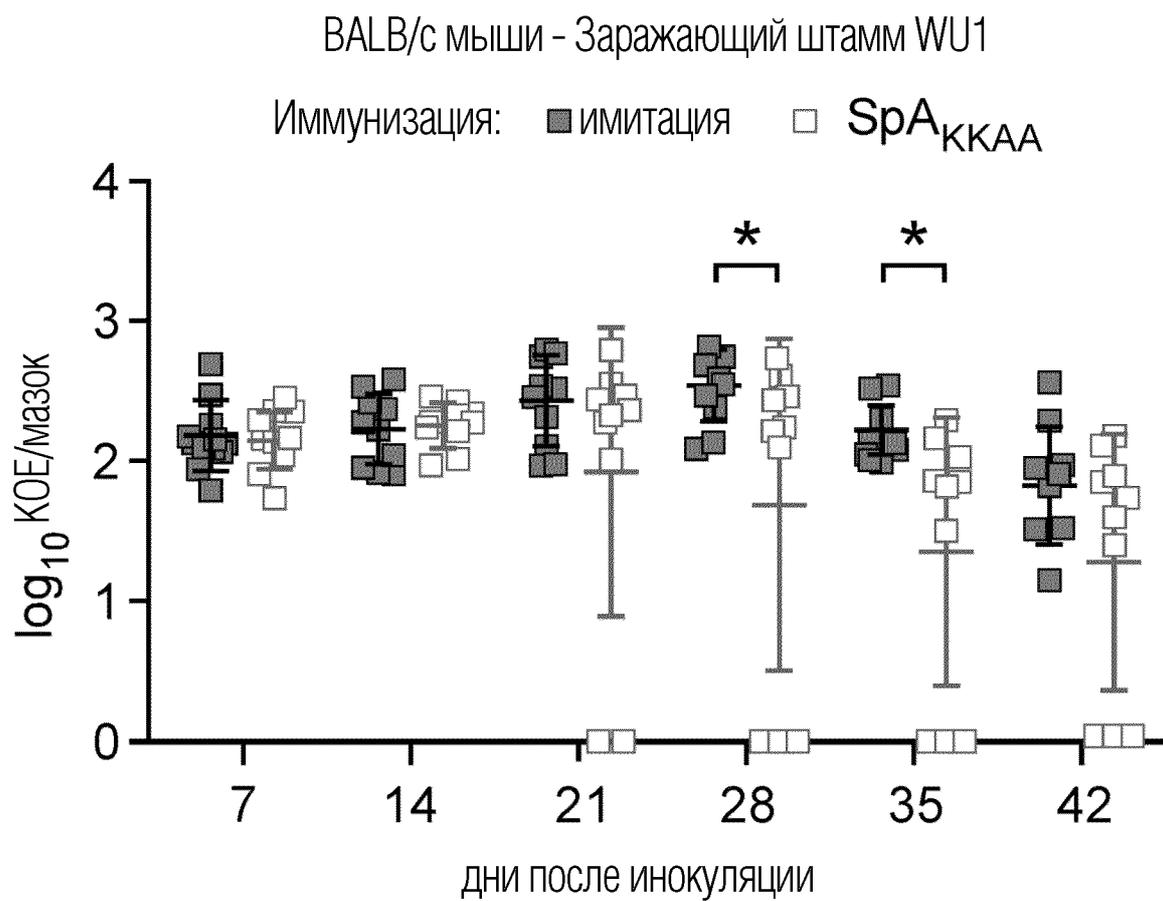
ФИГ. 1А-1Е



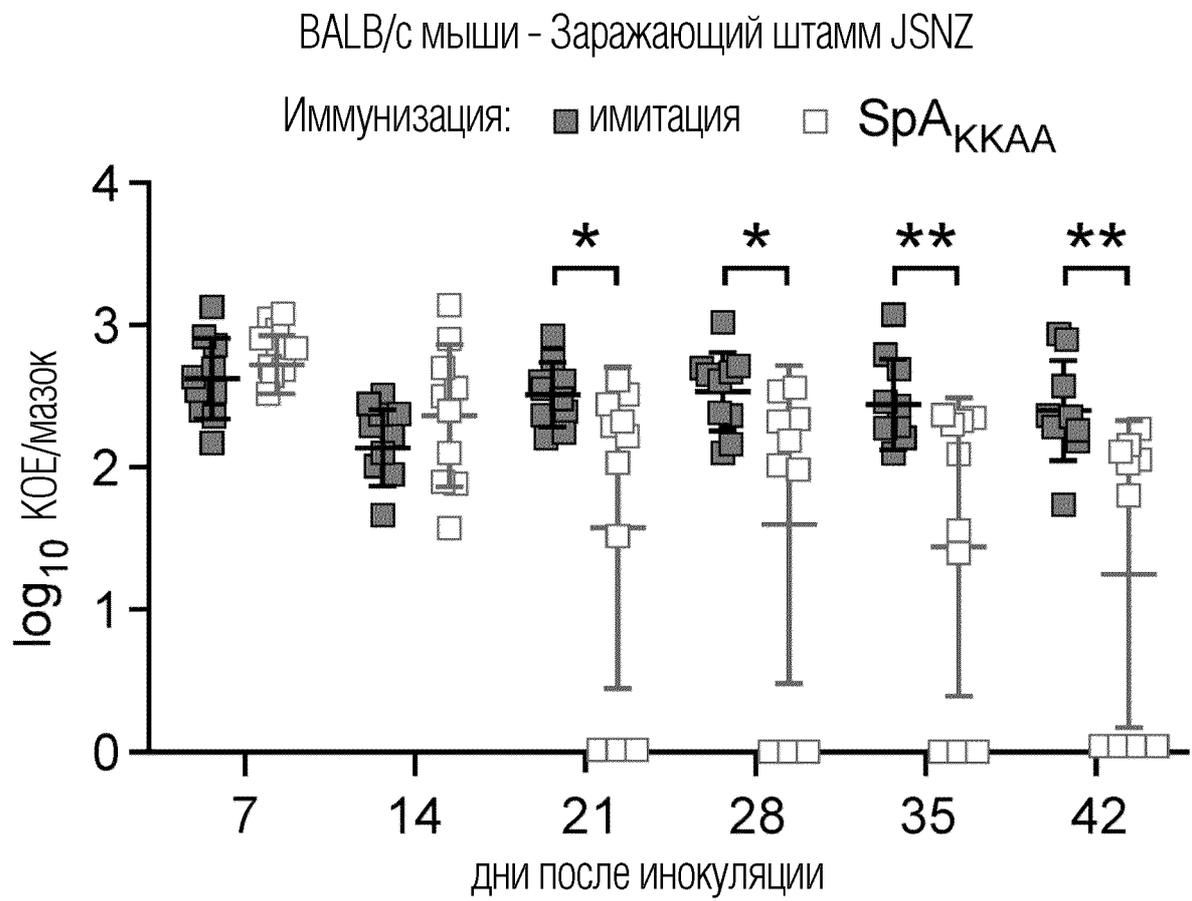
ФИГ. 2А-2В



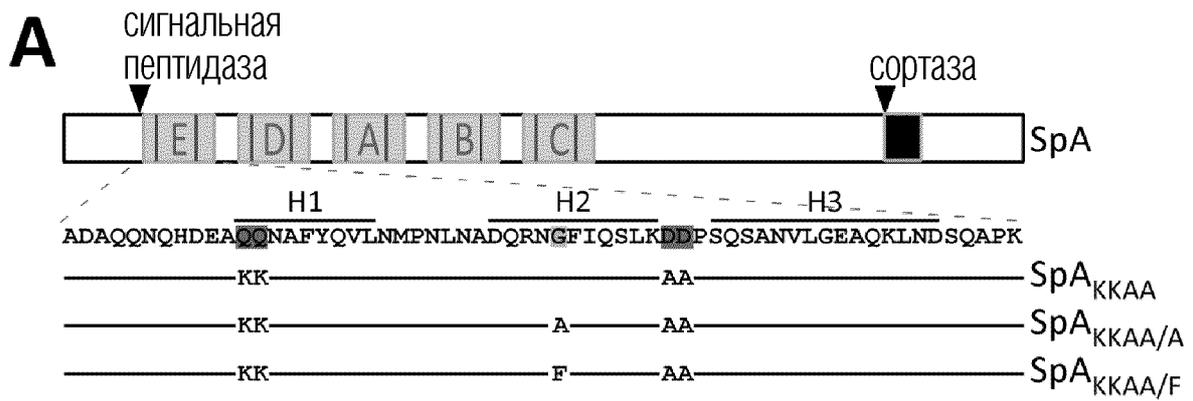
ФИГ. 3А-3В



ФИГ. 5



ФИГ. 6

**B**

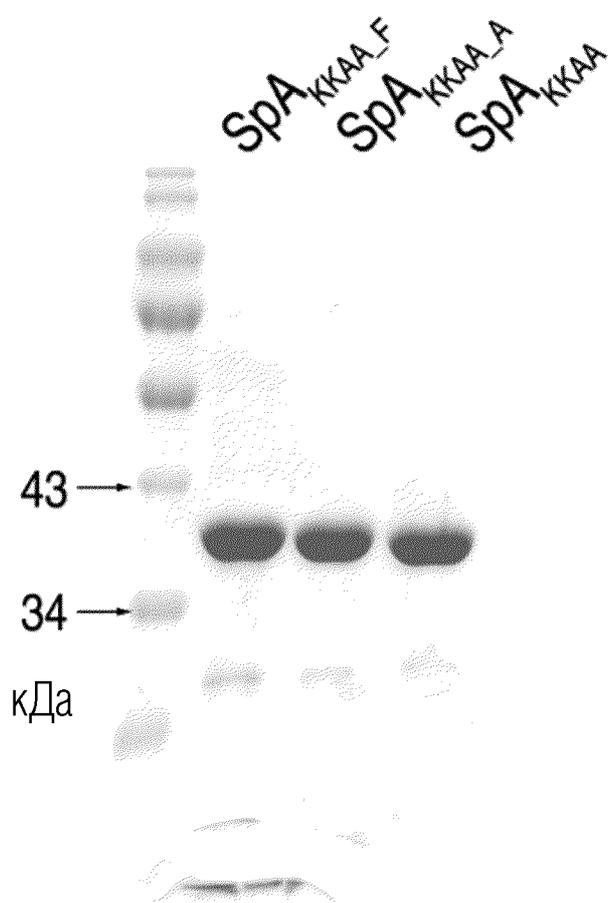
аффинность к IgG человека	
SpA	1e-10
SpA _{KKAA}	6.6e-5
SpA _{KKAA/A}	1.43e-4
SpA _{KKAA/F}	1.24e-2

C

аффинность к IgE человека	
SpA	1e-10
SpA _{KKAA}	6.57e-8
SpA _{KKAA/A}	3.43e-6
SpA _{KKAA/F}	2.02e-5

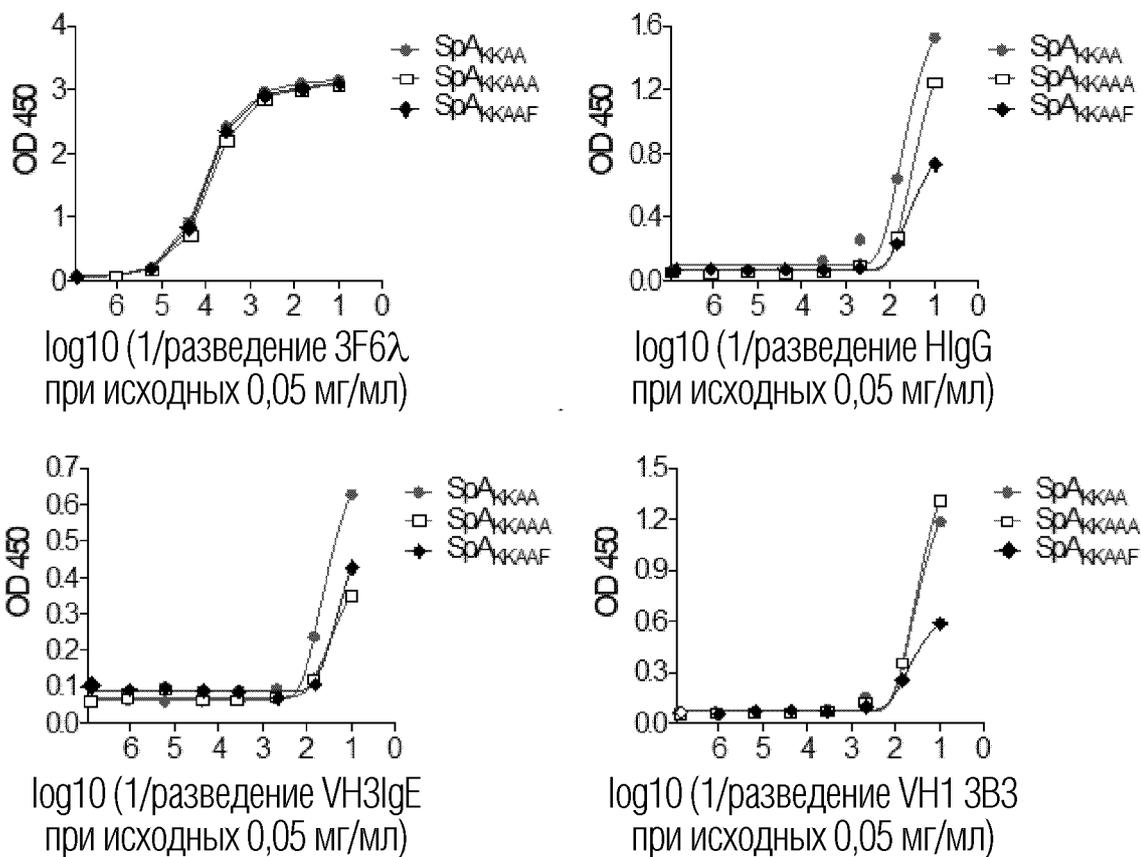
ФИГ. 7А-7С

7/27

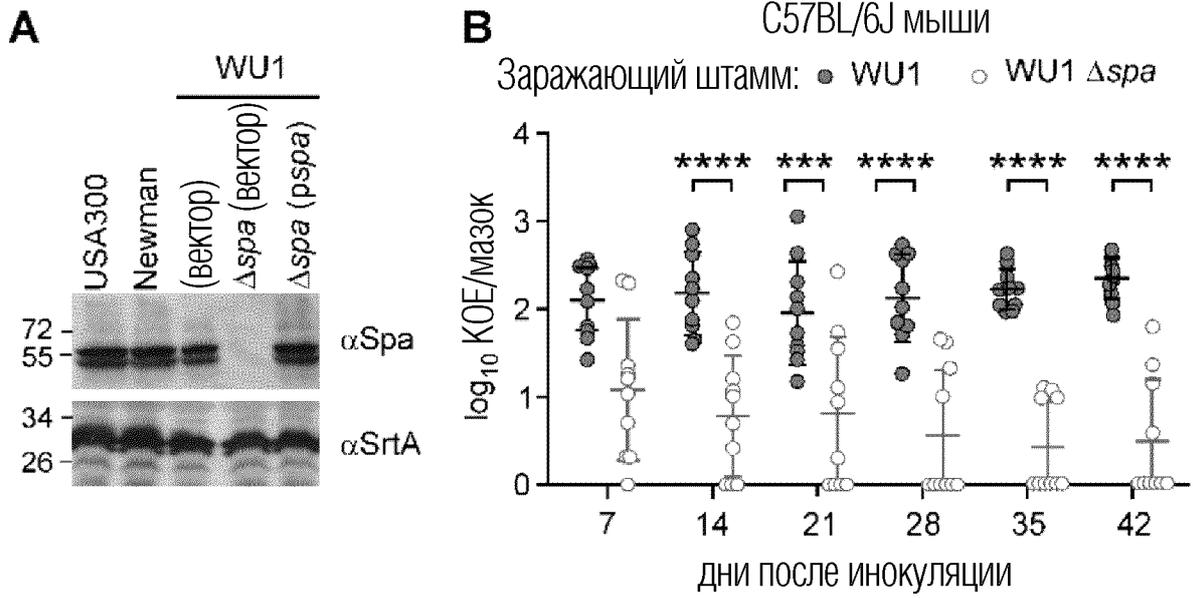


ФИГ. 8А

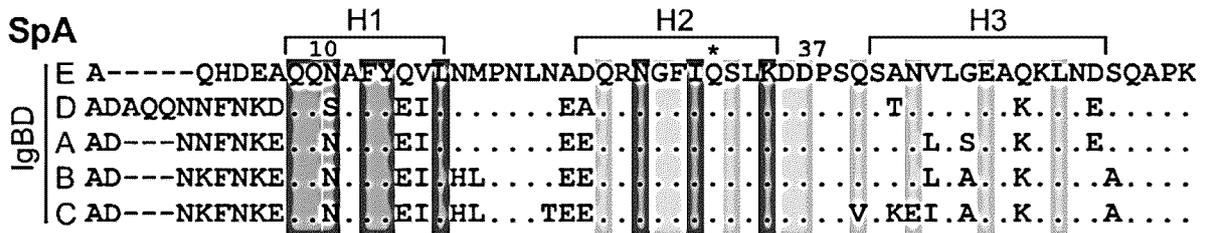
8/27



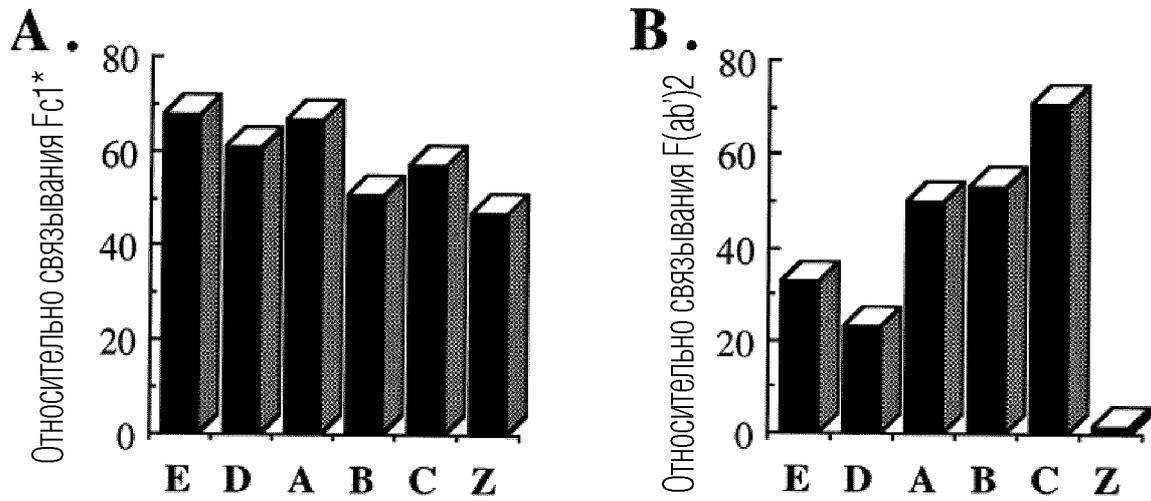
ФИГ. 8В



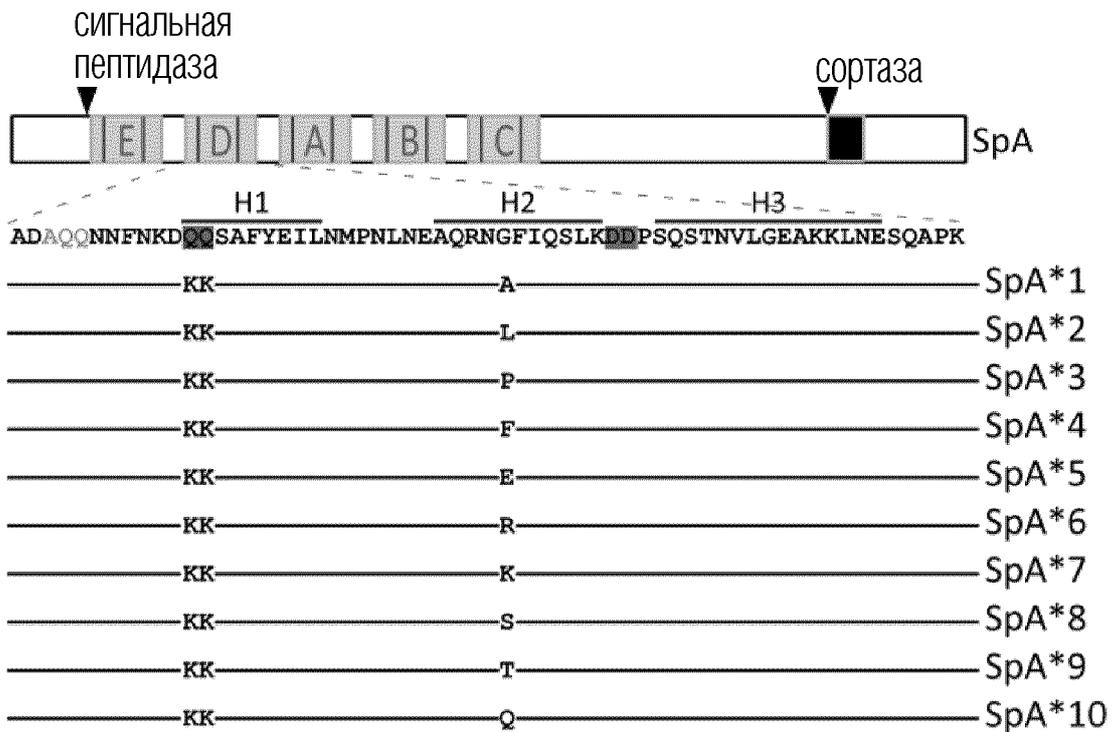
ФИГ. 9А-9В



ФИГ. 10

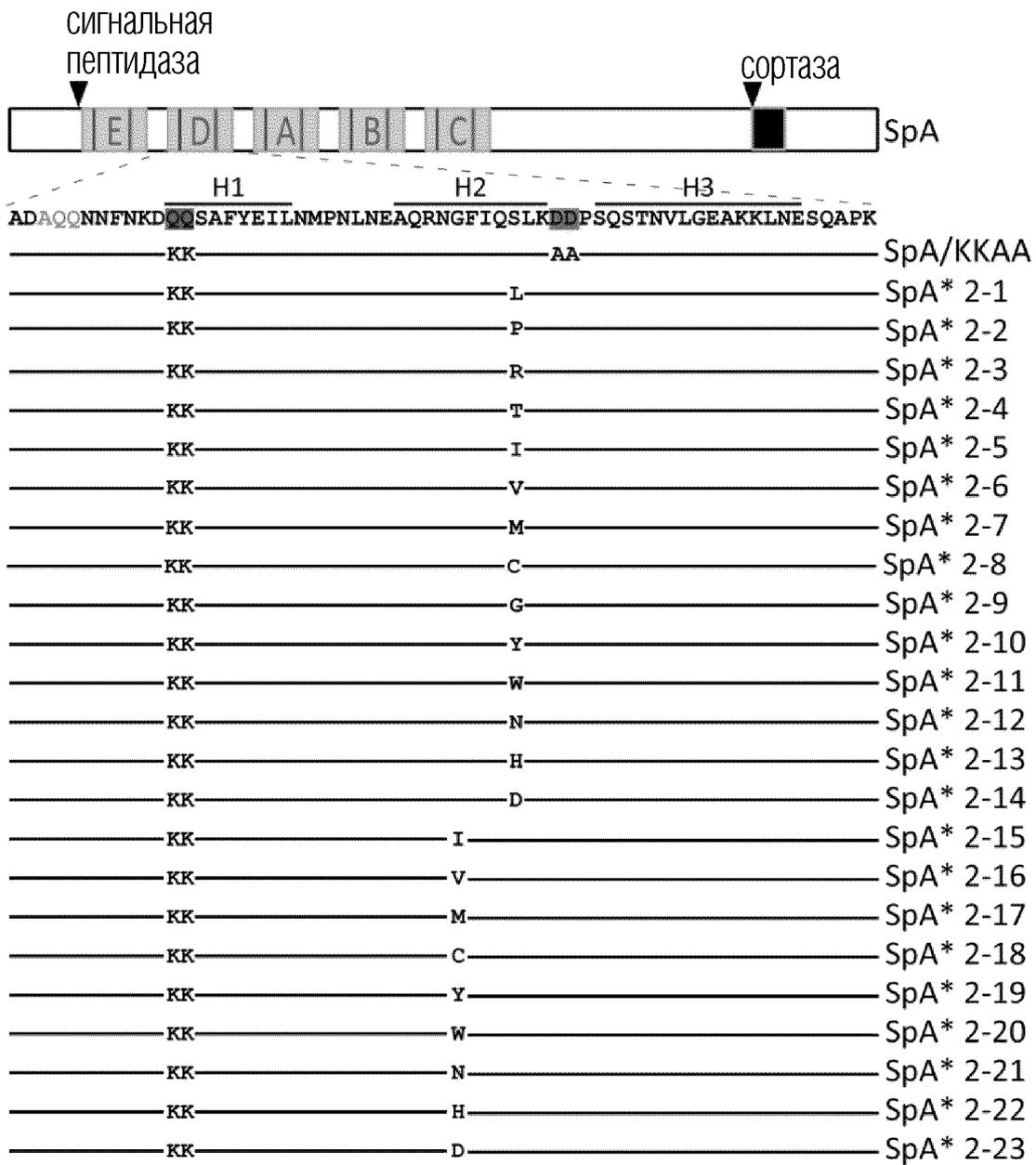


ФИГ. 11

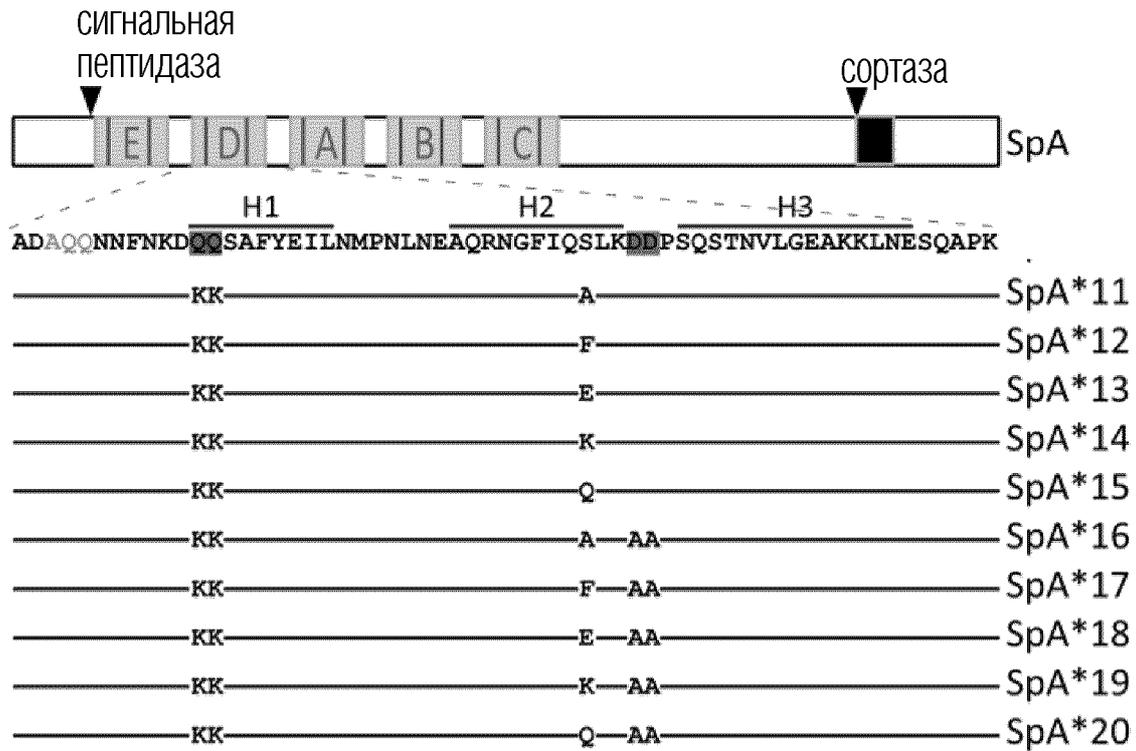


ФИГ. 12А

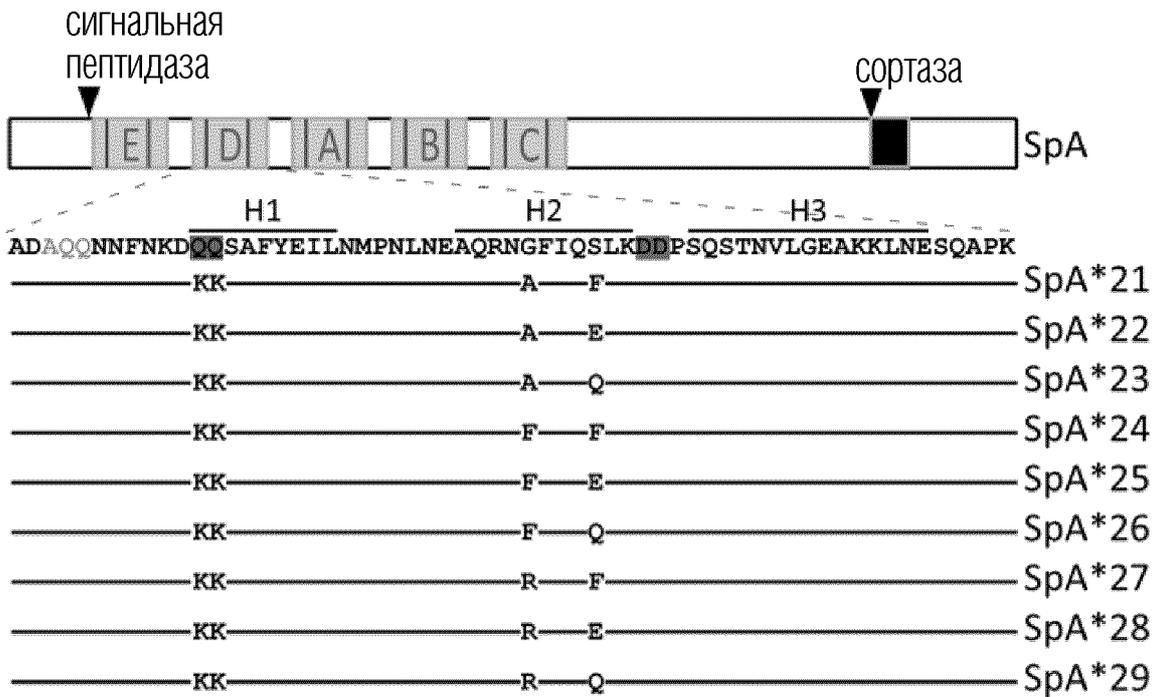
11/27



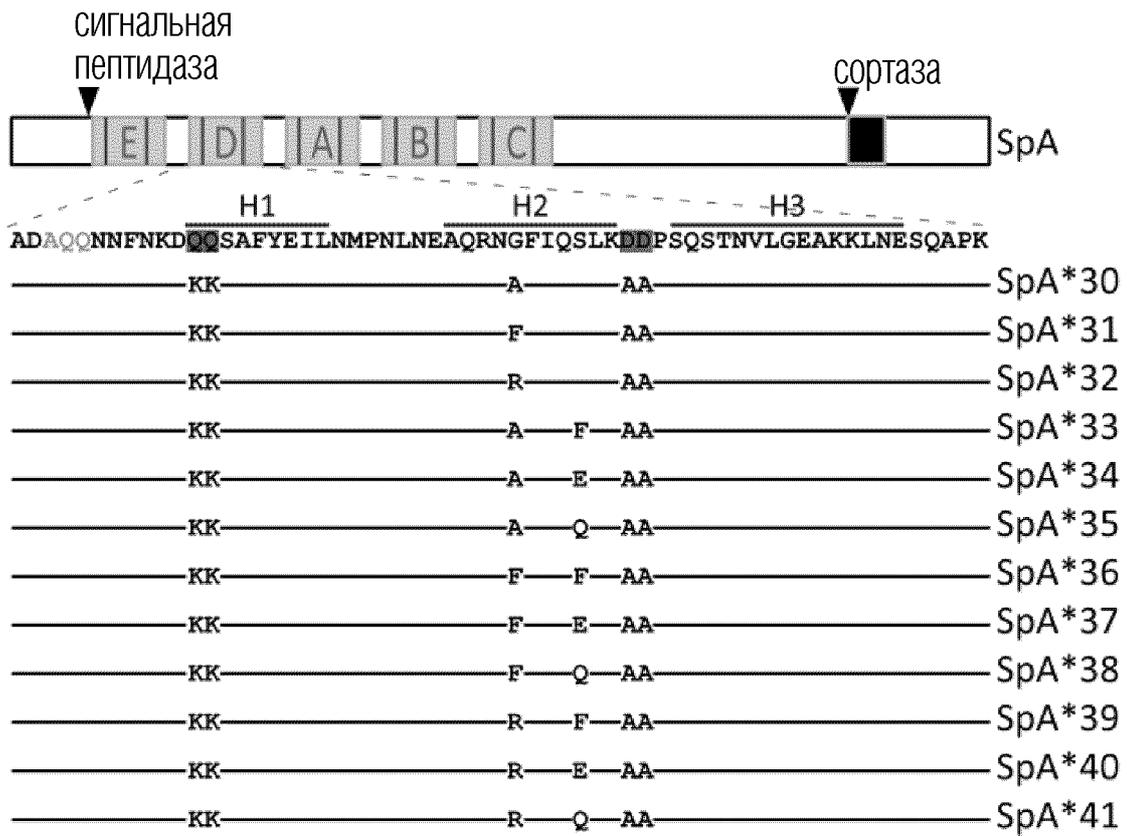
ФИГ. 12В



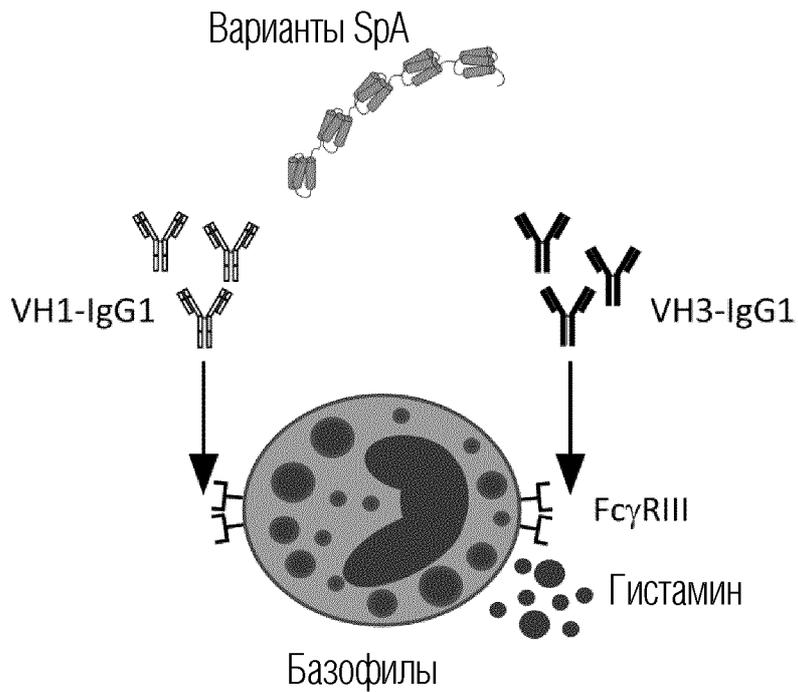
ФИГ. 13



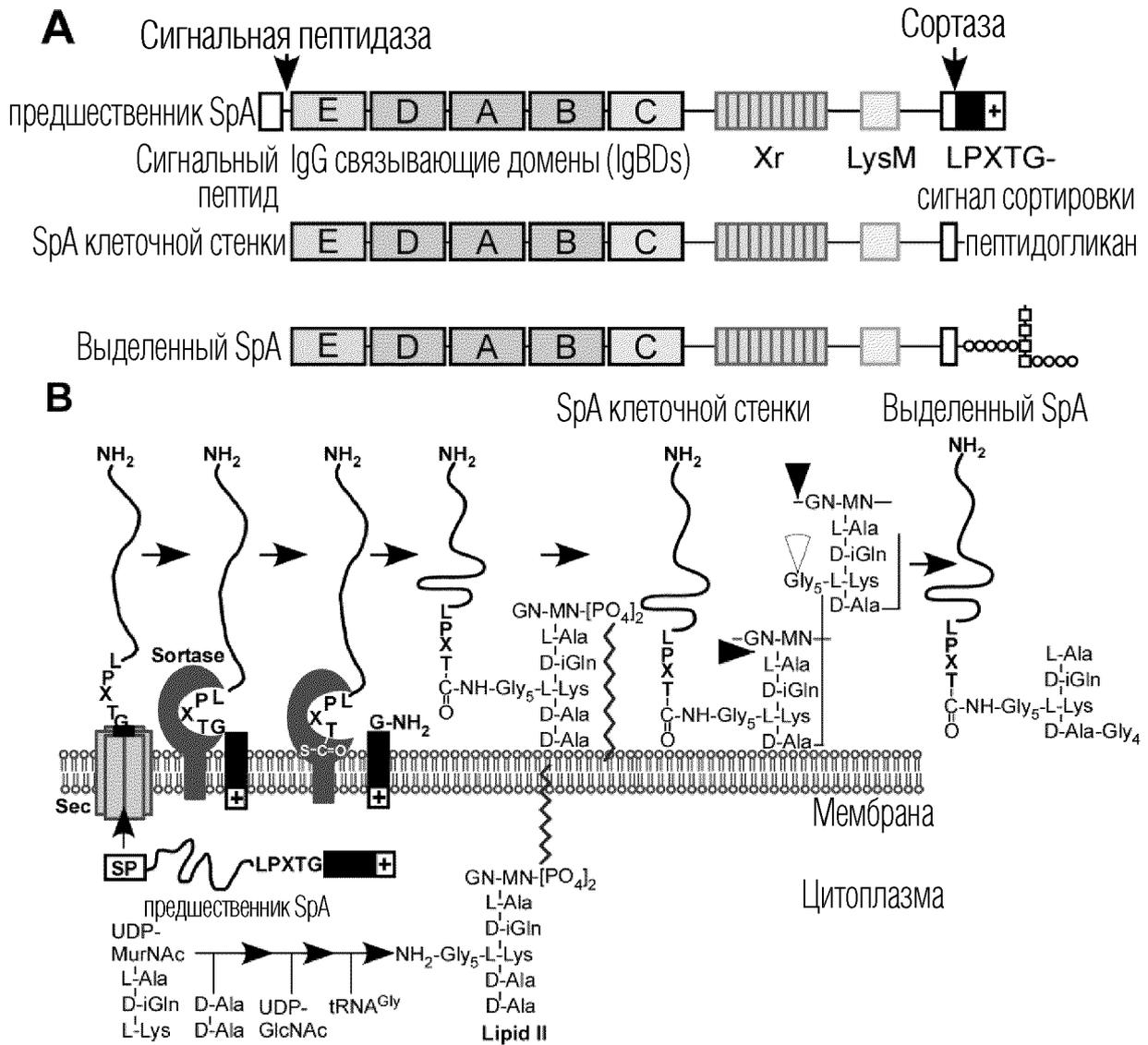
ФИГ. 14



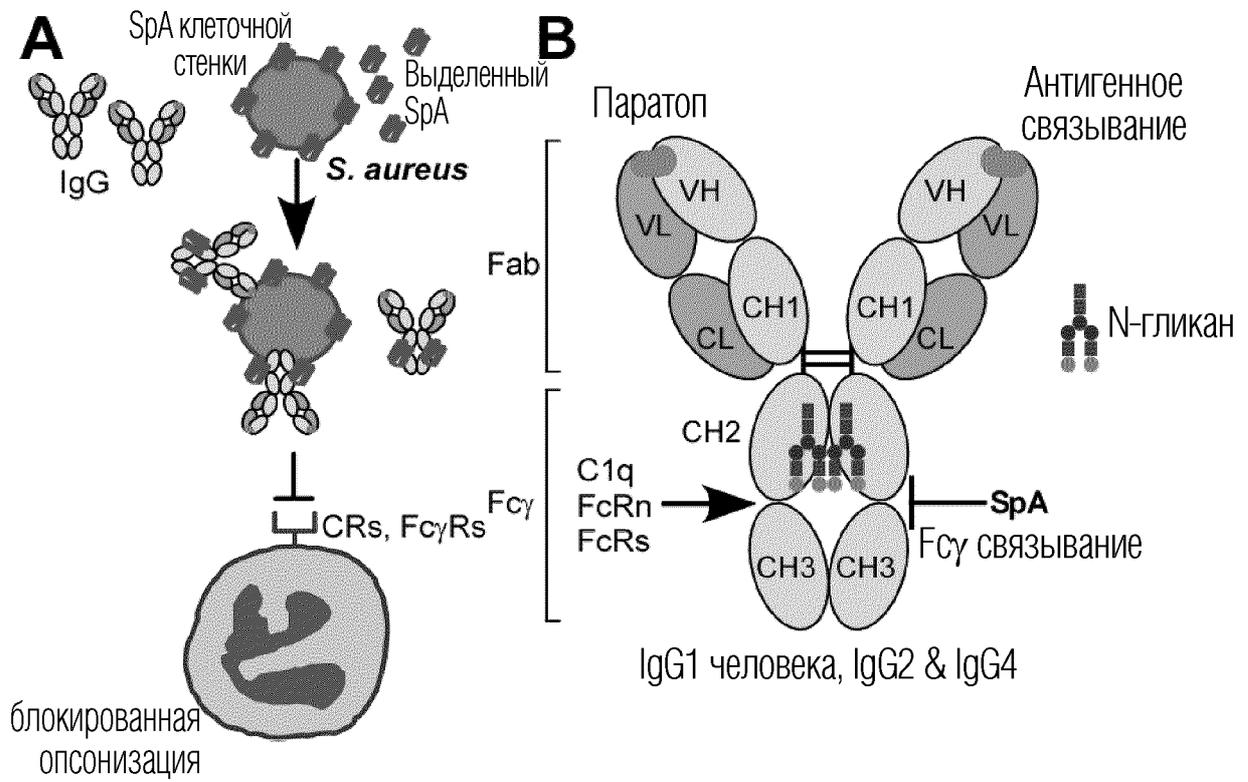
ФИГ. 15



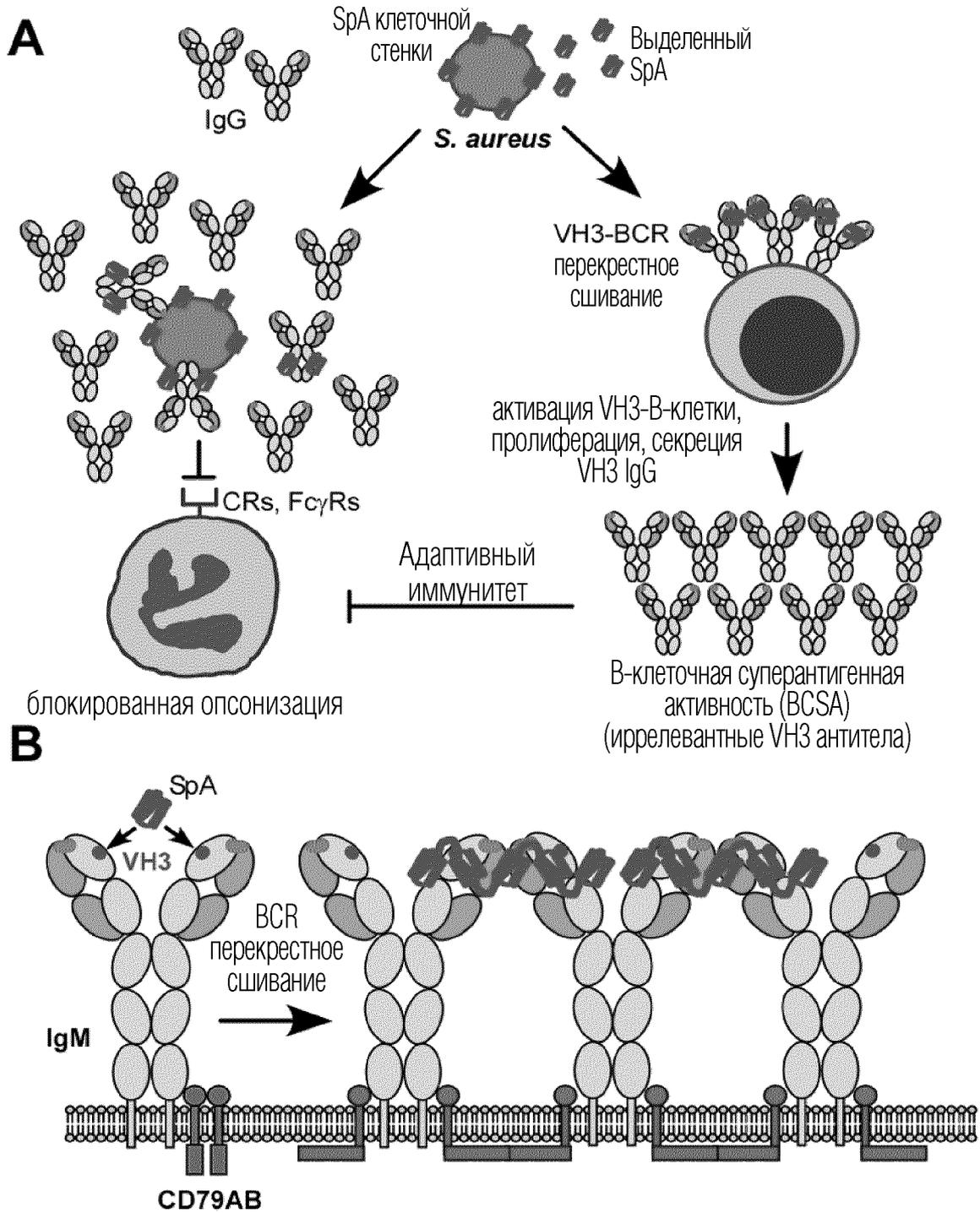
ФИГ. 16



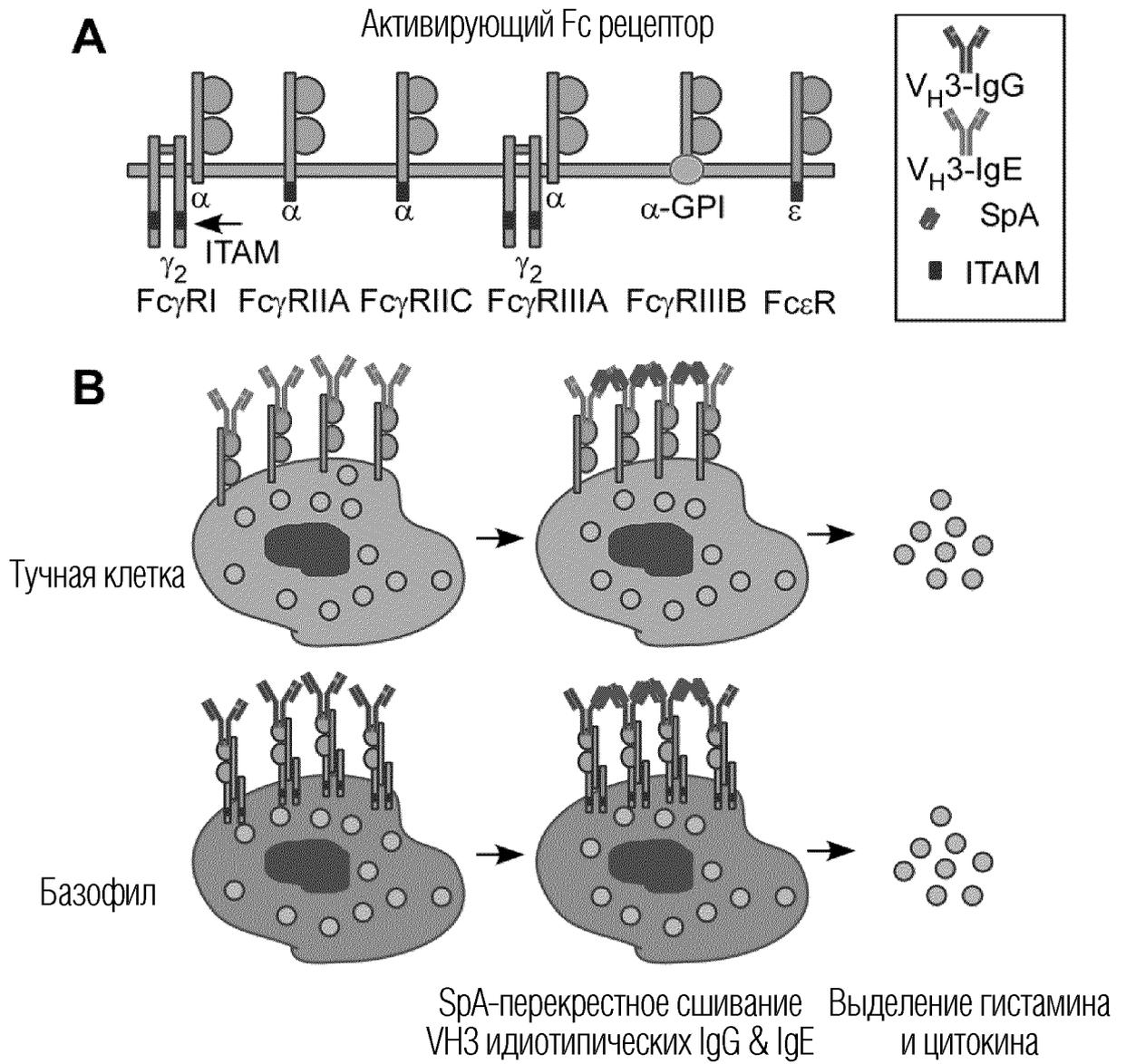
ФИГ. 17А-17В



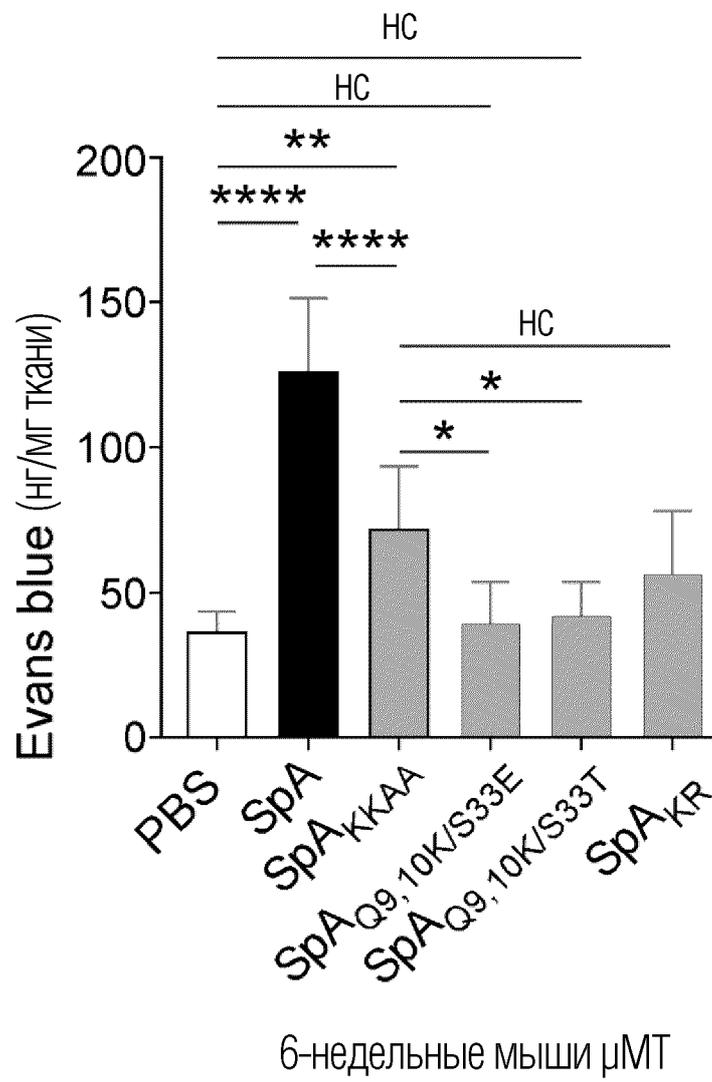
ФИГ. 18А-18В



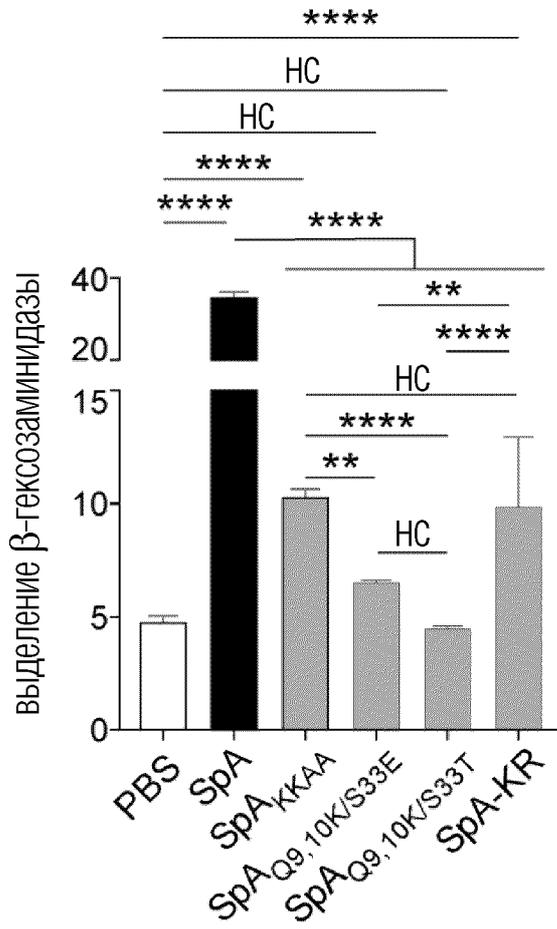
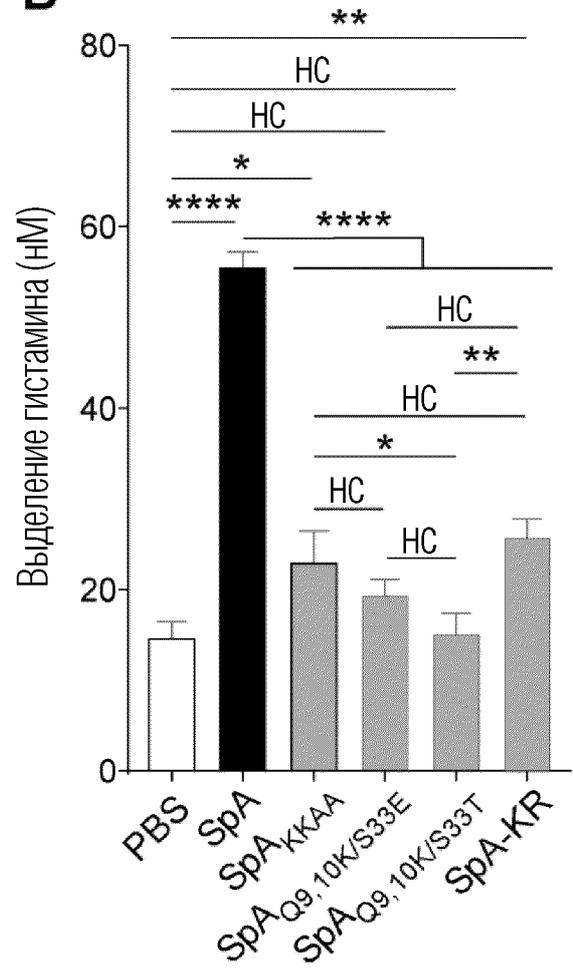
ФИГ. 19А-19В



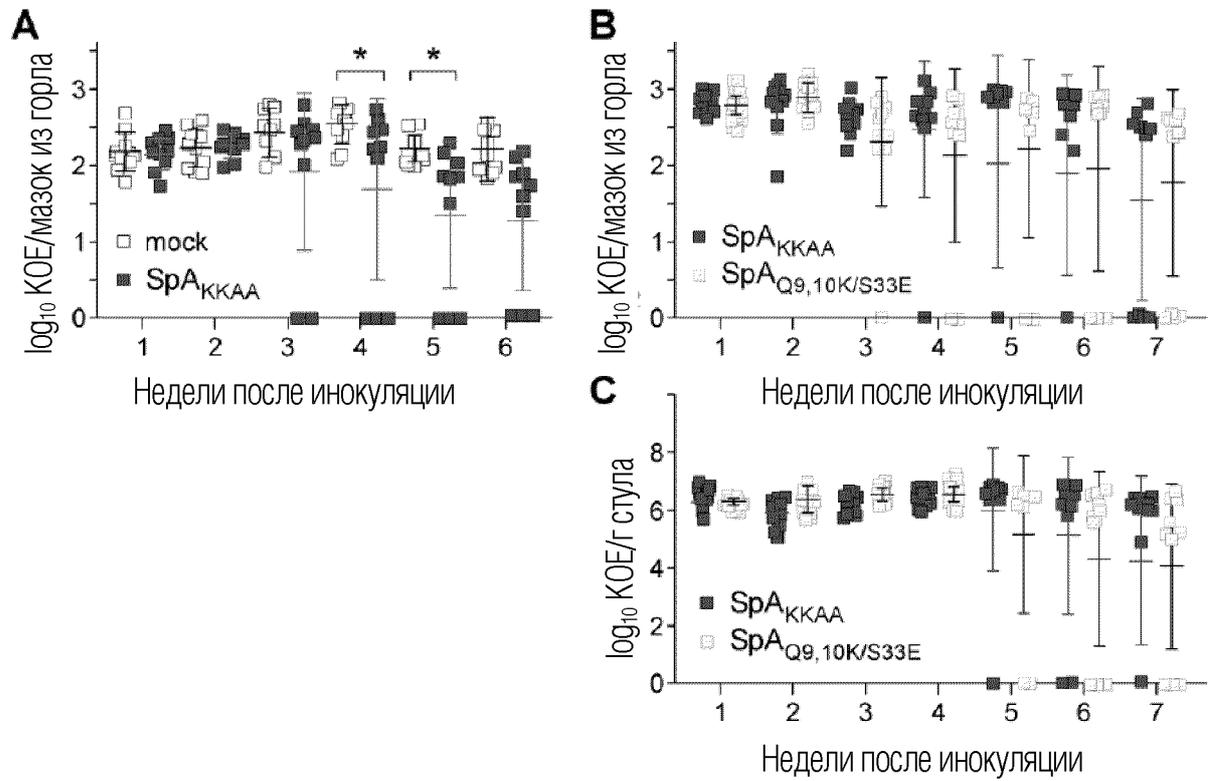
ФИГ. 21А-21В



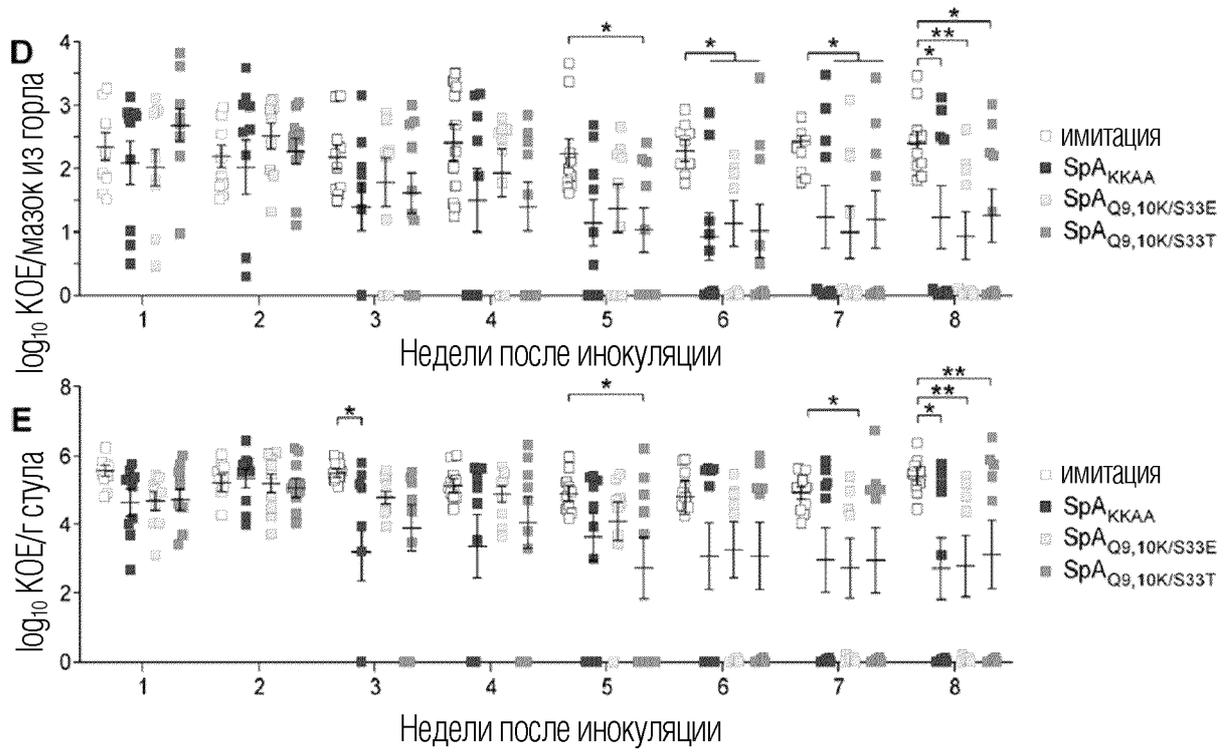
ФИГ. 22

A**B**

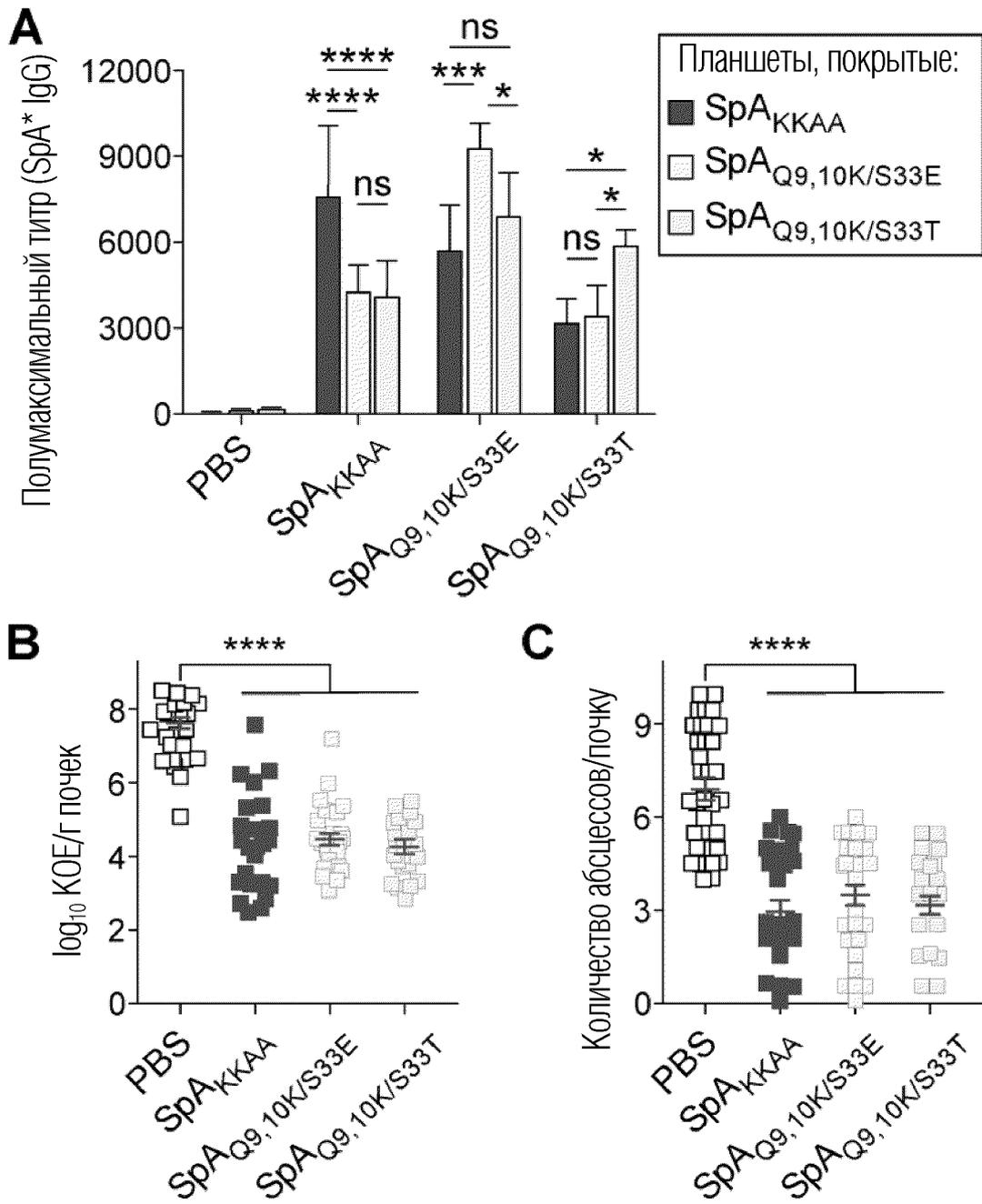
ФИГ. 23А-23В



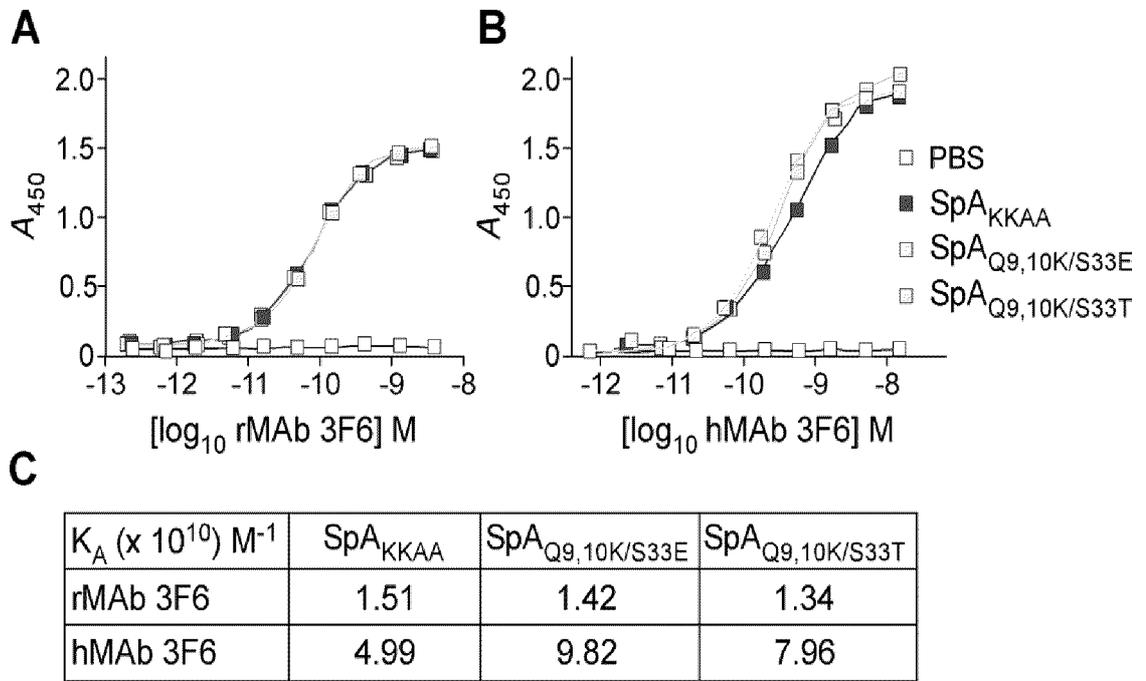
ФИГ. 24А-24С



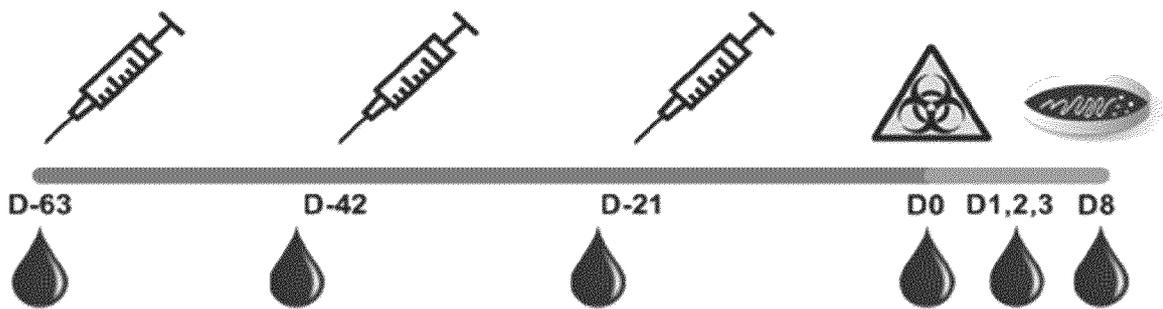
ФИГ. 24D-24E



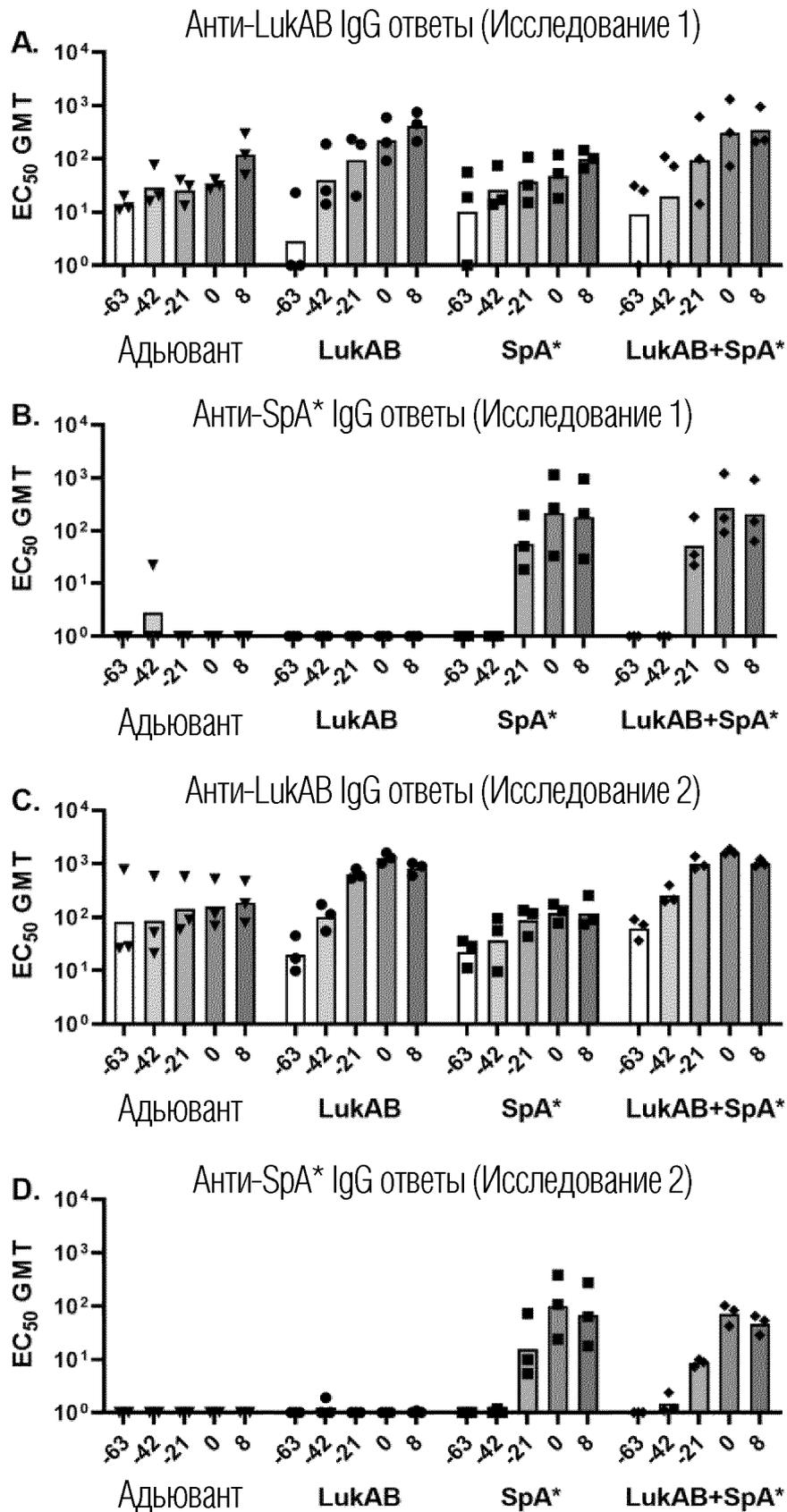
ФИГ. 25А-25С



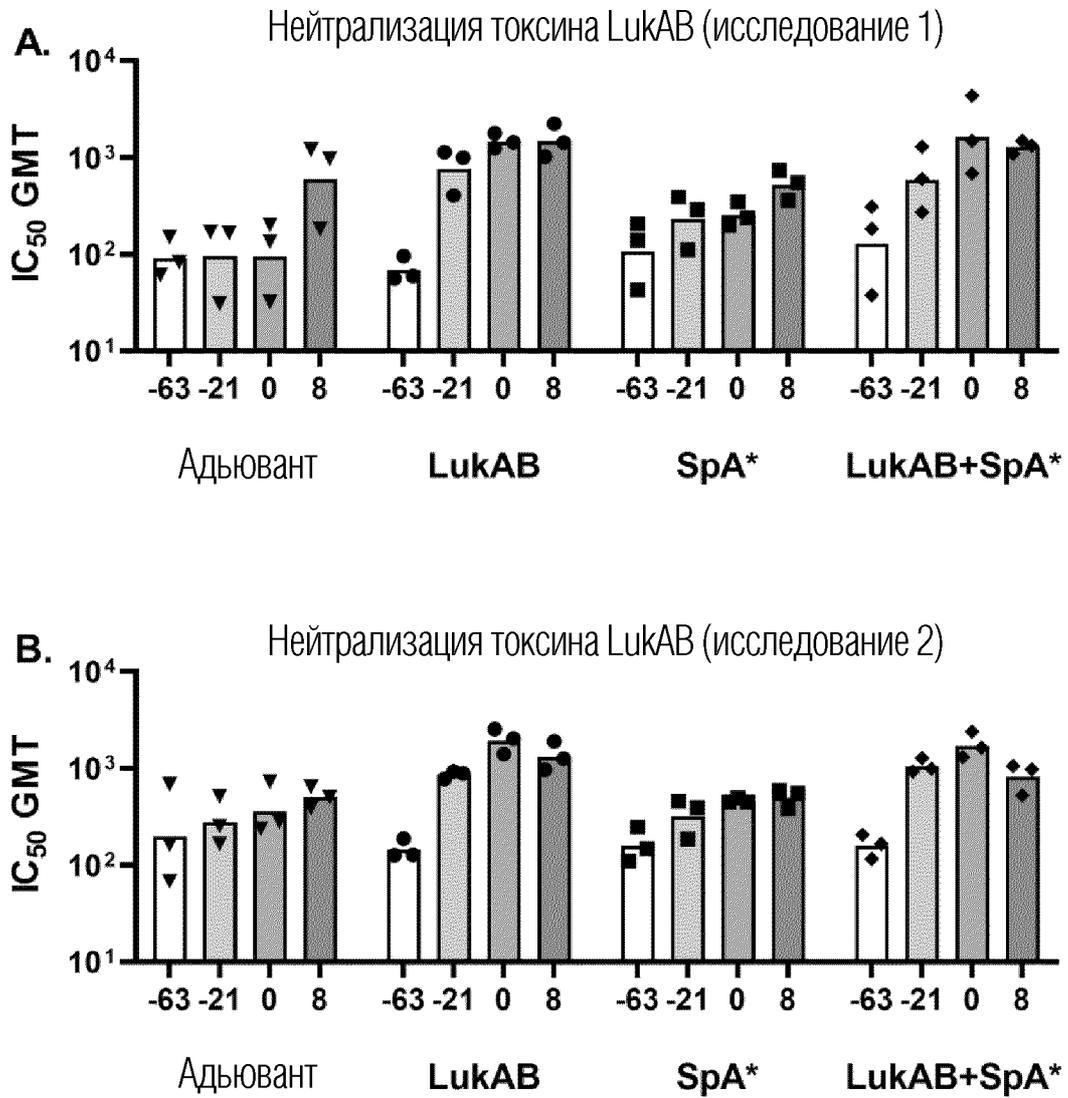
ФИГ. 26А-26С



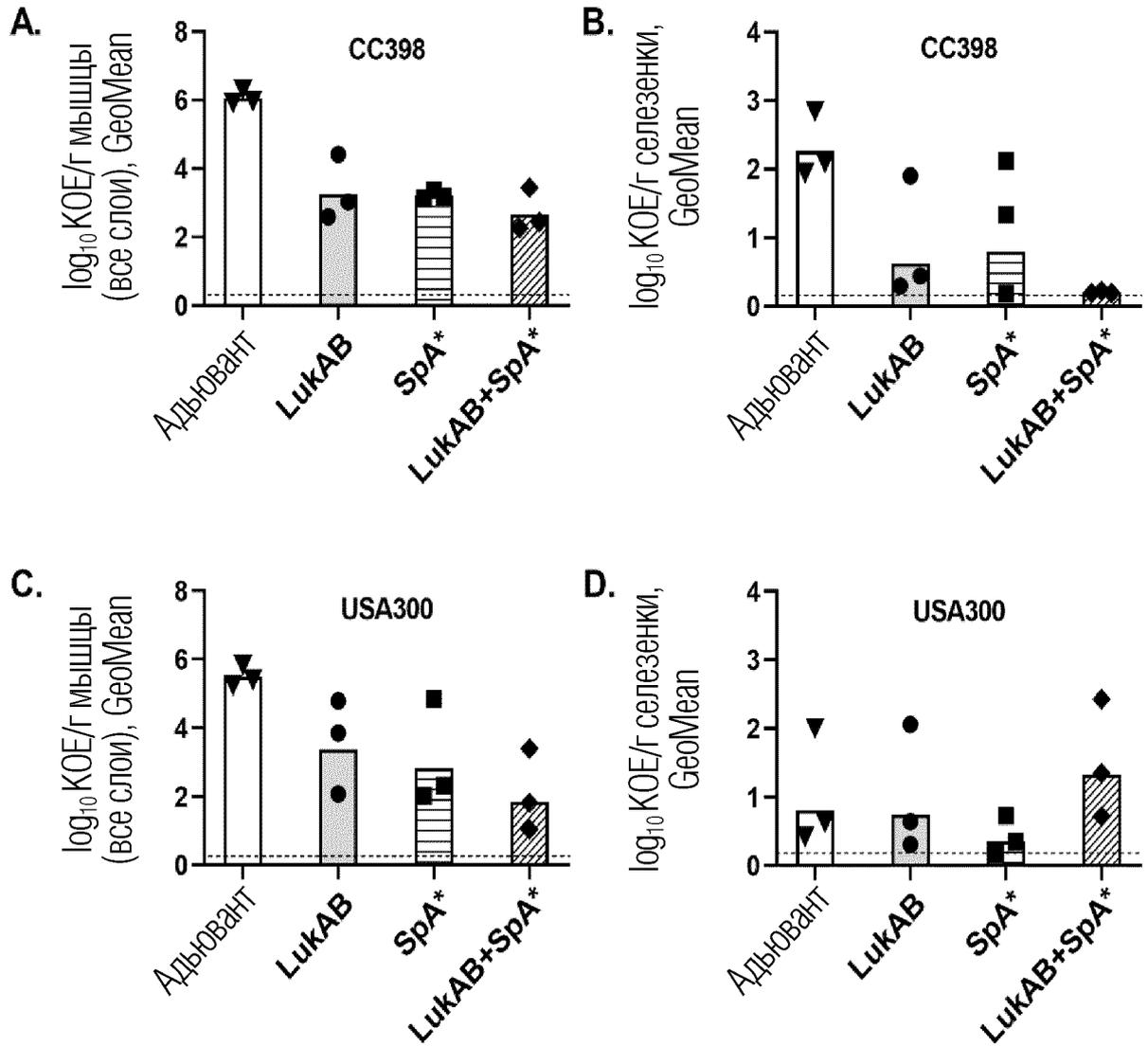
ФИГ. 27



ФИГ. 28А-28D



ФИГ. 29А-29В



ФИГ. 30А-30D