

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390972 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.13

(22) Дата подачи заявки
2021.09.28

(51) Int. Cl. *A61K 38/16* (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01)
A61K 39/085 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) ВАРИАНТЫ ПОЛИПЕПТИДОВ LukA и LukB STAPHYLOCOCCUS AUREUS И
ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

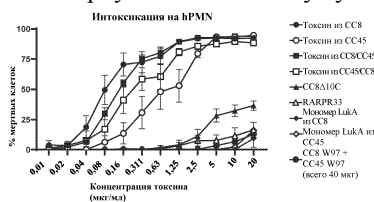
(31) 63/084,273
(32) 2020.09.28
(33) US
(86) PCT/US2021/052418
(87) WO 2022/067255 2022.03.31
(88) 2022.04.28
(71) Заявитель:

ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКЛЗ,
ИНК.; НЬЮ ЙОРК ЮНИВЕРСИТИ
(US)

(72) Изобретатель:
Морроу Брайан (US), Константинов
Сергей, Гёртсен Йерун (NL), Ло
Цзиньцюань, Сомани Сандип, Бакли
Питер Т., Торрес Виктор Дж. (US)

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

(57) Изобретение относится к вариантам полипептидов, которые представляют собой лейкоцидин А (LukA) и лейкоцидин В (LukB) *Staphylococcus aureus*, и полинуклеотидам, которые кодируют варианты полипептидов LukA, LukB и LukAB. Настоящее изобретение дополнительно относится к вакцинным композициям, которые содержат эти варианты LukA и LukB, и способам обеспечения генерирования иммунного ответа на *Staphylococcus aureus* у субъекта.



A1

202390972

202390972

A1

ВАРИАНТЫ ПОЛИПЕПТИДОВ LUKA И LUKB *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

5

[0001] Данная заявка испрашивает преимущество приоритета предыдущей заявки на патент США с серийным номером 63/084273, поданной 28 сентября 2020 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

10

[0002] Настоящее изобретение относится к вариантам белков и полипептидов, которые представляют собой лейкоцидин А (LukA) и лейкоцидин В (LukB) *Staphylococcus aureus*, вакцинным композициям, которые содержат эти варианты LukA и LukB, и применению описанных вакцинных композиций для индукции иммунного ответа у субъекта для лечения и/или предупреждения инфекции, обусловленной *Staphylococcus aureus*.

15

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] *Staphylococcus aureus* вызывает широкий спектр инвазивных заболеваний, включая сепсис, инфекционный эндокардит и токсичный шок, а также менее тяжелые инфекции кожи и мягких тканей (Tong et al., «*Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management», *Clin. Microbiol. Rev.* 28(3):603-661 (2015)). В настоящее время отсутствует одобренная вакцина против *S. aureus*, а варианты терапевтических средств дополнительно ограничены стремительно развивающейся резистентностью к антибиотикам (Sause et al., «Antibody-Based Biologics and Their Promise to Combat *Staphylococcus aureus* Infections», *Trends Pharmacol. Sci.* 37(3):231-241 (2016)). Способность *S. aureus* вызвать разные клинические синдромы часто связывают со значительными изменениями в содержимом генома (Copin et al., «After the Deluge: Mining *Staphylococcus aureus* Genomic Data for Clinical Associations and Host-Pathogen Interactions», *Curr. Opin. Microbiol.* 41:43-50 (2018) и Recker et al., «Clonal Differences in *Staphylococcus aureus* Bacteraemia-Associated Mortality», *Nat. Microbiol.* 2(10):1381-1388 (2017)). Стоит отметить, что приблизительно 40% генома не является общим для всех изолятов *S. aureus* (Bosi et al., «Comparative Genome-Scale Modelling of *Staphylococcus aureus* Strains Identifies Strain-Specific Metabolic Capabilities Linked to Pathogenicity», *Proc. Natl.*

20

25

30

Acad. Sci. USA 113(26):E3801-3809 (2016)), что еще больше усложняет идентификацию консервативных мишеней для создания вакцин и биологических препаратов.

[0004] Настоящее изобретение относится к преодолению этих и других ограничений в области техники.

5 СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Первый аспект настоящего изобретения относится к вариантам белков, которые представляют собой лейкоцидин А (LukA) *Staphylococcus aureus*, или соответствующих полипептидов. В одном аспекте вариант LukA представляет собой вариант белка или полипептида LukA с последовательностью под SEQ ID NO: 25, 10 предусматривающей наличие аминокислотной замены по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113, Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0006] Дополнительные аспекты данного изобретения относятся к вариантам LukA, которые предусматривают наличие одной или более аминокислотных замен, 15 делеций и/или добавлений, дополнительных к описанным выше. Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим варианты белка или полипептида LukA, и векторам экспрессии, содержащим вышеупомянутые молекулы нуклеиновой кислоты.

[0007] Другой аспект настоящего изобретения относится к вариантам белков, 20 которые представляют собой лейкоцидин В (LukB) *Staphylococcus aureus*, или соответствующих полипептидов. В одном аспекте вариант LukB представляет собой вариант белка или полипептида LukB с последовательностью под SEQ ID NO: 39, предусматривающей наличие аминокислотной замены по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Val53 в последовательности под SEQ 25 ID NO: 39.

[0008] В одном аспекте вариант LukB представляет собой вариант белка или полипептида LukB с последовательностью под SEQ ID NO: 39, предусматривающей наличие аминокислотной замены по аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154.

30 [0009] Дополнительные аспекты данного изобретения относятся к вариантам LukB, которые предусматривают наличие одной или более аминокислотных замен, делеций и/или добавлений, дополнительных к описанным выше. Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим варианты белка или

полипептида LukB, и векторам экспрессии, содержащим вышеупомянутые молекулы нуклеиновой кислоты.

[0010] Другой аспект настоящего изобретения относится к вектору экспрессии, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариант полипептида LukA, описанный в данном документе, функционально связанный с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид LukB или вариант полипептида LukB, описанные в данном документе.

[0011] Другой аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, которая содержит любой один или более векторов экспрессии, описанных в данном документе.

[0012] Другой аспект настоящего изобретения относится к вакцинной композиции против *Staphylococcus aureus*, которая содержит вариант полипептида LukA, описанный в данном документе.

[0013] Другой аспект настоящего изобретения относится к вакцинной композиции против *Staphylococcus aureus*, которая содержит вариант полипептида LukB, описанный в данном документе.

[0014] Другой аспект настоящего изобретения относится к вакцинной композиции против *Staphylococcus aureus*, которая содержит вариант полипептида LukA, описанный в данном документе, и вариант полипептида LukB, описанный в данном документе.

[0015] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу обеспечения генерирования иммунного ответа на *Staphylococcus aureus* у субъекта. Способ включает введение субъекту вакцинной композиции, описанной в данном документе, при условиях, эффективных для генерирования указанного иммунного ответа на *S. aureus* у указанного субъекта.

[0016] *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) отвечает за большое количество внутрибольничных и внебольничных инфекций. Для избежания клиренса, осуществляемого иммунной системой, *S. aureus* использует широкий спектр стратегий, включая секрецию двухкомпонентных порообразующих токсинов, известных как лейкоцидины. Каждый лейкоцидин состоит из двух полипептидов длиной приблизительно 300 аминокислот, которые разделяют на группы субъединиц, обеспечивающих нацеливание на клетку-хозяина (S от slow, исходя из ее хроматографического профиля элюции), и субъединиц, обеспечивающих полимеризацию (F от fast). В изолятах *S. aureus* человека описано до пяти

лейкоцидинов: лейкоцидин Пантона-Валентайна (PVL или LukSF-PV), гамма-гемолизины (HlgAB и HlgCB), лейкоцидин ED (LukED) и лейкоцидин AB (LukAB, также известный как LukGH). Лейкоцидины связываются со специфическими белковыми рецепторами поверхности клетки и собираются в олигомерные поры, в конце концов приводя к лизису клеток из-за быстрого нарушения регуляции осмоса (Spaan et al., «Leukocidins: Staphylococcal Bi-Component Pore-Forming Toxins find their Receptors» *Nat. Rev. Microbiol.* 15(7):435-447(2017)).

[0017] Недавно идентифицированный лейкоцидин, LukAB (DuMont et al., «Characterization of a New Cytotoxin that Contributes to *Staphylococcus aureus* Pathogenesis» *Mol. Microbiol.* 79(3):814-825 (2011)), характеризуется несколькими уникальными особенностями, которые отличают его от других двухкомпонентных лейкоцидинов. Субъединицы LukA (тип S) и LukB (тип F) в растворе существуют скорее как предварительно собранный димер, а не отдельные мономеры (DuMont et al., «Identification of a Crucial Residue Required for *Staphylococcus aureus* LukAB Cytotoxicity and Receptor Recognition» *Infection and Immunity* 82(3):1268-1276 (2014)). Кроме того, LukAB нацеливается на интегрин CD11b/CD18 на поверхности клетки-хозяина (DuMont et al., «*Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1» *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(26):10794-9 (2013)), в отличие от PVL, LukED, HlgAB и HlgCB, которые взаимодействуют со специфическими семиспиральными хемокиновыми рецепторами (Spaan et al., «Leukocidins: Staphylococcal Bi-Component Pore-Forming Toxins find their Receptors» *Nat. Rev. Microbiol.* 15(7):435-447(2017)). В конце концов, LukAB является основным токсином, ответственным за опосредствованный *S. aureus* лизис клеток в моделях инфекции *ex vivo* с использованием первичных лейкоцитов человека (DuMont et al., «Characterization of a New Cytotoxin that Contributes to *Staphylococcus aureus* Pathogenesis» *Mol. Microbiol.* 79(3):814-825 (2011)). Эти уникальные особенности, вероятно, объясняются отличием LukAB от других лейкоцидинов. Как правило, в каждой группе S- и F-компоненты характеризуются 71—82% и 65—81% идентичностью соответственно, тогда как LukA и LukB характеризуются всего лишь 30% и 39% идентичностью с другими лейкоцидинами. Важно, что лейкоцидин AB (LukAB) присутствует во всех изолятах, являющихся инфекционными для человека, описанных на сегодняшний день, и он характеризуется расхождением аминокислотной последовательности, составляющим до 20%, у наиболее отдаленных линий стафилококка.

[0018] Учитывая важность токсина LukAB в патогенезе и инфекции, обусловленных *S. aureus*, в данном документе раскрыты новые варианты белков и полипептидов LukA и LukB. Варианты белков и полипептидов LukA и LukB, раскрытые в данном документе, сохраняют свою способность димеризоваться друг с другом, что делает их идеальными кандидатами для применения в вакцине, поскольку они сохраняют и презентуют иммунной системе нативную структуру токсина для стойкого иммунного ответа, но у них отсутствует цитотоксическая активность. Учитывая большое количество лиц, которые ежегодно заражаются *S. aureus*, вполне вероятно, что значительная часть этих инфекций будет рефрактерной к лечению традиционными курсами антибиотиков. Инновационный подход к лечению и, что более важно, предупреждению таких инфекций, описанный в данном документе, предусматривает ингибирование факторов вирулентности *S. aureus*, таких как LukAB, которые отвечают за уничтожение полиморфноядерных лейкоцитов (PMN), наиболее важных клеток врожденного иммунитета, вовлеченных в защиту от инфекции, обусловленной *S. aureus*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0019] На ФИГ. 1 представлено выравнивание пятнадцати разных аминокислотных последовательностей LukA *Staphylococcus aureus*, включая LukA из клонального комплекса (CC) 8 (SEQ ID NO: 1); CC45 (SEQ ID NO: 2); HMPREF0772_044(TCH60) из CC30 (SEQ ID NO: 27); SAR2108(MRSA252) из CC30 (SEQ ID NO: 36); SALG_02329(A9635) из CC45 (SEQ ID NO: 34); SAPIG2061(ST398) из CC398 (SEQ ID NO: 35); SATG_01930(D139) из CC10 (SEQ ID NO: 37); NEWMAN из CC8 (SEQ ID NO: 26); SAB1876C(RF122) из CC151 (SEQ ID NO: 32); SAV2005(Mu50) из CC5 (SEQ ID NO: 38); SA1813(N315) из CC5 (SEQ ID NO: 31); SACOL2006 из CC8 (SEQ ID NO: 33); HMPRE0776_0173 USA300(TCH959) из CC7 (SEQ ID NO: 29); HMPREF0774_2356 TCH130 из CC72 (SEQ ID NO: 28) и MW1942 (MW2) из CC1 (SEQ ID NO: 30). Аминокислотная последовательность большинства последовательностей LukA, полученная в результате сравнения выравненных последовательностей, представлена как последовательность под SEQ ID NO: 25. Места аминокислотных замен, описанных в данном документе, также идентифицированы в каждой из последовательностей LukA.

[0020] На ФИГ. 2 представлено выравнивание четырнадцати разных аминокислотных последовательностей LukB *Staphylococcus aureus*, включая LukB из CC8 (SEQ ID NO: 15); CC45 (SEQ ID NO: 16); A9635 из CC45 (SEQ ID NO: 40); E1410

из CC30 (SEQ ID NO: 43); MRSA252 из CC30 (SEQ ID NO: 45); D139 из CC10 (SEQ ID NO: 42); Mu.50 из CC5 (SEQ ID NO: 46); JKD6008 из CC239 (SEQ ID NO: 44); COL из CC8 (SEQ ID NO: 41); USA300_FPR3757 из CC8 (SEQ ID NO: 50); NEWMAN из CC8 (SEQ ID NO: 51); RF122 из CC151 (SEQ ID NO: 48); MW2 из CC1 (SEQ ID NO: 47) и TCH130 из CC72 (SEQ ID NO: 49). Аминокислотная последовательность большинства последовательностей LukB, полученная в результате сравнения выравненных последовательностей, представлена как последовательность под SEQ ID NO: 39. Места аминокислотных замен, описанных в данном документе, также идентифицированы в каждой из последовательностей LukB.

[0021] На ФИГ. 3 показана цитотоксичность разных вариантов LukAB, примененных для иммунизации. Интоксикацию первичных PMN человека ($n = 4$) с помощью титров разных вариантов LukAB проводили в течение 1 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью CellTiter. Данные представляют собой среднее значение $\pm$ SEM по данным 4 доноров, полученным в 2 отдельных экспериментах.

[0022] На ФИГ. 4А–4В показаны титры антител к LukAB из CC8 или CC45 у мышей, иммунизированных разными вариантами LukAB. Мышам Envigo Hsd:ND4 (в возрасте 4 недели) ($n = 5$ /антиген) подкожно вводили 20 мкг LukAB в 50 мкл 10% глицерина 1X TBS, смешанного с 50 мкл адьюванта TiterMax® Gold. Когорта из 5 мышей также получала иммунизацию имитационным контролем, который состоял из равных объемов 10% глицерина 1X TBS и TiterMax® Gold. После двух бустерных введений (интервал между бустерными введениями составлял 2 недели) одного и того же коктейля антигена и адьюванта у мышей брали кровь с помощью сердечной пункции и получали сыворотку крови. Образцы сыворотки крови от иммунизированных мышей, у которых для иммунизации использовали указанные антигены, объединяли и серийно разводили для определения титров антител к LukAB из CC8 (ФИГ. 4А) или LukAB из CC45 (ФИГ. 4В). Планшеты покрывали с использованием 2 мкг/мл LukAB из CC8 или CC45. Тепловая карта показывает среднее значение поглощения, полученное в повторных измерениях.

[0023] На ФИГ. 5 представлен профиль нейтрализации для образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных разными вариантами LukAB, в отношении разных токсинов LukAB. Интоксикация PMN человека ($n = 4$) в течение 1 ч. с помощью 0,156 мкг/мл (LD90) указанных вариантов LukAB в присутствии 4—0,031% образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных указанными антигенами. Образцы сыворотки крови от иммунизированных мышей, у которых для иммунизации

использовали указанные антигены, перед использованием объединяли и инактивировали путем нагревания. Жизнеспособность клеток определяли с помощью CellTiter. На тепловой карте представлен средний процент гибели клеток у 4 доноров, при этом черный цвет обозначает отсутствие гибели клеток, а белый цвет обозначает 100% гибель клеток.

[0024] На ФИГ. 6А–6С представлены таблицы, в которых показан процент мертвых полиморфноядерных лейкоцитов человека после интоксикации с помощью LD₉₀ вариантов токсина LukAB по последовательности при отсутствии или в присутствии 2% (ФИГ. 6А), 1% (ФИГ. 6В) и 0,5% (ФИГ. 6С) образцов сыворотки крови мыши от мышей, иммунизированных указанным антигеном. Данные представлены как процент мертвых клеток. Клетки без заштриховывания представляют наиболее низкий уровень гибели клеток, а клетки с наиболее темным серым заштриховыванием представляют наиболее высокий уровень гибели клеток.

[0025] На ФИГ. 7А–7D показано, что интоксикация с помощью LukAB RARPR-33 в высоких концентрациях не является цитотоксической. Свежевыделенные PMN человека от здоровых доноров ($n = 4—6$) инкубировали в течение 1 часа с вариантами LukAB в разных концентрациях. Жизнеспособность клеток определяли по поглощению CellTiter (ФИГ. 7А и 7В). Процент мертвых клеток рассчитывали путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X100, которые принимали за 100% мертвых. Показано среднее $\pm$ SEM. PMN человека, выделенные от здоровых доноров ($n = 4—6$), инкубировали в течение 2 часов с вариантами LukAB в разных концентрациях. Жизнеспособность клеток определяли по высвобождению LDH (ФИГ. 7С и 7D). Показано среднее $\pm$ SEM.

[0026] На ФИГ. 8А–8D показана интоксикация, обусловленная LukAB RARPR-33 и анатоксином D39A/R23E в высоких концентрациях. Свежевыделенные PMN человека от здоровых доноров ($n = 5$) инкубировали в течение 2 часов с вариантами LukAB в разных концентрациях. Жизнеспособность клеток определяли по поглощению CellTiter (ФИГ. 8А и 8В). Процент мертвых клеток рассчитывали путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X100, которые принимали за 100% мертвых. Показано среднее $\pm$ SEM. PMN человека, выделенные от здоровых доноров ($n = 5$), инкубировали в течение 2 часов с вариантами LukAB в разных концентрациях. Жизнеспособность клеток определяли по высвобождению LDH (ФИГ. 8С и 8D). Показано среднее $\pm$ SEM.

[0027] На ФИГ. 9 показан профиль нейтрализации образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных двумя разными анатоксинами LukAB по сравнению с разными токсинами LukAB. Интоксикация PMN человека ($n = 4$) в течение 1 ч. с помощью 0,156 мкг/мл (LD_{90}) указанных вариантов токсина LukAB в присутствии 0,125% образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных двумя разными антигенами. Образцы сыворотки крови от иммунизированных мышей, у которых для иммунизации использовали оба указанных антигена, перед использованием объединяли и инактивировали путем нагревания. Жизнеспособность клеток определяли с помощью CellTiter. На гистограммах показано среднее $\pm$ SEM по данным 4 разных доноров. Статистическую значимость определяли с помощью непарного t-критерия, а $P < 0,05$ считали значительным. $*P < 0,05$, $**P < 0,001$, $***P < 0,0001$.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0028] Настоящее изобретение относится к вариантам белков и полипептидов, которые представляют собой лейкоцидин *Staphylococcus aureus*, и композициям, содержащим эти варианты белков и полипептидов. Настоящее изобретение также относится к способам предупреждения у субъекта инфекций, обусловленных *Staphylococcus aureus*.

Определения

[0029] Прежде чем описывать композиции и способы по настоящему изобретению, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными композициями или методологиями, поскольку они могут отличаться. Нужно также понимать, что терминология, используемая в описании, предназначена лишь для описания конкретных версий или вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема вариантов осуществления в данном документе, который будет ограничиваться лишь прилагаемой формулой изобретения. Если не предусмотрено иное, все технические и научные термины, которые используются в данном документе, имеют такие же значения, которые обычно понятны специалисту средней квалификации в данной области. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в данном документе, могут быть применены при практическом осуществлении или тестировании вариантов осуществления предусмотренных в данном документе вариантов осуществления, дальше описаны предпочтительные способы, устройства и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как

признание того, что варианты осуществления в данном документе не имеют права предшествовать такому раскрытию в силу предшествующего изобретения.

[0030] Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственные числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[0031] Если не указано иное, то любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в данном документе, во всех случаях следует понимать как модифицированные термином «приблизительно». Таким образом, числовое значение обычно предусматривает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл предусматривает все значения в диапазоне от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Таким же образом диапазон концентраций от 1% до 10% (вес/об.) предусматривает диапазон от 0,9% (вес/об.) до 11% (вес/об.). Как используется в данном документе, применение числового диапазона однозначно предусматривает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, в том числе целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если в контексте явно не указано иное.

[0032] Если не указано иное, то термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалистам в данной области будут известны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанного в данном документе, или они смогут установить их путем осуществления лишь стандартных экспериментов. Предусматривается, что такие эквиваленты охвачены данным изобретением.

[0033] Используемые в данном документе термины «предусматривает», «предусматривающий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» или любые другие их вариации будут пониматься как предусматривающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не предусматривающие исключения любого другого целого числа или группы целых чисел, и при этом имеется в виду, что они являются неисключающими или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, предусматривающие перечень элементов, не обязательно ограничиваются только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не указанные или являющиеся неотъемлемой частью такой композиции, смеси, процесса, способа, изделия или устройства. Кроме того, если явно не указано иное, то «или» относится к включающему союзу «или», а не исключающему союзу «или». Например, условию А

или В отвечает любое из следующего: А истинно (или в наличии), а В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), а В истинно (или в наличии), и как А, так и В истинны (или в наличии). Используемый в данном документе термин-союз «и/или» между несколькими перечисленными элементами понимают как охватывающий как вариант с отдельными элементами, так и вариант с объединенными элементами. Например, если два элемента соединены с помощью «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимают как подпадающий под данное значение и, следовательно, удовлетворяющий требованию используемого в данном документе термина «и/или». Возможность одновременного применения более чем одного из вариантов также понимают как подпадающую под данное значение и, следовательно, удовлетворяющую требованию термина «и/или».

[0034] Используемый в данном документе термин «состоит из» или варианты, такие как «состоят из» или «состоящий из», используемые во всем описании или формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но при этом дополнительное целое число или группа целых чисел не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

[0035] Используемый в данном документе термин «состоит фактически из» или вариации, такие как «состоят фактически из» или «состоящий фактически из», используемые во всем 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 существенным образом не меняют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции.

[0036] Используемый в данном документе термин «субъект» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека. Термин «млекопитающее», используемый в данном документе, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают без ограничения коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. п., более предпочтительно человека.

[0037] Термины «приблизительно», «примерно», «как правило», «по сути» и подобные им термины, используемые в данном документе в отношении размера или

свойства компонента предпочтительного изобретения, следует рассматривать как указывающие на то, что описываемые размер/свойство не представляют собой строго установленное ограничение или параметр и не исключают небольшие отклонения от них, которые функционально являются идентичными или сходными, как это будет
 5 понятно специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, будут включать вариации, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в уровне техники (например, округление, ошибки измерения или другие систематические ошибки, допуски при производстве и т. п.), не будут изменять последнюю значащую цифру.

10 **[0038]** Термины «идентичный» или процентная «идентичность» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов (например, полипептидов *Staphylococcus* LukA и LukB и полинуклеотидов, которые их кодируют) относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или характеризуются
 15 определенным процентом аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании с обеспечением максимального соответствия в случае измерения с помощью одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или визуального анализа.

20 **[0039]** Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность выступает в роли эталонной последовательности, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости обозначают координаты подпоследовательностей и задают параметры программы алгоритма для сравнения последовательности. Затем с помощью алгоритма
 25 сравнения последовательностей вычисляют процентное значение идентичности последовательности для исследуемой(исследуемых) последовательности(последовательностей) относительно эталонной последовательности на основе заданных параметров программы.

30 **[0040]** Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Смита-Ватермана, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с помощью алгоритма гомологического выравнивания Нидлмана-Вунша, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью способа поиска сходства Пирсона-Липмана, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и

TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мадисон, Висконсин) или с помощью визуального анализа (см. в целом Current Protocols in Molecular Biology, под ред. F.M. Ausubel et al., Current Protocols, (1995 г., приложение)).

5 **[0041]** Примерами алгоритмов, которые подходят для определения процентного значения идентичности последовательностей и сходства 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 анализов BLAST является
10 общедоступным посредством Национального центра биотехнологической информации.

[0042] Помимо расчета процентного значения идентичности последовательностей алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Одним из показателей сходства, который
15 представлен алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), выражающая вероятность случайного совпадения двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей. Например, нуклеиновая кислота считается схожей с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении исследуемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой
20 составляет менее чем приблизительно 0,1, более предпочтительно менее чем приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее чем приблизительно 0,001.

[0043] Дополнительным признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептидов являются по сути идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, иммунологически
25 перекрестно реагирует с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно по сути идентичен второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот являются по сути идентичными, является то, что две молекулы гибридизируются друг с
30 другом в жестких условиях.

[0044] Используемый в данном документе термин «полинуклеотид», синонимично называемый «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может быть немодифицированной РНК или

ДНК или модифицированной РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» предусматривают без ограничения одно- и двухниточную ДНК, при этом ДНК представляет собой смесь одно- и двухниточных областей, одно- и двухниточную РНК и РНК, представляющую собой смесь одно- и двухниточных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одониточными или более типично двухниточными или представлять собой смесь одно- и двухниточных областей. Кроме того, «полинуклеотид» относится к трехниточным областям, содержащим РНК или ДНК или как РНК, так и ДНК. Термин «полинуклеотид» также предусматривает ДНК или РНК, содержащие одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с остовами, модифицированными для стабильности или по другим причинам. «Модифицированные» основания предусматривают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. ДНК и РНК могут подвергаться различным модификациям; 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.

[0045] Используемый в данном документе термин «вектор» относится, например, к любому количеству нуклеиновых кислот, в которые может быть вставлена желаемая последовательность, например, путем рестрикции и лигирования, для транспортирования между генетическими средами или для экспрессии в клетке-хозяине. Векторы нуклеиновых кислот могут представлять собой ДНК или РНК. Векторы предусматривают без ограничения плазмиды, фаги, фагмиды, геномы бактерий, геномы вирусов, самоамплифицирующуюся РНК, репликоны.

[0046] Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. «Клетка-хозяин» может быть клеткой любого типа, например первичной клеткой, клеткой в культуре или клеткой из линии клеток. В одном варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную или трансдуцированную молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему 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 исходной клетке, например, из-за мутаций или влияния окружающей среды, которые могут происходить в

последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[0047] Термин «экспрессия», используемый в данном документе, относится к биосинтезу продукта гена. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывает все естественные посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессируемый полипептид может находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для роста клеточной культуры, или быть заякоренным в клеточной мембране.

[0048] Используемые в данном документе термины «пептид», «полипептид» или «белок» могут относиться к молекуле, которая состоит из аминокислот и может распознаваться специалистами в данной области как белок. В данном документе используется обычный однобуквенный или трехбуквенный код для аминокислотных остатков. Термины «пептид», «полипептид» и «белок» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может быть прерван соединениями, отличными от аминокислот. Термины также охватывают полимер аминокислоты, который был модифицирован естественным образом или путем вмешательства; например образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгация с компонентом для мечения. Также в это определение включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, неестественные аминокислоты и т. д.), а также другие модификации, известные из уровня техники.

[0049] Полипептидные последовательности, описанные в данном документе, записаны в соответствии с общепринятой договоренностью, согласно которой N-концевая область пептида находится слева, а С-концевая область находится справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, представлена именно L-форма аминокислоты, если явно не указано иное.

[0050] 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 с помощью методик рекомбинантной ДНК) из источника их происхождения, или химических

предшественников, или других химических веществ (при химическом синтезе). Более того, выделенный полипептид относится к полипептиду, который может быть введен субъекту в виде выделенного полипептида; другими словами, полипептид не может просто считаться «выделенным», если он прикреплен к колонке или находится в геле.

- 5 Более того, «выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты» или «выделенный пептид» представляют собой фрагмент нуклеиновой кислоты или белка, который не встречается в природе в виде фрагмента и/или обычно не находится в функциональном состоянии.

10 **[0051]** Используемая в данном документе фраза «иммунный ответ» или ее эквивалент «иммунологический ответ» относятся к развитию гуморального (опосредованного антителами), клеточного (опосредованного антигенспецифическими Т-клетками или продуктами их секреции) или как гуморального, так и клеточного ответа, направленных на белок, пептид, углевод или полипептид по данному изобретению в организме субъекта-реципиента. Такой ответ может быть активным ответом, индуцированным введением иммуногена, или пассивным ответом, индуцированным введением антитела, материала, содержащего антитело, или праймированных Т-клеток. Клеточный иммунный ответ вызывается презентацией полипептидных эпитопов в ассоциации с молекулами МНС класса I или класса II, которая активирует антигенспецифические CD4 (+) Т-хелперные клетки и/или CD8 (+) цитотоксические Т-клетки. Ответ может также предусматривать активацию моноцитов, макрофагов, NK-клеток, базофилов, дендритных клеток, астроцитов, клеток микроглии, эозинофилов или других компонентов врожденного иммунитета. Используемый в данном документе термин «активный иммунитет» относится к любому иммунитету, формирующемуся у субъекта в результате введения антигена.

Варианты лейкоцидина A (LukA) *S. aureus*

25 **[0052]** Первый аспект настоящего изобретения относится к вариантам, *т. е.* белкам или полипептидам, представляющим собой лейкоцидин A (LukA) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), которые не встречаются в природе. Эти варианты белка или полипептида LukA предусматривают одну или более вставок, замен и/или делеций аминокислотных остатков, которые делают двухкомпонентный токсин LukAB нецитотоксическим, стабилизируют гетеродимер LukAB, повышают температуру плавления и/или увеличивают растворимость. Как описано в данном документе, эти варианты белка и полипептида LukA являются идеальными кандидатами для применения в качестве антигенов в вакцине, которые можно вводить отдельно или в комбинации с лейкоцидином B (LukB) дикого типа или вариантом белка или

полипептида. При введении в комбинации с белком LukB или его полипептидом полученный анатоксин имитирует структуру токсина LukAB *S. aureus*, тем самым обеспечивая генерирование устойчивого иммунного ответа на один из наиболее эффективных токсинов *S. aureus*. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA представляет собой вариант полноразмерного белка LukA, содержащий все аминокислотные остатки, соответствующие полноразмерной последовательности зрелого белка LukA. Как указано в данном документе, «зрелая» последовательность белка, представляющего собой лейкоцидин, представляет собой последовательность белка, представляющего собой лейкоцидин, лишенную сигнала секретиции на аминоконце, который обычно содержит первые 27—28 аминокислотных остатков на аминоконце.

[0053] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA представляет собой вариант, который меньше полноразмерного зрелого белка LukA. В любом варианте осуществления длина варианта полипептида LukA составляет по меньшей мере 100 аминокислотных остатков. В любом варианте осуществления длина варианта полипептида LukA составляет по меньшей мере 110, по меньшей мере 120, по меньшей мере 130, по меньшей мере 140, по меньшей мере 150, по меньшей мере 160, по меньшей мере 170, по меньшей мере 180, по меньшей мере 190, по меньшей мере 200, по меньшей мере 210, по меньшей мере 220, по меньшей мере 230, по меньшей мере 240, по меньшей мере 250, по меньшей мере 260, по меньшей мере 270, по меньшей мере 280, по меньшей мере 290, по меньшей мере 300 аминокислотных остатков.

[0054] Хотя иллюстративные варианты белка и полипептида LukA, описанные в данном документе, представляют собой варианты белка LukA из клональных комплексов CC8 (SEQ ID NO: 1) и CC45 (SEQ ID NO: 2) (см. таблицу 1 ниже), специалист в данной области легко поймет, что аминокислотные замены и/или делеции в LukA, идентифицированные в контексте последовательностей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, представляют собой аминокислотные остатки, являющиеся консервативными в различных клональных комплексах или в областях LukA, которые являются высококонсервативными в различных клональных комплексах. Действительно, выравнивание последовательностей белка LukA из пятнадцати различных штаммов *S. aureus* (см. ФИГ. 1) показывает, что аминокислотные остатки, идентифицированные в данном документе как остатки, которые подлежат вариации, являются остатками, которые являются консервативными во всех 15 выровненных аминокислотных

последовательностях LukA. Хотя положение идентифицированного остатка, который подлежит вариации, может отличаться между отдельными последовательностями LukA, выравнивание последовательности показывает соответствие между этими положениями. Для ясности — консенсусная последовательность LukA, содержащая аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, была создана с помощью выравнивания последовательностей и использовалась для определения местоположения конкретных аминокислотных вариаций. Например, аминокислотная замена по остатку лизина 83 в последовательности под SEQ ID NO: 25 соответствует остатку лизина в положении 80 в последовательности LukA под SEQ ID NO: 1, остатку лизина в положении 81 в последовательности LukA под SEQ ID NO: 2 и остатку лизина в положении 83 в последовательностях LukA под SEQ ID NO: 26—38. Таким образом, идентифицированные аминокислотные вариации, описанные в данном документе, могут быть универсально применены к соответствующим аминокислотным остаткам в любой аминокислотной последовательности LukA, известной сейчас или в будущем.

[0055] В соответствии с этим аспектом данного изобретения в любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает вставку, замену и/или делецию аминокислотного остатка по одному или более аминокислотным остаткам, соответствующим остаткам Lys83, Ser141, Val113, Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA дополнительно предусматривает аминокислотную замену или делецию по аминокислотному остатку, который соответствует Glu323 в последовательности под SEQ ID NO: 25, в дополнение к одной или более вставкам, заменам и/или делециям аминокислотных остатков, которые описаны выше. В любом варианте осуществления аминокислотная замена или делеция по Glu323 предусматривает замену глутаминовой кислоты на аланин в положении 323 (Glu323Ala) в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0056] В любом варианте осуществления аминокислотная замена в одном или более идентифицированных положениях LukA (и LukB, как описано в настоящем документе) является консервативной заменой. Такие консервативные замены подразумевают замену одного аминокислотного остатка на другой, принадлежащий к тому же классу, который действует как функциональный эквивалент, что приводит к сайленс-изменению. То есть изменение относительно нативной последовательности не будет заметно снижать основные свойства LukA. Эти классы аминокислотных остатков предусматривают неполярные (гидрофобные) аминокислоты (например, аланин,

лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин); полярные нейтральные аминокислоты (например, глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин); положительно заряженные (основные) аминокислоты (например, аргинин, лизин и гистидин) и отрицательно заряженные (кислотные) аминокислоты (например, аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту).

[0057] В других вариантах осуществления аминокислотная замена в одном или более идентифицированных положениях варианта полипептида, представляющего собой лейкоцидин, описанного в данном документе, является изменением, отличным от консервативного (т. е. заменой, которая нарушает последовательность, структуру, функцию или активность идентифицированной области). Такая замена может быть желательна в целях снижения или ослабления цитотоксичности белка. Замена, отличная от консервативной, предусматривает замену аминокислотного остатка одного конкретного класса на аминокислотный остаток другого класса. Например, замена неполярного (гидрофобного) аминокислотного остатка на полярную нейтральную аминокислоту или *наоборот*. В другом варианте осуществления замена, отличная от консервативной, предусматривает замену положительно заряженного (основного) аминокислотного остатка на отрицательно заряженный (кислотный) аминокислотный остаток, такой как аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота, или *наоборот*. Такие молекулярные изменения могут быть осуществлены способами, хорошо известными из уровня техники, включая расширение праймера на плазмидной матрице с использованием одониточных матриц (работа Kunkel et al., *Proc. Acad. Sci., USA* 82:488-492 (1985), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), матриц двухниточной ДНК (работа Papworth, et al., *Strategies* 9(3):3-4 (1996), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и путем ПЦР-клонирования (работа Braman, J. (ред.), *IN VITRO MUTAGENESIS PROTOCOLS*, 2-е издание Humana Press, Totowa, N.J. (2002), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0058] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену лизина на метионин по остатку, который соответствует лизину в положении 83 (Lys83Met) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену лизина на метионин по остатку, который соответствует лизину в положении 80 (Lys80Met) в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по

настоящему изобретению предусматривает замену лизина на метионин по остатку, который соответствует лизину в положении 81 (Lys81Met) в последовательности под SEQ ID NO: 2.

5 [0059] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену серина на аланин по остатку, который соответствует серину в положении 141 (Ser141Ala) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену серина на аланин по остатку, который соответствует серину в положении 138 (Ser138Ala) в последовательности под
10 SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену серина на аланин по остатку, который соответствует серину в положении 139 (Ser139Ala) в последовательности под SEQ ID NO: 2.

15 [0060] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену валина на изолейцин по остатку, который соответствует валину в положении 113 (Val113Ile) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену валина на изолейцин по остатку, который соответствует валину в положении 110 (Val110Ile) в последовательности под
20 SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену валина на изолейцин по остатку, который соответствует валину в положении 111 (Val111Ile) в последовательности под SEQ ID NO: 2.

25 [0061] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену валина на изолейцин по остатку, который соответствует валину в положении 193 (Val193Ile) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену валина на изолейцин по остатку, который соответствует валину в положении 190 (Val190Ile) в последовательности под
30 SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену валина на изолейцин по остатку, который соответствует валину в положении 191 (Val191Ile) в последовательности под SEQ ID NO: 2.

[0062] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену глутаминовой кислоты на аланин по остатку, который соответствует остатку глутаминовой кислоты в положении 323 (Glu323Ala) в последовательности под SEQ ID NO: 25, в дополнение к любой одной или более заменам по остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену глутаминовой кислоты на аланин по остатку, который соответствует остатку глутаминовой кислоты в положении 320 (Glu320Ala) в последовательности под SEQ ID NO: 1, в дополнение к любой одной или более заменам по остаткам, которые соответствуют Lys80, Ser138, Val110, Val190 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает замену глутаминовой кислоты на аланин по остатку, который соответствует остатку глутаминовой кислоты в положении 321 (Glu321Ala) в последовательности под SEQ ID NO: 2, в дополнение к любой одной или более заменам по остаткам, которые соответствуют Lys81, Ser139, Val111, Val191 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0063] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает полипептид, который характеризуется наличием вставки, замены и/или делеции аминокислотного остатка по двум из вышеуказанных аминокислотных остатков, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает вставку, замену и/или делецию аминокислотного остатка в трех из вышеуказанных аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает вставку, замену и/или делецию аминокислотного остатка по всем четырем из вышеуказанных аминокислотных остатков. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены лизина на метионин, серина на аланин и валина на изолейцин по вышеуказанным аминокислотным остаткам, которые соответствуют Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile и Val193Ile в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA дополнительно предусматривает аминокислотную замену глутаминовой кислоты на аланин по аминокислотному остатку, который соответствует остатку 323 (Glu323Ala) в последовательности под SEQ ID NO: 25, то есть вариант

LukA предусматривает замены, которые соответствуют Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0064] Иллюстративный вариант полипептида LukA по настоящему изобретению предусматривает наличие аминокислотных замен, которые соответствуют Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA представляет собой вариант LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile и Glu320Ala в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления этот вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3.

[0065] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile и Glu321Ala в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления этот вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4. Другие иллюстративные варианты полипептида LukA включают любой из белков LukA с последовательностями под SEQ ID NO: 26—38, которые предусматривают аминокислотные замены, которые соответствуют Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0066] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA, описанный в данном документе, предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В одном варианте осуществления аминокислотные замены по одному или более вышеуказанным остаткам обеспечивают введение остатков цистеина, способных образовывать дисульфидные связи для стабилизации конформации гетеродимерной

структуры LukAB. Например, в одном варианте осуществления вариант полипептида LukA, описанный в данном документе, предусматривает замену тирозина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Tyr74 (Tyr74Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25, и предусматривает замену аспарагина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Asp140 (Asp140Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25. Эти остатки цистеина в положениях 74 и 140 образуют дисульфидную связь, за счет чего повышается термостабильность варианта LukA относительно LukA дикого типа или относительно других вариантов полипептида LukA, которые не содержат спаренных остатков цистеина, способных образовывать дисульфидную связь.

[0067] В другом варианте осуществления вариант полипептида LukA, описанный в данном документе, предусматривает замену глицина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Gly149 (Gly149Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25, и предусматривает замену глицина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Gly156 (Gly156Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25. Эти остатки цистеина, введенные в положениях 149 и 156, образуют дисульфидную связь, за счет этого повышается термостабильность варианта LukA относительно LukA дикого типа или относительно других вариантов полипептида LukA, которые не содержат спаренных остатков цистеина, способных образовывать дисульфидную связь.

[0068] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина, как описано выше. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Tyr71, Asp137, Gly146 и Gly153 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Tyr72, Asp138, Gly147 и Gly154 в последовательности под

SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина.

[0069] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323, в комбинации с аминокислотной заменой по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA содержит аминокислотные замены по аминокислотным остаткам, которые соответствуют остаткам Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323 и остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0070] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80, Ser138, Val110, Val190, Glu320, Tyr71, Asp137, Gly146 и Gly153 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Glu320Ala, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys и Gly153Cys в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления этот вариант полипептида LukA из CC8 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5.

[0071] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys81, Ser139, Val111, Val191, Glu321, Tyr72, Asp138, Gly147 и Gly154 в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile,

Glu321Ala, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys и Gly154Cys в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления этот вариант полипептида LukA из CC45 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6.

[0072] Другие иллюстративные варианты полипептида LukA предусматривают любой из белков LukA с последовательностями под SEQ ID NO: 26—38, которые предусматривают аминокислотные замены, которые соответствуют Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile, Glu323, Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0073] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA, описанный в данном документе, предусматривает аминокислотную замену или делецию по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант LukA предусматривает замену по остатку, который соответствует Thr249, где замена по этому остатку представляет собой замену треонина на валин (Thr249Val). В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA, описанный в данном документе, предусматривает аминокислотную замену или делецию по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Thr246 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA, описанный в данном документе, предусматривает аминокислотную замену или делецию по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Thr247 в последовательности под SEQ ID NO: 2.

[0074] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA, описанный в данном документе, предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25, в комбинации с любой из других замен аминокислотного остатка, описанных в данном документе, то есть заменами по остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323, Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA, описанный в данном документе, предусматривает аминокислотную

замену по аминокислотному остатку, который соответствует Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25, в комбинации с по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью, по меньшей мере шестью, по меньшей мере семью, по меньшей мере восемью или всеми девятью другими заменами аминокислотных остатков, описанными в данном документе. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому остатку, который соответствует Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323 и Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0075] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80, Ser138, Val110, Val190, Glu320 и Thr246 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Glu320Ala и Thr246Val в последовательности под SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из вышеупомянутых положений, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 7.

[0076] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys81, Ser139, Val111, Val191, Glu321 и Thr247 в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Glu321Ala и Thr247Val в последовательности под SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA, который предусматривает

аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из вышеупомянутых положений, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8.

[0077] Другие иллюстративные варианты полипептида LukA предусматривают любой из белков LukA с последовательностями под SEQ ID NO: 26—38, которые предусматривают описанные аминокислотные замены по аминокислотным остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323 и Thr249 в последовательности под SEQ ID NO:25.

[0078] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому остатку, который соответствует Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323, Thr249, Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0079] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80, Ser138, Val110, Val190, Glu320, Tyr71, Asp137, Gly146, Gly153 и Thr246 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Glu320Ala, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys и Thr246Val в последовательности под SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из вышеупомянутых положений, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9.

[0080] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют

- каждому из Lys81, Ser139, Val111, Val191, Glu321, Tyr72, Asp138, Gly147, Gly154 и Thr247 в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Glu321Ala, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys и Thr247Ala в последовательности под SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из вышеупомянутых положений, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10.
- [0081]** Другие иллюстративные варианты полипептида LukA предусматривают любой из белков LukA с последовательностями под SEQ ID NO: 26—38, которые предусматривают описанные аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323, Thr249, Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.
- [0082]** В таблице 1 ниже приведены иллюстративные варианты аминокислотных последовательностей LukA, раскрытых в данном документе.

Таблица 1. Иллюстративные аминокислотные последовательности полипептида LukA

SEQ ID NO	Название	Описание
1	LukA CC8 WT	HKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRNVTNKDKNSTAPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKLFESHKEEKNSNLWKYPSEYHVDVFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVTYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG
2	LukA CC45 WT	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKLFESHNETNASWLKYPSEYHVDVFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSLGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKSYSYNQNYDTIASGK

		NNNRHVHWSVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTR LSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKT NDKTRFEVITYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDG QRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSDDQNKPYKEG
3	LukA CC8 W95 E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile	HKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRNVNNDKDNSTAP DDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPY DKNVLLVK <u>M</u> QGSIHNLKFESHKEEKNSNWLKYPSE YH <u>I</u> DFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDA <u>T</u> FSYSS GGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKN NNWHVHWS <u>I</u> IANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRI ATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKS NEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKKNKDGQ RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYPK <u>A</u> G
4	LukA CC45 W95 E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPG PDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDP YDKNVLLVK <u>M</u> QGSIHNLKFESHNETNASWLKYP SEYH <u>I</u> DFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDA <u>T</u> FSY SLGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKISYNQQNYDTIASG KNNNRHVHWS <u>I</u> IVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTR RLSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEK TNDKTRFEVITYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKD GQRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSDDQNKPYK <u>A</u> G
5	LukA CC8 W95W72 E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	HKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRNVNNDKDNSTAP DDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDP <u>C</u> DKNVLLVK <u>M</u> QGSIHNLKFESHKEEKNSNWLKYPSE YH <u>I</u> DFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKVCA <u>T</u> FSYSS G <u>C</u> KFDSTK <u>C</u> IGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKN NNWHVHWS <u>I</u> IANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRI ATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKS NEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKKNKDGQ RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYPK <u>A</u> G
6	LukA CC45 W95W72 E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPG PDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDP <u>C</u> DKNVLLVK <u>M</u> QGSIHNLKFESHNETNASWLKYP SEYH <u>I</u> DFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVCA <u>T</u> FSY SLG <u>C</u> KFDSTK <u>C</u> IGRTSSNSYSKISYNQQNYDTIASG KNNNRHVHWS <u>I</u> IVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTR RLSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEK TNDKTRFEVITYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKD GQRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSDDQNKPYK <u>A</u> G
7	LukA CC8 W97 E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Thr246Val	HKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRNVNNDKDNSTAP DDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPY DKNVLLVK <u>M</u> QGSIHNLKFESHKEEKNSNWLKYPSE YH <u>I</u> DFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKVNA <u>T</u> FSYSS GGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKN NNWHVHWS <u>I</u> IANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRI

		ATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFL <u>V</u> YLSNEKS NEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKKNKDGQ RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYK <u>A</u> G
8	LukA CC45 W97 E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPG PDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDP YDKNVLLVK <u>M</u> QGSIHSLKFESHNETNASWLKYP SEYH <u>I</u> DFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVD <u>A</u> TFSY SLGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKSSISYNQQNYDTIASG KNNNRHVHWS <u>I</u> VANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNT RLSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFL <u>V</u> YISNE KTNDKTRFEVITYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNK DGQRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSQDNKPYK <u>A</u> G
9	LukA CC8 W97 W72 E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Thr246Val, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	HKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNTNKDKNSTAP DDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDP <u>T</u> C DKNVLLVK <u>M</u> QGSIHSLKFESHKEEKNSNWLKYPSE YH <u>I</u> DFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKV <u>C</u> A TFSYSS G <u>C</u> KFDSTK <u>C</u> IGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKN NNWHVHWS <u>I</u> IANDLKYGGEVKNRNDELFLFYRNTRI ATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFL <u>V</u> YLSNEKS NEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKKNKDGQ RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYK <u>A</u> G
10	LukA CC45 W97 W72 E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPG PDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDP <u>C</u> DKNVLLVK <u>M</u> QGSIHSLKFESHNETNASWLKYP SEYH <u>I</u> DFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKV <u>C</u> A TFSY SLG <u>C</u> KFDSTK <u>C</u> IGRTSSNSYSKSSISYNQQNYDTIASG KNNNRHVHWS <u>I</u> VANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNT RLSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFL <u>V</u> YISNE KTNDKTRFEVITYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNK DGQRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSQDNKPYK <u>A</u> G
11	LukA CC45 W94 E321A, Lys81Leu, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPG PDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDP YDKNVLLVK <u>L</u> QGSIHSLKFESHNETNASWLKYPS EYH <u>I</u> DFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVD <u>A</u> TFSYS LGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKSSISYNQQNYDTIASGK NNNRHVHWS <u>I</u> VANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTR LSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKT NDKTRFEVITYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDG QRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSQDNKPYK <u>A</u> G
12	LukA CC45 W96 E321A, Lys81Leu, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPG PDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDP YDKNVLLVK <u>L</u> QGSIHSLKFESHNETNASWLKYPS EYH <u>I</u> DFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVD <u>A</u> TFSYS LGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKSSISYNQQNYDTIASGK NNNRHVHWS <u>I</u> VANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTR LSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFL <u>V</u> YISNEKT NDKTRFEVITYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDG QRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSQDNKPYK <u>A</u> G
13	LukA и3 CC8	HKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNTNKDKNSTAP

	Glu320Ala	DDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPY DKNVLLVKKQGSIHNLKFESHKEEKNSNWLKYPSE YHVDFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSS GGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKN NNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRI ATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKS NEKTQFEVTYTRNQDILKNRPGIHYAPPPILEKNKDGQ RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKAG
14	LukA из CC45 Glu321Ala	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPG PDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPY YDKNVLLVKKQGSIHNLKFESHNETNASWLKYPSE EYHVDFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS LGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKISYNQQNYDTIASGK NNNRHVHWSVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTR LSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKT NDKTRFEVTYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDG QRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSQNKPYKAG
64	LukA CC8 delta 10	HKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNNDKDNSTAP DDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPY DKNVLLVKKQGSIHNLKFESHKEEKNSNWLKYPSE YHVDFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSS GGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKN NNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRI ATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKS NEKTQFEVTYTRNQDILKNRPGIHYAPPPILEKNKDGQ RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKY
65	LukA CC45 delta 10	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPG PDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPY YDKNVLLVKKQGSIHNLKFESHNETNASWLKYPSE EYHVDFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS LGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKISYNQQNYDTIASGK NNNRHVHWSVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTR LSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKT NDKTRFEVTYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDG QRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKY

Варианты лейкоцидина В (LukB) *S. aureus*

[0083] Другой аспект настоящего изобретения относится к вариантам полипептида, представляющего собой лейкоцидин В (LukB) *S. aureus*. Эти варианты полипептида LukB предусматривают одну или более вставок, замен и/или делеций аминокислотных остатков, которые обеспечивают улучшение стабильности LukB, тем самым способствуя стабильности анатоксина LukAB. Как описано в данном документе, эти варианты полипептида LukB являются идеальными кандидатами для применения в качестве антигенов в вакцине, которые можно вводить отдельно или в комбинации с лейкоцидином А (LukA) дикого типа или вариантом белка или полипептида. При

введении в комбинации с полипептидом дикого типа или вариантом полипептида LukA
 полученный анатоксин имитирует структуру токсина LukAB *S. aureus*, тем самым
 обеспечивая генерирование устойчивого иммунного ответа на один из наиболее
 эффективных токсинов *S. aureus*. В любом варианте осуществления вариант
 5 полипептида LukB представляет собой вариант полноразмерного белка LukB,
 содержащий все аминокислотные остатки, соответствующие полноразмерной
 последовательности зрелого белка LukB. В любом варианте осуществления вариант
 LukB содержит аминокислотную цепь эталонного белка, который меньше, чем
 полноразмерный зрелый белок LukB. В одном варианте осуществления длина варианта
 10 полипептида LukB составляет по меньшей мере 100 аминокислотных остатков. В
 любом варианте осуществления длина варианта полипептида LukB составляет по
 меньшей мере 110, по меньшей мере 120, по меньшей мере 130, по меньшей мере 140,
 по меньшей мере 150, по меньшей мере 160, по меньшей мере 170, по меньшей мере
 180, по меньшей мере 190, по меньшей мере 200, по меньшей мере 210, по меньшей
 15 мере 220, по меньшей мере 230, по меньшей мере 240, по меньшей мере 250, по
 меньшей мере 260, по меньшей мере 270, по меньшей мере 280, по меньшей мере 290,
 по меньшей мере 300 аминокислотных остатков.

[0084] Хотя иллюстративные варианты полипептида LukB, описанные в данном
 документе, представляют собой варианты LukB из клональных комплексов CC8 (SEQ
 20 ID NO: 15) и CC45 (SEQ ID NO: 16) (см. таблицу 2 ниже), специалист в данной области
 легко поймет, что аминокислотные замены и/или делеции в LukB,
 идентифицированные в контексте последовательностей SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO:
 16, представляют собой аминокислотные остатки, являющиеся консервативными в
 различных клональных комплексах или в областях LukB, которые являются
 25 высококонсервативными в различных клональных комплексах. Выравнивание
 последовательностей белка LukB из четырнадцати различных штаммов *S. aureus* (см.
 ФИГ. 2) показывает, что аминокислотные остатки, идентифицированные в данном
 документе как остатки, которые подлежат вариации, являются остатками, которые
 являются консервативными во всех 14 выровненных аминокислотных
 30 последовательностях LukB. Хотя положение идентифицированного остатка, который
 подлежит вариации, может отличаться между отдельными последовательностями
 LukB, выравнивание последовательности показывает соответствие между этими
 положениями. Для ясности — консенсусная последовательность LukB, содержащая
 аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, была создана с помощью

выравнивания последовательностей и использовалась для определения местоположения конкретных аминокислотных вариаций. Например, аминокислотная замена по остатку глутаминовой кислоты 109 в последовательности под SEQ ID NO: 39 соответствует остатку глутаминовой кислоты в положении 109 в последовательностях LukB под SEQ ID NO: 15, 42, 44 и 46—51, остатку глутаминовой кислоты в положении 110 в последовательностях LukB под SEQ ID NO: 16, 40, 43 и 45 и остатку глутаминовой кислоты в положении 60 в последовательности LukB под SEQ ID NO: 41. Таким образом, идентифицированные аминокислотные вариации, описанные в данном документе, могут быть универсально применены к соответствующим аминокислотным остаткам в любой аминокислотной последовательности LukB, известной сейчас или в будущем.

[0085] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB, раскрытый в данном документе, предусматривает аминокислотную замену или делецию по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Val53 в последовательности под SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления аминокислотная замена по Val53 предусматривает замену валина на лейцин (Val53Leu). В одном варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB предусматривает замену, соответствующую замене Val53Leu в последовательности под SEQ ID NO: 39.

[0086] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, характеризующийся наличием аминокислотной замены в положении аминокислоты, соответствующем положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, характеризующийся наличием аминокислотной замены валина на лейцин в положении, соответствующем положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления иллюстративная последовательность LukB из CC8, характеризующаяся наличием замены валина на лейцин в положении 53, предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 17.

[0087] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, характеризующийся наличием аминокислотной замены в положении аминокислоты, соответствующем положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, характеризующийся наличием аминокислотной замены валина на лейцин в положении, соответствующем положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 16. В одном варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB, предусматривающий замену, соответствующую замене Val53Leu в последовательности под SEQ ID NO: 39, предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 18.

[0088] Другие иллюстративные варианты полипептида LukB включают любой из белков LukB с последовательностями под SEQ ID NO: 40—51, которые предусматривают аминокислотную замену, соответствующую Val53Leu.

[0089] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB, описанный в данном документе, предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39. В одном варианте осуществления аминокислотная замена по одному или более вышеуказанным остаткам обеспечивает введение остатков цистеина, способных образовывать дисульфидную связь для стабилизации конформации гетеродимерной структуры LukAB. Например, в одном варианте осуществления вариант белка или полипептида LukB, описанный в данном документе, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Glu45 (Glu45Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39, и предусматривает замену треонина на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Thr121 (Thr121Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39. Эти остатки цистеина в положениях 45 и 121 образуют дисульфидную связь, за счет чего повышается термостабильность варианта LukB относительно LukB дикого типа или относительно других вариантов

белка и полипептида LukB, описанных в данном документе, которые не содержат спаренных остатков цистеина, способных образовывать дисульфидную связь.

[0090] В другом варианте осуществления вариант белка или полипептида LukB, описанный в данном документе, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Glu109 (Glu109Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39, и предусматривает замену аргинина на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Arg154 (Arg154Cys) в последовательности под SEQ ID NO:39. Эти остатки цистеина, введенные в положениях 109 и 154, образуют дисульфидную связь, за счет этого повышается термостабильность варианта LukB относительно LukB дикого типа или относительно других вариантов полипептида LukB, которые не содержат спаренных остатков цистеина, способных образовывать дисульфидные связи.

[0091] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина, как описано выше.

[0092] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, предусматривающий аминокислотную замену по любому одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина, как описано выше. В одном варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB, предусматривающий аминокислотные замены на цистеин по остаткам, соответствующим Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39, предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере

90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 21.

5 [0093] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, предусматривающий аминокислотную замену по любому одному из аминокислотных остатков, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155 в последовательности под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, 10 предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155 в последовательности под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина, как описано выше. В другом варианте 15 осуществления вариант полипептида LukB, предусматривающий аминокислотные замены на цистеин по остаткам, соответствующим Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155 в последовательности под SEQ ID NO: 39, предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством 20 последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 22.

[0094] Другие иллюстративные варианты полипептида LukB предусматривают любой из белков LukB с последовательностями под SEQ ID NO: 40—51, которые предусматривают описанные аминокислотные замены по остаткам, которые 25 соответствуют остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

[0095] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB, раскрытый в данном документе, предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует Val53 в последовательности SEQ ID NO: 39, в 30 комбинации с заменой аминокислотного остатка по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует

аминокислотным остаткам Val53, Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Val53Leu, Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB из CC8 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 19.

[0096] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Val53, Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155 в последовательности под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Val53Leu, Glu45Cys, Glu110Cys, Thr123Cys и Arg155Cys в последовательности под SEQ ID NO: 16. Иллюстративный вариант полипептида LukB из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из вышеупомянутых положений, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20.

[0097] Другие иллюстративные варианты полипептида LukB предусматривают любой из белков LukB с последовательностями под SEQ ID NO: 40—51, которые предусматривают описанную аминокислотную замену по остаткам, которые соответствуют Val53, Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

[0098] В таблице 2 ниже приведены иллюстративные варианты аминокислотных последовательностей LukB, раскрытых в данном документе.

Таблица 2. Иллюстративные аминокислотные последовательности полипептида LukB

SEQ NO	ID	Название	Описание
15		LukB CC8 WT	KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDS QKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTI GSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNV DDNNNTNVTDFAFKNQDESREVKYTYGY KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQ PSYRTLDDQSTSHKGVGWKVEAHLINMG HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLW AKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSH DKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRH GFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDW KTHNVKFVKVLNDNEKK
16		LukB CC45 WT	EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDT EKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTI GSGLKILNPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQN VDDNNNSTNVTDFAFKNQDESREVKYTY GYKTGGDFSINRGGLTGNITKEKNYSETIS YQQPSYRTLIDQPTTNKGVAWKVEAHSIN NMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNG NLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAV MSHDKNDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDW NKHGFWGYWSGENHVDQKEEKLSALYEV DWKTHDVKLIKTFNDKEKK
17		Val53Leu LukB из CC8	KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDS QKNITQSLQFNFLTEPNYDKET <u>L</u> FIKAKGTI GSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNV DDNNNTNVTDFAFKNQDESREVKYTYGY KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQ PSYRTLDDQSTSHKGVGWKVEAHLINMG HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLW AKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSH DKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRH GFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDW KTHNVKFVKVLNDNEKK
18		Val53Leu LukB из CC45	EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDT EKKISQSLQFNFLTEPNYDKET <u>L</u> FIKAKGTI GSGLKILNPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQN VDDNNNSTNVTDFAFKNQDESREVKYTY GYKTGGDFSINRGGLTGNITKEKNYSETIS YQQPSYRTLIDQPTTNKGVAWKVEAHSIN NMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNG NLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAV MSHDKNDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDW NKHGFWGYWSGENHVDQKEEKLSALYEV

		DWKTHDVKLIKTFNDKEKK
19	Val53Leu, Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys LukB из CC8	KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDS QKNITQSLQFNFLT <u>C</u> PNYDKET <u>L</u> FIKAKGTI GSGRLILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNV DDNNNTNVTDFA ¹ PKNQD <u>C</u> SREVKYTYGY K <u>C</u> GGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQ PSY <u>C</u> TLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINMG HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLW AKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSH DKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRH GFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDW KTHNVKFVKVLNDNEKK
20	Val53Leu, Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys LukB из CC45	EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDT EKKISQSLQFNFLT <u>C</u> PNYDKET <u>L</u> FIKAKGTI GSGRLILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQN VDDNNNSTNVTDFA ¹ PKNQD <u>C</u> SREVKYTY GYK <u>C</u> GGDFSINRGGLTGNITKEKNYSETIS YQQPSY <u>C</u> TLLDQPTTNKGVAWKVEAHSIN NMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNG NLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAV MSHDKNDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDW NKHGFWGYWSGENHVDQKEEKLSALYEV DWKTHDVKLIKTFNDKEKK
21	Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys LukB из CC8	KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDS QKNITQSLQFNFLT <u>C</u> PNYDKETVF ¹ IKAKGTI GSGRLILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNV DDNNNTNVTDFA ¹ PKNQD <u>C</u> SREVKYTYGY K <u>C</u> GGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQ PSY <u>C</u> TLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINMG HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLW AKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSH DKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRH GFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDW KTHNVKFVKVLNDNEKK
22	Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys LukB из CC45	EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDT EKKISQSLQFNFLT <u>C</u> PNYDKETVF ¹ IKAKGTI GSGRLILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQN VDDNNNSTNVTDFA ¹ PKNQD <u>C</u> SREVKYTY GYK <u>C</u> GGDFSINRGGLTGNITKEKNYSETIS YQQPSY <u>C</u> TLLDQPTTNKGVAWKVEAHSIN NMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNG NLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAV MSHDKNDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDW NKHGFWGYWSGENHVDQKEEKLSALYEV DWKTHDVKLIKTFNDKEKK

[0099] В соответствии со всеми аспектами настоящего изобретения в данном документе варианты полипептидов LukA и/или LukB, раскрытые в данном документе,

могут дополнительно содержать одну или более гетерологичных аминокислотных последовательностей. Подходящие гетерологичные аминокислотные последовательности включают без ограничения последовательности меток, иммуногены, сигнальные последовательности и т. д. Подходящие последовательности меток включают без ограничения полигистидиновую метку, полиаргининовую метку, FLAG-метку, Step-метку II, убиквитиновую метку, NusA-метку, хитинсвязывающий домен, кальмодулинсвязывающий пептид, целлюлозосвязывающий домен, Hat-метку, S-метку, SBP, мальтозосвязывающий белок, глутатион-S-трансферазу (см. работу Terpe K., «Overview of Tag Protein Fusions: From Molecular and Biochemical Fundamentals to Commercial Systems», *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:523-33 (2003), которая включена в данный документ посредством ссылки). Подходящие иммуногены включают без ограничения Т-клеточный эпитоп, В-клеточный эпитоп. Подходящие сигнальные последовательности включают без ограничения сигнальную последовательность PelB, сигнальную последовательность Sec, сигнальную последовательность Tat, сигнальную последовательность AmyE (см. работу Freudl R., «Signal Peptides for Recombinant Protein Secretion in Bacterial Expression Systems», *Microbial Cell Factories* 17:52 (2018), которая включена в данный документ посредством ссылки). В любом варианте осуществления варианты полипептидов LukA и/или LukB, описанные в данном документе, содержат последовательность PelB (MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA; SEQ ID NO: 23). В любом варианте осуществления варианты полипептидов LukA и/или LukB, описанные в данном документе, содержат His-метку (например, NSANNHHHGS; SEQ ID NO: 24). В любом варианте осуществления варианты полипептидов LukA и/или LukB, описанные в данном документе, содержат как вышеупомянутую последовательность PelB, так и His-метку.

25 **Варианты полинуклеотидов LukA и LukB и конструкции на их основе**

[00100] Другой аспект настоящего изобретения относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим варианты полипептидов LukA и LukB, описанные в данном документе. Молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в данном документе, предусматривают выделенные полинуклеотиды, рекомбинантные полинуклеотидные последовательности, части векторов экспрессии или части линейных последовательностей ДНК или РНК, включая линейные последовательности ДНК или РНК, используемые для транскрипции/трансляции *in vitro* или *in vivo*, и векторы, совместимые с экспрессией и секрецией прокариотическими и эукариотическими клетками вариантов полипептидов LukA и LukB, описанных в данном документе. В

любом варианте осуществления полинуклеотиды LukA и LukB, описанные в данном документе, предусматривают ДНК. В любом варианте осуществления полинуклеотиды LukA и LukB, описанные в данном документе, предусматривают РНК, в частности мРНК.

5 **[00101]** Полинуклеотиды по данному изобретению могут быть получены с помощью химического синтеза, такого как твердофазный синтез полинуклеотидов на автоматическом синтезаторе полинуклеотидов, и собраны в полные одониточные или двухниточные молекулы. Альтернативно полинуклеотиды по данному изобретению могут быть получены с помощью других методов, таких как ПЦР, с последующим
10 рутинным клонированием. Методики продуцирования или получения полинуклеотидов заданной последовательности хорошо известны из уровня техники.

[00102] В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий замену лизина на метионин по остатку, который соответствует лизину в положении 83 (Lys83Met) в
15 последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий замену серина на аланин по остатку, который соответствует серину в положении 141 (Ser141Ala) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует
20 вариант полипептида LukA, предусматривающий замену валина на изолейцин по остатку, который соответствует валину в положении 113 (Val113Ile) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий замену валина на изолейцин по остатку, который соответствует
25 валину в положении 193 (Val193Ile) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотные замены лизина на метионин, серина на аланин и валина на изолейцин в остатках, соответствующих вышеупомянутым аминокислотным остаткам, *т. е.* Lys803Met, Ser141Ala, Val113Ile и
30 Val193Ile в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, дополнительно предусматривающий аминокислотную замену, которая соответствует Glu323Ala, *т. е.* полинуклеотид кодирует вариант LukA, предусматривающий замены,

которые соответствуют заменам Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[00103] В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA из CC8, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 1, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile и Glu320Ala в последовательности под SEQ ID NO: 1. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая LukA из CC8, представлена в данном документе под SEQ ID NO: 52. Соответственно, в любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вариант под SEQ ID NO: 52, где указанный вариант предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 52.

[00104] В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант Luk8 из CC8, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 3 (Glu320Ala, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile LukA из CC8) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 54. В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 54.

[00105] В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA из CC45, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 2, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile и Glu321Ala в

последовательности под SEQ ID NO: 2. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая LukA из CC45, представлена в данном документе под SEQ ID NO: 53. Соответственно, в любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вариант под SEQ ID NO: 53, где указанный вариант предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 53.

[00106] В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA из CC45 под SEQ ID NO: 4 (Glu321Ala, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile LukA из CC45) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC45, предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 55. В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 55.

[00107] В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий наличие аминокислотной замены по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В одном варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий замену тирозина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Tyr74 (Tyr74Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25, и предусматривающий замену аспарагина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Asp140 (Asp140Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий замену глицина на цистеин по

аминокислотному остатку, который соответствует Gly149 (Gly149Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25, и предусматривающий замену глицина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Gly156 (Gly156Cys) из SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления аминокислотная замена по каждому из этих аминокислотных остатков представляет собой остаток цистеина, как описано выше.

[00108] В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323, в комбинации с аминокислотной заменой по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотные замены по аминокислотным остаткам, которые соответствуют остаткам Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323 и остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[00109] В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA из CC8, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 1, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют каждой из Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Glu320Ala, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys и Gly153Cys в последовательности под SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA в последовательности под SEQ ID NO: 5 (Glu320Ala, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys LukA из CC8) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере

97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5.

[00110] В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA из CC45, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 2, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют каждой из Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Glu321Ala, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys и Gly154Cys в последовательности под SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 6 (Glu321Ala, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys LukA из CC45) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6.

[00111] В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную замену или делецию по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант LukA, предусматривающий замену треонина на валин по этому остатку, который соответствует положению 249 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную замену в положении, соответствующем Thr249, в комбинации с любой или всеми аминокислотными заменами по остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323, Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[00112] В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA из CC8, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 1, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют каждой из Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Glu320Ala и Thr246Val в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления

иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 7 (Glu320Ala, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile и Thr246Val LukA из CC8) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 7. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA из CC8 под SEQ ID NO: 9, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют Glu320Ala, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Thr246Val, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys и Gly153Cys. Иллюстративные молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению охватывают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 9, содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 56. В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 56.

[00113] В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA из CC45, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 2, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют каждой из Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Glu321Ala и Thr247Val в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 8 (Glu321Ala, Lys81Met, Ser139Ala,

Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val LukA из CC45) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 10, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют Glu321Ala, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys и Gly154Cys. Иллюстративные молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению охватывают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:10. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 10, содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 57. В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 57.

[00114] Другой аспект данного изобретения относится к полинуклеотидам, кодирующим вариант полипептида LukB, описанный в данном документе. В одном варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида LukB, предусматривающий аминокислотную замену или делецию по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Val53 в последовательности под SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления аминокислотная замена по Val53 предусматривает замену валина на лейцин (Val53Leu). В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukB из CC8, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 15, предусматривающий аминокислотную замену в положении 53 в последовательности под SEQ ID NO: 15. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая LukB из CC8,

представлена в данном документе под SEQ ID NO: 58. Соответственно, в любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вариант под SEQ ID NO: 58, где указанный вариант предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по 5 меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 58.

10 [00115] В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukB под SEQ ID NO: 17 (LukB CC8 V53L) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 17. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukB CC8 15 V53L, предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 60. В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную 20 последовательность под SEQ ID NO: 60.

[00116] В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukB из CC45, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 16, предусматривающий аминокислотную замену в 25 положении 53 в последовательности под SEQ ID NO: 16. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая LukB из CC45, представлена в данном документе под SEQ ID NO: 59. Соответственно, в любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вариант под SEQ ID NO: 59, где указанный вариант предусматривает нуклеотидную последовательность, 30 характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 59.

[00117] В другом варианте осуществления иллюстративный полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukB под SEQ ID NO: 18

(LukB CC45 V53L) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 18. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukB CC45 V53L, предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 61. В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC45, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 61.

[00118] В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukB, предусматривающий наличие аминокислотной замены по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39. В одном варианте осуществления аминокислотная замена по одному или более вышеуказанным остаткам обеспечивает введение одного или более остатков цистеина, способных образовывать дисульфидную связь для стабилизации конформации гетеродимерной структуры LukAB. В одном варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида LukB, предусматривающий замену глутаминовой кислоты на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Glu45 (Glu45Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39, и предусматривающий замену треонина на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Thr121 (Thr121Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида LukB, предусматривающий замену глутаминовой кислоты на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Glu109 (Glu109Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39, и замену аргинина на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Arg154 (Arg154Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39.

[00119] В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukB, предусматривающий аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под

SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина, как описано выше.

[00120] В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukB из CC8, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 15, который предусматривает аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, соответствующему аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В одном варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида LukB, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21 (Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys LukB из CC8) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 21. В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukB из CC45, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 16, который предусматривает аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, соответствующему аминокислотным остаткам Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155 в последовательности под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида LukB, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22 (Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys LukB из CC45) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 22.

[00121] В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukB, предусматривающий аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует Val53 в последовательности SEQ ID NO: 39, в комбинации с заменой аминокислотного остатка по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39. В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой

молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukB из CC8, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 15, который предусматривает аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, соответствующему аминокислотным остаткам Val53, Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида LukB, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19 (Val53Leu, Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys LukB из CC8) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 19. В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukB из CC45, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 16, который предусматривает аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, соответствующему аминокислотным остаткам Val53, Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155 в последовательности под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида LukB, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20 (Val53Leu, Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys LukB из CC45) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20.

[00122] В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность LukA и последовательность LukB, раскрытые в данном документе. В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой полинуклеотид, кодирующий последовательность LukA из CC45 (которая является вариантом или не является вариантом) и последовательность LukB из CC45 (которая является вариантом или не является вариантом). Например, полинуклеотид, кодирующий вариант последовательности LukA из CC45, раскрытый в данном документе, и последовательность LukB из CC45, которая не является вариантом, или полинуклеотид,

кодирующий последовательность LukA из CC45, которая не является вариантом, и вариант последовательности LukB из CC45, раскрытый в данном документе.

5 [00123] В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой полинуклеотид, кодирующий последовательность LukA из CC8 (которая является вариантом или не является вариантом) и последовательность LukB из CC8 (которая является вариантом или не является вариантом). Например, полинуклеотид, кодирующий вариант последовательности LukA из CC8, раскрытый в данном документе, и последовательность LukB из CC8, которая не является вариантом, или полинуклеотид, 10 кодирующий последовательность LukA из CC8, которая не является вариантом, и вариант последовательности LukB из CC8, раскрытый в данном документе.

15 [00124] В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой полинуклеотид, кодирующий последовательность LukA из CC45 (которая является вариантом или не является вариантом) и последовательность LukB из CC8 (которая является вариантом или не является вариантом). Например, полинуклеотид, кодирующий вариант последовательности LukA из CC45, раскрытый в данном документе, и последовательность LukB из CC8, которая не является вариантом, или полинуклеотид, кодирующий последовательность LukA из CC45, которая не является вариантом, и 20 вариант последовательности LukB из CC8, раскрытый в данном документе.

25 [00125] В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой кодирующую последовательность LukA из CC8 (которая является вариантом или не является вариантом) и последовательность LukB из CC45 (которая является вариантом или не является вариантом). Например, полинуклеотид, кодирующий вариант последовательности LukA из CC8, раскрытый в данном документе, и последовательность LukB из CC45, которая не является вариантом, или полинуклеотид, кодирующий последовательность LukA из CC8, которая не является вариантом, и вариант последовательности LukB из CC45, раскрытый в данном документе.

30 [00126] В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, кодирующий вариант последовательности LukA и последовательность LukB дикого типа. Например, полинуклеотид, кодирующий вариант последовательности LukA, выбранный из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,

12, 13 или 14, в комбинации с последовательностью LukB дикого типа (*т. е.* не являющейся вариантом) под SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

[00127] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, кодирующий последовательность LukA дикого типа или вариант последовательности LukB. Например, полинуклеотид, кодирующий последовательность LukA дикого типа под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 в комбинации с вариантом последовательности LukB, выбранным из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 или 22.

[00128] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, кодирующий вариант последовательности LukA и вариант последовательности LukB. Например, полинуклеотид, кодирующий вариант последовательности LukA, выбранный из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14, в комбинации с вариантом последовательности LukB, выбранным из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 или 22.

[00129] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 3 и последовательность LukB, которая не является вариантом, под SEQ ID NO: 15 или 16, вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 17 или 18, вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 19 или 20 или вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 21 или 22. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 4 и последовательность LukB, которая не является вариантом, под SEQ ID NO: 15 или 16, вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 17 или 18, вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 19 или 20 или вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 21 или 22. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 5 и последовательность LukB, которая не является вариантом, под SEQ ID NO: 15 или 16, вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 17 или 18, вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 19 или 20 или вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 21 или 22. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему

[illegible]

последовательность LukB, которая не является вариантом, под SEQ ID NO: 15 или 16, вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 17 или 18, вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 19 или 20 или вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 21 или 22. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 13 и вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 17 или 18, вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 19 или 20 или вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 21 или 22. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 14 и вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 17 или 18, вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 19 или 20 или вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 21 или 22.

[00130] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 17 и последовательность LukA, которая не является вариантом, под SEQ ID NO: 1 или 2, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 3 или 4, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 5 или 6, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 7 или 8, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 9 или 10, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 11 или 12 или вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 13 или 14. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 18 и последовательность LukA, которая не является вариантом, под SEQ ID NO: 1 или 2, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 3 или 4, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 5 или 6, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 7 или 8, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 9 или 10, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 11 или 12 или вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 13 или 14. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 19 и последовательность LukA, которая не является вариантом, под SEQ ID NO: 1 или 2, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 3 или 4, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 5 или 6, вариант последовательности LukA

под SEQ ID NO: 7 или 8, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 9 или 10, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 11 или 12 или вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 13 или 14. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 20 и последовательность LukA, которая не является вариантом, под SEQ ID NO: 1 или 2, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 3 или 4, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 5 или 6, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 7 или 8, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 9 или 10, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 11 или 12 или вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 13 или 14. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 21 и последовательность LukA, которая не является вариантом, под SEQ ID NO: 1 или 2, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 3 или 4, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 5 или 6, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 7 или 8, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 9 или 10, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 11 или 12 или вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 13 или 14. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukB под SEQ ID NO: 22 и последовательность LukA, которая не является вариантом, под SEQ ID NO: 1 или 2, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 3 или 4, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 5 или 6, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 7 или 8, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 9 или 10, вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 11 или 12 или вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 13 или 14.

[00131] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA из CC45 под SEQ ID NO: 4 и последовательность LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB (RARPR-15), содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99%

[00132] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA из CC45 под SEQ ID NO: 4 и вариант последовательности LukB из CC45 под SEQ ID NO: 18. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB (RARPR-30), содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 55 (вариант LukA из CC45), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 61 (вариант LukB из CC45). Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 55, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 61.

[00133] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA из CC8 под SEQ ID NO: 3 и последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB (RARPR-32), содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 54 (вариант LukA из CC8), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей

мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 58 (LukB из CC8). Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 54, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 58.

[00134] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA из CC8 под SEQ ID NO: 3 и вариант последовательности LukB из CC45 под SEQ ID NO: 18. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB (RARPR-33), содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 54 (вариант LukA из CC8), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 61 (вариант LukB из CC45). Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 54, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 61.

[00135] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA из CC8 под SEQ ID NO: 3 и вариант последовательности LukB из CC8 под SEQ ID NO: 17. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB (RARPR-34), содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 54 (вариант LukA из CC8), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 60 (вариант LukB из CC8). Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты,

кодирующая этот гетеродимер LukAB, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 54, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 60.

5 [00136] Иллюстративные последовательности молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представлены в таблице 3 ниже.

Таблица 3. Иллюстративные полинуклеотидные последовательности LukA и LukB

Название конструкции	SEQ ID NO:	Последовательность ДНК
CC8 LukA ^{wt}	52	GCT CAC AAA GAT TCT CAG GAT CAA AAT AAG AAG GAG CAC GTC GAC AAG TCT CAG CAG AAA GAC AAG CGT AAT GTT ACA AAC AAG GAC AAA AAC AGC ACT GCT CCA GAC GAC ATT GGA AAA AAC GGT AAG ATT ACT AAA CGC ACC GAA ACG GTA TAT GAC GAA AAA ACG AAC ATT TTG CAA AAC TTG CAG TTC GAT TTC ATT GAC GAC CCC ACT TAT GAC AAG AAT GTC CTT CTG GTG AAG AAG CAG GGC AGC ATT CAC TCA AAC TTG AAA TTT GAG TCT CAC AAG GAG GAG AAG AAC TCC AAT TGG CTG AAA TAC CCA TCA GAG TAC CAC GTT GAT TTT CAA GTG AAA CGT AAC CGC AAA ACG GAA ATT TTG GAC CAA TTG CCG AAA AAC AAG ATC TCC ACC GCG AAA GTA GAC TCA ACA TTC AGT TAC TCT TCC GGC GGA AAG TTC GAC AGC ACT AAG GGG ATC GGG CGC ACT TCT TCC AAT TCG TAC TCG AAA ACG ATT TCT TAC AAT CAG CAG AAT TAT GAC ACT ATC GCA TCT GGT AAA AAT AAT AAC TGG CAC GTG CAT TGG TCG GTG ATT GCT AAT GAT TTA AAG TAT GGA GGT GAG GTA AAA AAT CGT AAT GAC GAG CTG CTG TTT TAC CGT AAC ACT CGC ATC GCA ACC GTT GAA AAC CCG GAA TTG TCC TTT GCC TCG AAA TAC CGC TAC CCT GCA TTA GTT CGT TCA GGC TTT AAT CCC GAG TTT TTG ACT TAT CTT TCC AAT GAA AAA TCG AAC GAG AAG ACT CAG TTC GAG GTT ACG TAC ACC CGC AAT CAG GAC ATT TTG AAG AAC CGT CCG GGA ATT CAC TAT GCG CCT CCC ATC TTA GAG AAG AAT AAG GAT GGA CAA CGT TTG ATC GTT ACA TAT GAA GTT GAC TGG AAA AAT AAG ACC GTA AAG GTT GTG GAT AAG TAT TCG GAT GAT AAT AAG CCC TAT AAA GAA GGG
CC45 LukA ^{wt}	53	GCG AAC AAA GAT TCT CAG GAC CAG ACC AAA AAG GAG CAC GTA GAC AAG GCC CAG CAA AAA GAG AAG CGT AAT GTG AAC GAC AAA GAT AAG AAT ACT CCG GGG CCA GAT GAT ATC GGC AAG AAC GGT AAA GTC ACG AAG CGT ACA GTG TCT GAG TAT GAC AAA GAA ACA AAC ATC CTG CAG AAC TTA CAA TTC GAC TTT ATT GAT GAT CCA ACT TAC GAT AAG AAT GTG TTG CTG GTT AAG AAA CAA GGT TCA ATC CAT TCT AAC TTG AAG TTC GAG TCA CAC CGT AAC GAA ACG AAC GCG TCG

		TGG TTG AAA TAT CCG TCA GAG TAT CAT GTT GAT TTT CAA GTA CAA CGT AAT CCC AAA ACG GAA ATT TTG GAC CAA TTA CCT AAA AAT AAG ATT AGC ACC GCC AAG GTT GAC TCA ACT TTC TCC TAC TCA TTA GGA GGA AAG TTC GAT TCG ACA AAA GGG ATC GGG CGT ACA TCT TCG AAT AGC TAC AGT AAG AGC ATT AGC TAT AAC CAG CAG AAC TAT GAT ACG ATT GCT TCA GGG AAA AAT AAC AAC CGT CAC GTA CAT TGG TCA GTG GTT GCG AAC GAT CTT AAA TAT GGA AAC GAG ATT AAG AAT CGT AAC GAC GAA TTT TTG TTT TAC CGC AAT ACA CGC CTT AGT ACC GTG GAA AAT CCC GAG CTG TCC TTC GCG TCG AAG TAT CGC TAT CCG GCC CTT GTG CGT TCG GGT TTC AAT CCC GAG TTC TTA ACA TAT ATT TCC AAT GAG AAA ACT AAC GAC AAG ACT CGC TTC GAA GTC ACC TAC ACT CGC AAC CAG GAC ATT CTG AAA AAC AAG CCT GGA ATT CAT TAC GGG CAA CCA ATT TTA GAG CAG AAT AAG GAT GGA CAG CGC TTT ATT GTG GTA TAT GAG GTG GAC TGG AAG AAT AAG ACA GTA AAA GTT GTG GAA AAG TAC TCT GAC CAG AAT AAG CCC TAT AAA GAA GGA
CC8 LukAΔ10C	62	GCT CAC AAA GAT TCT CAG GAT CAA AAT AAG AAG GAG CAC GTC GAC AAG TCT CAG CAG AAA GAC AAG CGT AAT GTT ACA AAC AAG GAC AAA AAC AGC ACT GCT CCA GAC GAC ATT GGA AAA AAC GGT AAG ATT ACT AAA CGC ACC GAA ACG GTA TAT GAC GAA AAA ACG AAC ATT TTG CAA AAC TTG CAG TTC GAT TTC ATT GAC GAC CCC ACT TAT GAC AAG AAT GTC CTT CTG GTG AAG AAG CAG GGC AGC ATT CAC TCA AAC TTG AAA TTT GAG TCT CAC AAG GAG GAG AAG AAC TCC AAT TGG CTG AAA TAC CCA TCA GAG TAC CAC GTT GAT TTT CAA GTG AAA CGT AAC CGC AAA ACG GAA ATT TTG GAC CAA TTG CCG AAA AAC AAG ATC TCC ACC GCG AAA GTA GAC TCA ACA TTC AGT TAC TCT TCC GGC GGA AAG TTC GAC AGC ACT AAG GGG ATC GGG CGC ACT TCT TCC AAT TCG TAC TCG AAA ACG ATT TCT TAC AAT CAG CAG AAT TAT GAC ACT ATC GCA TCT GGT AAA AAT AAT AAC TGG CAC GTG CAT TGG TCG GTG ATT GCT AAT GAT TTA AAG TAT GGA GGT GAG GTA AAA AAT CGT AAT GAC GAG CTG CTG TTT TAC CGT AAC ACT CGC ATC GCA ACC GTT GAA AAC CCG GAA TTG TCC TTT GCC TCG AAA TAC CGC TAC CCT GCA TTA GTT CGT TCA GGC TTT AAT CCC GAG TTT TTG ACT TAT CTT TCC AAT GAA AAA TCG AAC GAG AAG ACT CAG TTC GAG GTT ACG TAC ACC CGC AAT CAG GAC ATT TTG AAG AAC CGT CCG GGA ATT CAC TAT GCG CCT CCC ATC TTA GAG AAG AAT AAG GAT GGA CAA CGT TTG ATC GTT ACA TAT GAA GTT GAC TGG AAA AAT AAG ACC GTA AAG GTT GTG GAT AAG TAT
CC45 LukAΔ10C	63	GCAAATAAAGACTCTCAAGATCAGACTAAAAAGGAACAT GTTGATAAGGCGCAACAAAAAGAAAAGCGTAATGTCAAT

			GATAAGGACAAGAATACTCCGGGACCCGACGACATTGGC AAGAACGGAAAGGTGACAAAGCGTACCGTTAGTGAGTAC GACAAGGAAACAAATATCCTGCAGAACTTACAGTTCGAT TTTATTGACGATCCTACCTATGACAAGAATGTCCTGTTGG TGAAGAAACAGGGCAGCATTTCATTCCAATTTAAATTTG AAAGCCATCGTAACGAAACAAATGCATCTTGGCTTAAAT ACCCTTCTGAGTACCACGTAGATTTTCAGGTACAACGCAA CCCAAAAACCGAAATTCTGGATCAACTGCCCAAGAATAA AATTTCTACGGCTAAAGTTGACAGTACATTTAGCTACAGT TTAGGGGGAAAGTTTGATAGTACAAAAGGAATTGGTCGT ACTTCCAGTAACTCCTATTCGAAATCTATTTCTATAATC AACAGAATTACGACACCATCGCATCCGGTAAAAACAATA ATCGCCACGTACATTGGAGTGTGTGTCGGAATGACTTAAA GTACGGTAACGAAATCAAGAACCGCAACGACGAATTCTT ATTCTATCGTAACACGCGTTTAAGCACCGTCGAGAACCCC GAGTTATCCTTTGCTAGCAAATATCGCTATCCTGCGTTAG TACGCTCAGGGTTCAATCCTGAGTTCTTAACCTACATCTC CAACGAGAAAATAATGATAAGACACGCTTCGAGGTGAC CTACACCCGTAATCAGGATATCCTTAAAAATAAACCGGG TATTCATTACGGGCAACCCATTTTAGAACAGAATAAGGA CGGCCAACGTTTTATCGTGGTCTATGAGGTTGATTGGAAG AACAAAGACAGTGAAAGTGGTTGAAAAGTAT
CC8 W95	LukA	54	CATAAAGATTTCGCAGGATCAAAATAAGAAGGAGCATGTT GACAAGAGCCAGCAGAAAGACAAGCGCAATGTTACAAA CAAAGATAAGAACTCTACAGCGCCCGATGACATTGGTAA GAACGGCAAGATAACTAAGCGGACGGAAACCGTGTATGA CGAGAAAATAACATTCTGCAAAATTTGCAATTTGACTTT ATCGACGATCCAACCTATGACAAGAATGTCTTGCTTGTC AAATGCAAGGTTTCGATTTCATTCAAACCTTAAATTTGAATC CCACAAAGAGGAGAAAAACTCTAATTGGTTAAAGTATCC TTCAGAATATCACATAGATTTCAGGTAAAGAGAAACCG TAAACGGAGATACTGGATCAACTGCCTAAAAACAAGAT CTCGACAGCTAAGGTGGACGCTACGTTCTCGTACTCGTCT GGTGGGAAGTTCGACTCGACCAAGGCATTGGGCGTACA TCATCAAATAGCTATTCAAAGACTATTAGCTATAATCAGC AGAACTATGATACGATAGCTTCGGGTAAGAATAACAACT GGCACGTTTCATTGGTCGATCATTGCAAATGACTTGAAGTA TGGCGGAGAGGTAAAGAATCGCAACGATGAGCTGTTATT CTATCGCAATACGAGAATTGCGACTGTAGAGAACCCGGA ATTGTCTTTTGCCTCCAAATATCGGTACCCGGCATTGGTA CGCTCTGGTTTCAATCCTGAGTTTTTAACTTACCTTTCCAA CGAAAAGAGTAATGAGAAGACCCAATTTGAGGTTACCTA CACCCGTAACCAGGATATTTTGAAGAATCGGCCGGGCAT CCATTATGCCCCACCAATCCTGGAGAAAAATAAAGACGG TCAGCGGCTTATTGTGACTTACGAGGTGATTGGAAAAAT AAGACGGTCAAGGTAGTGGACAAATATTCTGATGACAAT AAACCGTACAAAGCTGGC
CC45 W95	LukA	55	GCTAATAAGGACTCCCAGGACCAGACAAAGAAGGAACA CGTCGACAAAGCCCAGCAAAAAGAAAAACGCAACGTAA ACGATAAGGACAAGAACACCCCAGGACCCGATGATATTG

		GGAAGAACGGTAAAGTCACAAAACGCACAGTGAGCGAG TACGATAAAGAAACAAATATCCTGCAAAATCTGCAATTT GACTTCATCGATGACCCTACCTATGATAAGAATGTGTTGT TGGTTAAGATGCAGGGAAGTATTCATTCCAACCTGAAATT CGAGAGCCACCGTAACGAAACGAATGCGAGTTGGTTAAA GTACCCCTTCAGAATACCACATTGATTTTCAGGTGCAGCGT AACCCGAAAACCGAAATCTTAGACCAGCTGCCTAAAAAC AAGATTTCTACGGCCAAGGTGGACGCAACTTTTCAGTTATA GTCTTGGAGGAAAGTTCGACAGTACCAAAGGTATCGGCC GCACATCCTCAAACAGCTATTTCGAAATCCATTTCTTACAA CCAGCAAAATTATGACACGATCGCCTCAGGTAAGAACAA CAATCGTCATGTGCATTGGAGCATCGTGGCTAACGATTTG AAATATGGTAACGAAATCAAAAATCGCAATGACGAGTTC TTGTTTTACCGCAATACTCGCCTTTCTACGGTAGAGAATC CTGAGCTTAGCTTTGCGAGCAAGTATCGTTACCCTGCTCT TGTACGTTTCGGGTTTCAACCCAGAGTTCCTTACTTATATC TCCAATGAGAAGACGAACGATAAAACCCGTTTTGAAGTT ACATACACGCGTAATCAGGACATCTTAAAGAATAAACCG GGGATTCATTATGGGCAGCCGATCTTAGAGCAAAATAAG GATGGACAGCGTTTCATTGTAGTGTATGAGGTTGACTGGA AGAACAAGACGGTAAAAGTAGTTGAAAAGTATTCCGACC AAAACAAGCCTTATAAGGCGGGT
CC8 LukA W97 W92	56	CACAAAGACAGCCAGGATCAAAACAAGAAAGAGCACGT GGACAAGAGCCAGCAAAAAGGATAAACGTAACGTTACCA ACAAGGACAAAAACAGCACCGCGCCGGACGATATCGGC AAGAACGGCAAAATTACCAAGCGTACCGAGACCGTGTAC GATGAAAAAACCAACATCCTGCAGAACCTGCAATTTCGAC TTTATTGACGATCCGACCTGCGATAAAAACGTGCTGCTGG TTAAGATGCAGGGCAGCATCCACAGCAACCTGAAATTTCG AAAGCCACAAAGAGGAAAAGAACAGCAACTGGCTGAAG TACCCGAGCGAGTATCACATTGACTTTCAGGTGAAACGT AACCGTAAGACCGAAATCCTGGATCAACTGCCGAAGAAC AAAATTAGCACCGCGAAGGTTTGC GCGACCTTCAGCTAC AGCAGCGGTTGCAAATTTGACAGCACCAAGTGCATCGGC CGTACCAGCAGCAACAGCTATAGCAAAACCATCAGCTAC AACCAGCAAACTATGATACCATTGCGAGCGGCAAGAAC AACAACTGGCACGTGCACTGGAGCATCATTGCGAACGAC CTGAAATACGGTGGCGAGGTTAAGAACCGTAACGATGAA CTGCTGTTCTATCGTAACACCCGTATCGCGACCGTGGAGA ACCCGGAACCTGAGCTTTGCGAGCAAATAACCGTTATCCGG CGCTGGTGC GTAGCGGTTTCAACCCGGAGTTTCTGGTTTA CCTGAGCAACGAGAAAAGCAACGAAAAGACCCAGTTTCG AAGTTACCTACACCCGTAACCAAGACATCCTGAAGAACC GTCCGGGTATCCACTATGCTCCGCCGATTCTGGAGAAGA ACAAAGATGGCCAACGTCTGATTGTGACCTATGAAGTTG ACTGGAAGAACAAAACCGTTAAAGTGGTTGATAAGTACA GCGACGATAACAAACCGTATAAGGCGGGT
CC45 LukA W97 W92	57	GCAAACAAAGACTCACAAGATCAGACAAAGAAAGAGCA TG TAGACAAAGCTCAACAGAAGGAAAAGCGCAATGTGA ACGACAAGGATAAAAATACTCCTGGTCCAGATGACATTG

		GTAAGAATGGTAAAGTTACTAAGCGGACCGTCTCTGAAT ATGATAAGGAGACAAATATTCTCCAGAATTTGCAATTGCT ATTTTCATTGATGATCCGACGTGCGATAAGAACGTATTGCT CGTTAAAATGCAGGGCTCCATCCATTCGAATCTCAAGTTC GAATCCCATCGCAACGAGACAAACGCTTCCCTGGCTCAA TATCCTAGCGAGTATCATATCGACTTCCAAGTTCAACGGA ACCCTAAAACTGAAATCCTTGATCAACTCCCTAAGAACA AAATCTCAACTGCCAAGGTCTGTGCCACATTTTCTTATTC TCTTGGCTGCAAATTCGATTCAACAAAGTGTATTGGTCGT ACATCAAGTAATAGCTATAGTAAAAGCATCAGTTATAAC CAGCAAACTATGATACAATCGCGTCAGGCAAAAACAAT AATCGTCATGTCCATTGGTCCATTGTGCGGAACGACCTTA AGTACGGTAACGAAATTAAGAATCGGAACGATGAGTTTT TGTTCTATCGCAACACCCGTCTGTCTACTGTGAAAACCC GGAGTTGTCCTTCGCAAGTAAATATCGCTATCCTGCTTTG GTACGTTCTGGGTTTAACCCGGAATTTCTCGTCTACATCA GCAACGAGAAAACAAATGACAAAACGCGCTTTGAAGTCA CGTACACACGTAATCAGGACATCTTAAAAAATAAACCAG GGATTCACTATGGTCAGCCAATCTTGAGCAGAATAAAG ACGGCCAGCGTTTCATTGTGCTTTATGAAGTGGACTGGAA AAACAAAACGTGTTAAGGTGGTTGAGAAATATTCCGACCA AAACAAACCGTATAAGGCCGGT
CC8 LukB ^{wt}	58	AAAATCAATTCTGAAATTAAGCAAGTGTCCGAAAAAAT TTGGATGGAGACACGAAGATGTATACGCGTACTGCTACG ACGTCAGACTCCCAGAAGAACATTACACAGAGTCTGCAA TTTAATTTTCTGACAGAACCAAACTATGACAAGGAACT GTCTTTATTAAGGCTAAAGGGACTATCGGAAGCGGCTTA CGCATTTTAGACCCCAACGGTTATTGGAATAGCACGCTGC GCTGGCCGGGCAGTTACTCAGTATCAATCCAAAATGTGCG ATGATAACAATAACACCAATGTTACCGATTTTCGCCCCCA GAACCAGGATGAATCGCGCGAGGTAAATACACATACGG CTACAAGACAGGCGGTGACTTTAGCATCAACCGTGGGGG CTTGACAGGGAATATTACTAAGGAATCAAATTATAGTGA GACTATCTCTTATCAACAACCGTCCTATCGTACCTTATTA GACCAGAGTACCTCCCACAAAGGTGTAGGGTGGAAAGTT GAAGCGCACCTGATTAATAATATGGGTCACGATCACACA CGCCAACTGACCAACGACAGTGACAACCGCACAAAAAGT GAAATTTTGTAGTCTTACCCGTAACGGAAATCTGTGGGCCA AAGACAATTTTACACCGAAAGATAAGATGCCGGTCACTG TATCTGAGGGGTTCAATCCCGAGTTTTTAGCAGTAATGTC GCATGACAAAAAGGACAAAGGGAAATCCCAGTTTGTGT CCACTATAAGCGTAGCATGGATGAATTCAAAATCGACTG GAACCGTCACGGTTTCTGGGGTACTGGTCAGGTGAGAA CCACGTAGACAAGAAAGAGGAGAACTGAGCGCATTATA TGAGGTTGATTGGAAAACGCACAATGTGAAATTTGTTAA AGTCCTGAATGACAACGAGAAAAAG
CC45 LukB ^{wt}	59	GAAATTAAGTCTAAGATCACACAGTATCGGAGAAAAAC CTGGATGGCGATACTAAGATGTATACACGCACCGCCACT ACTTCGGACACGGAGAAGAAGATCTCACAAATCGTTACAG TTTAATTTTCTTACAGAACCGAACTACGACAAAGAGACC

		GTCTTCATTAAAGCTAAAGGTACGATTGGTTCGGGATTAA AAATTCTGAATCCGAATGGCTATTGGAACAGTACCTTACG TTGGCCGGGGTCATATTCTGTATCCATTCAAAACGTGGAC GACAATAACAACAGCACCAATGTGACAGATTTCGCTCCA AAGAATCAGGATGAGTCCCGCGAGGTGAAATATACCTAT GGGTACAAAACAGGAGGTGACTTTAGCATTAAACCGTGGT GGCTTGACTGGTAATATCACGAAGGAAAAAAATTACTCT GAGACTATTTCTACCAACAGCCGTCGTATCGCACCTTGA TCGACCAACCAACGACTAACAAAGGGGTCGCGTGGAAG TTGAGGCCCACAGTATTAACAATATGGGCCACGATCACA CTCGTCAGCTTACTAACGATTTCGGATGACCGCGTCAAGTC GGAAATTTTCAGCCTGACGCGTAACGGAAATTTGTGGGC TAAAGACAATTTCACTCCTAAGAACAAGATGCCCCGTGAC TGTTTCCGAAGGCTTTAATCCCGAATTCTTAGCGGTGATG TCTCATGATAAAAATGATAAAGGAAAATCGCGCTTCATT GTGCATTATAAGCGTTCTATGGACGACTTCAAATTGGATT GGAATAAGCACGGATTCTGGGGGTACTGGTCCGGGGAAA ATCACGTAGATCAAAAGGAAGAGAAGTTGTCCGCTTTGT ATGAAGTGGACTGGAAGACTCACGACGTTAAGTTGATCA AGACCTTCAATGACAAAGAGAAGAAA
Val53Leu LukB из CC8	60	AAGATCAATTCGGAAATTAACAGGTAAGTGAGAAAAAT TTGGATGGCGATACCAAAATGTACACCCGCACCGCTACC ACGTCAGATTCACAAAAAATATTACACAGTCCTTGCAG TTCAATTTCTGACAGAACCGAATTACGACAAGGAGACT TTGTTCAATTAAAGCCAAGGGAACCATCGGGTCCGGATTG CGTATCTTGGACCCGAACGGATATTGGAACCTCGACCTTAC GTTGGCCGGGGTCTTACAGTGTTAGTATCCAAAACGTAG ATGATAACAATAACACAAACGTGACAGATTTTGCACCTA AAAACCAGGACGAAAGCCGCGAGGTAAAGTACACATAT GGGTATAAAACAGGGGGGGACTTTTCCATCAACCGTGGT GGTTTGACCGGGAACATCACCAAGAGTCAAATTACAGT GAGACCATCAGTTATCAGCAGCCGTCCTATCGTACATTAT TGGATCAGTCGACTTCACATAAAGGGGTTCGGATGGAAAG TAGAGGCTCATTGTATCAACAACATGGGTCACGATCATA CACGTCAGTTAACGAACGATAGCGATAATCGCACGAAGT CAGAAATCTTTAGTCTGACTCGTAACGGTAACTTGTGGGC CAAGGACAATTTACGCCCAAAGATAAGATGCCTGTGAC GGTATCGGAGGGGTTCATCCAGAATTCCTTGCTGTAATG TCCCATGACAAAAAAGACAAGGGCAAATCGCAATTTGTA GTCCACTATAAGCGTTCTATGGACGAGTTCAAGATTGACT GGAACCGCCACGGCTTCTGGGGGTACTGGAGTGGTGAGA ATCATGTGGATAAAAAGGAGGAGAACTTAGCGCCCTGT ATGAGGTAGATTGGAAAACACACAATGTCAAGTTCGTGA AAGTTCTTAATGACAACGAAAAAAA
Val53Leu LukB из CC45	61	GAGATCAAGAGCAAAATTACCACCGTGAGCGAAAAGAA CCTGGACGGTGATACCAAAATGTATACCCGTACCGCGAC CACCAGCGACACCGAGAAGAAAATTAGCCAGAGCCTGCA ATTCAACTTTCTGACCGAGCCGAACCTACGATAAGGAAAC CCTGTTTCATCAAGGCGAAAGGCACCATTTGGTAGCGGCCT GAAAATCCTGAACCCGAACGGTTATTGGAACAGCACCT

		GCGTTGGCCGGGTAGCTACAGCGTGAGCATCCAGAACGT TGACGATAACAACAACAGCACCAACGTGACCGACTTCGC GCCGAAGAACCAAGATGAGAGCCGTGAAGTTAAATACAC CTATGGTTACAAAACCGGTGGCGACTTTAGCATTAACCGT GGTGGCCTGACCGGCAACATCACCAAGGAGAAAACTAT AGCGAAACCATTAGCTATCAGCAACCGAGCTACCGTACC CTGATCGATCAGCCGACCACCAACAAGGGTGTGGCGTGG AAAGTTGAGGCGCACAGCATTAACAACATGGGGCCACGAC CACACCCGTCAACTGACCAACGATAGCGACGATCGTGTG AAGAGCGAAATCTTCAGCCTGACCCGTAACGGTAACCTG TGGGCGAAAGACAACCTTTACCCCGAAGAACAATAATGCCG GTGACCGTTAGCGAGGGTTTCAACCCGGAATTTCTGGCG GTGATGAGCCACGACAAGAACGATAAGGGCAAAGCCG TTTCATTGTTCACTACAAACGTAGCATGGACGATTTCAAG CTGGACTGGAACAAACACGGTTTTTGGGGCTATTGGAGC GGCGAGAACCACGTTGATCAGAAAGAGGAGAACTGAG CGCGCTGTACGAAGTGGACTGGAAGACCCACGATGTAA GCTGATCAAAACCTTTAACGATAAAGAAAAGAAA
--	--	--

[00137] В любом варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты полипептидов LukA и LukB, описанные в данном документе, представляют собой кодоны, оптимизированные для экспрессии в клетках

5 млекопитающих, предпочтительно в клетках человека. Способы оптимизации кодонов известны и были описаны ранее (например, публикация международной заявки на патент № WO1996/09378 по авторству Seed, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Последовательность считается оптимизированной по кодонам, если по меньшей мере один кодон, не являющийся

10 предпочтительным, по сравнению с последовательностью дикого типа замещен кодоном, который является более предпочтительным. В данном документе кодон, не являющийся предпочтительным, представляет собой кодон, который используется в организме с меньшей частотой, чем другой кодон, кодирующий такую же

15 аминокислоту, и кодон, являющийся более предпочтительным, представляет собой кодон, который используется в организме более часто, чем кодон, не являющийся предпочтительным. Частоту использования кодонов для конкретного организма можно найти в таблицах частоты использования кодонов, которые хорошо известны и доступны в данной области. Предпочтительно более одного кодона, не являющегося

20 предпочтительным, например более 10%, 40%, 60%, 80% кодонов, не являющихся предпочтительными, предпочтительно большинство (например, по меньшей мере 90%) или все кодоны, не являющиеся предпочтительными, замещены кодонами, которые

являются более предпочтительными. Предпочтительно в оптимизированной по кодам последовательности используют кодоны, наиболее часто используемые в организме. Как правило, замещение предпочтительными кодонами приводит к более высокой экспрессии.

5 **[00138]** Полинуклеотидные последовательности по настоящему изобретению можно клонировать с помощью стандартных методик молекулярной биологии или получать *de novo* путем синтеза ДНК, который можно осуществлять с помощью стандартных процедур с участием компаний, предоставляющих услуги в области синтеза ДНК и/или молекулярного клонирования (например, GeneArt, GenScript, 10 Invitrogen, Eurofins).

[00139] В любом варианте осуществления вышеупомянутые молекулы нуклеиновой кислоты вставлены в вектор, т. е. вектор экспрессии для применения в 15 вакцинной композиции, описанной в данном документе. Альтернативно эти молекулы нуклеиновой кислоты могут быть вставлены в вектор экспрессии, которым трансформируют или трансфицируют подходящую клетку-хозяина для экспрессии и выделения кодированного варианта белка LukA, варианта белка LukB или варианта комплекса LukAB (в виде стабильного гетеродимера), где вариант комплекса LukAB содержит вариант LukA и LukB, который не является вариантом, LukA, который не является вариантом, и вариант LukB или вариант LukA и вариант LukB, описанные в 20 данном документе.

[00140] В соответствии с этим аспектом данного изобретения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие белки и полипептиды LukA и/или LukB *S. aureus*, описанные в данном документе, могут быть включены в любой вектор экспрессии, способный обеспечить экспрессию белков или полипептидов LukA и/или LukB, 25 кодируемых конструкцией на основе последовательности нуклеиновой кислоты. Подходящие векторы экспрессии содержат элементы последовательности нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают контроль, регулирование, запуск или возможность экспрессии белка или полипептида LukA и/или LukB, кодируемых таким вектором. Такие элементы могут включать сайты связывания энхансеров транскрипции, сайты 30 инициации РНК-полимеразы, сайты связывания рибосом и другие сайты, которые облегчают экспрессию кодируемых полипептидов в данной системе экспрессии. Подходящие векторы включают без ограничения ДНК-векторы, плазмидные векторы, линейную нуклеиновую кислоту и вирусный вектор, например аденовирусные векторы.

[00141] В одном варианте осуществления вектор экспрессии представляет собой кольцевую плазмиду (см., например, работу Muthumani et al., «Optimized and Enhanced DNA Plasmid Vector Based In vivo Construction of a Neutralizing anti-HIV-1 Envelope Glycoprotein Fab», *Hum. Vaccin. Immunother.* 9: 2253-2262 (2013), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Плазмиды могут трансформировать клетку-мишень путем интеграции в клеточный геном или существовать внехромосомно (например, автономно реплицирующаяся плазида с точкой начала репликации). Иллюстративные плазмидные векторы предусматривают без ограничения pCER4, pREP4, pVAX, pcDNA3.0, pprovaх или любой другой плазмидный вектор экспрессии, способный обеспечить экспрессию вариантов белков или полипептидов LukA и/или LukB, кодируемых рекомбинантной конструкцией на основе последовательности нуклеиновой кислоты.

[00142] В другом варианте осуществления вектор экспрессии представляет собой линейную кассету экспрессии («LEC»). LEC способны эффективно доставляться субъекту с помощью электропорации для экспрессии белков или полипептидов LukA и/или LukB, кодируемых рекомбинантными молекулами нуклеиновой кислоты, описанными в данном документе. LEC может быть любой линейной ДНК, лишенной фосфатного остова. В одном варианте осуществления LEC не содержит никаких генов устойчивости к антибиотикам и/или фосфатного остова. В другом варианте осуществления LEC не содержит других последовательностей нуклеиновой кислоты, не связанных с экспрессией желаемого гена.

[00143] LEC может быть получена из любой плазмиды, способной к линейаризации. Плазида может быть способна обеспечивать экспрессию белков или полипептидов LukA и/или LukB, кодируемых рекомбинантными молекулами нуклеиновой кислоты, описанными в данном документе. Иллюстративные плазмиды включают без ограничения pNP (Пуэрто-Рико/34), pM2 (Новая Каледония/99), WLV009, pVAX, pcDNA3.0 или pprovaх или любой другой вектор экспрессии, способный обеспечивать экспрессию вариантов белков или полипептидов LukA и/или LukB, кодируемых рекомбинантной конструкцией на основе последовательности нуклеиновой кислоты.

[00144] В другом варианте осуществления вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор. Подходящие вирусные векторы, способные обеспечить экспрессию белков или полипептидов LukA и/или t LukB, предусматривают, например, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (см., например, работы Krause et al.,

«Delivery of Antigens by Viral Vectors for Vaccination», *Ther. Deliv.* 2(1):51-70 (2011); Ura et al., «Developments in Viral Vector-Based Vaccines», *Vaccines* 2: 624-641 (2014); Buning et al., «Recent Developments in Adeno-associated Virus Vector Technology», *J. Gene Med.* 10:717-733 (2008), каждая из которых включена в данный документ посредством
 5 ссылки во всей своей полноте), лентивирусный вектор (см., например, работы Ura et al., «Developments in Viral Vector-Based Vaccines», *Vaccines* 2: 624-641 (2014) и Hu et al., «Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infection Diseases», *Immunol. Rev.* 239: 45-61 (2011), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), ретровирусный вектор (см., например, работу Ura et al.,
 10 «Developments in Viral Vector-Based Vaccines», *Vaccines* 2: 624-641 (2014), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), вирус коровьей оспы, вектор на основе дефектного по репликации аденовируса и аденовирусный «gutless»-вектор (см., например, патент США № 5872005, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Способы
 15 получения и выделения аденоассоциированных вирусов (AAV), пригодных для применения в качестве векторов, известны из уровня техники (см., например, работы Grieger & Samulski, «Adeno-associated Virus as a Gene Therapy Vector: Vector Development, Production and Clinical Applications», *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145 (2005); Buning et al., «Recent Developments in Adeno-associated Virus Vector
 20 Technology», *J. Gene Med.* 10:717-733 (2008), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00145] Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие белки или полипептиды LukA и/или LukB, описанные в данном документе, обычно комбинируют с последовательностями промотора, инициации трансляции, 3'-нетранслируемой
 25 области, полиаденилирования и терминации транскрипции в конструкциях вектора экспрессии для достижения максимальной экспрессии. Промоторные последовательности, подходящие для запуска экспрессии белков LukA и/или LukB или их полипептидов, включают без ограничения промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1a), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор немедленно-раннего гена цитомегаловируса (CMV), химерный промотор, специфичный для печени (LSP),
 30 энхансер цитомегаловируса/промотор бета-актина кур (CAG), тетрациклин-чувствительный промотор (TRE), промотор транстиретина (TTR), промотор обезьяньего вируса 40 (SV40) и промотор СК6. Другие промоторы, подходящие для запуска экспрессии генов в клетках-хозяевах, известные из уровня техники, также

являются подходящими для включения в конструкции экспрессии, раскрытые в данном документе.

[00146] Другой аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, которая содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептиды LukA и/или LukB, описанные в данном документе. С использованием конструкций экспрессии, кодирующих белки или полипептиды LukA и LukB, описанные в данном документе, можно осуществлять котрансфекцию, серийную трансфекцию клеток-хозяев или трансфицировать клетки-хозяева ими отдельно. Белки и полипептиды LukA и LukB, описанные в данном документе, необязательно могут быть получены с помощью линии клеток, смешанной линии клеток, immortalized клетки или клональной популяции immortalized клеток, как хорошо известно из уровня техники (см., например, под ред. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, Нью-Йорк (1987-2001); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2-е издание, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк (1989); под ред. Colligan et al., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, Нью-Йорк, (1997-2001), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Такие клетки-хозяева могут быть эукариотическими клетками, бактериальными клетками, растительными клетками или клетками архей.

[00147] В любом варианте осуществления полипептиды LukA и/или LukB, описанные в данном документе, продуцируются в бактериальной клетке. Подходящие бактериальные клетки-хозяева включают без ограничения клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Escherichia*, клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Pseudomonas*, клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Staphylococcus*, клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Streptomyces*, клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Mycobacterium*, и клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Bacillus*. В любом варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина, которая является бактерией из рода *Escherichia coli*. В любом варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина *S. aureus*.

[00148] В любом варианте осуществления полипептиды LukA и/или LukB, описанные в данном документе, продуцируются в эукариотической клетке. Иллюстративные эукариотические клетки могут происходить от млекопитающих,

насекомых, птиц или других животных. Эукариотические клетки млекопитающих включают immortalized cell lines, такие как гибридомы или линии клеток миеломы, такие как линии мышечных клеток SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), Манассас, Вирджиния, США, CRL-1581), NSO (Европейская коллекция культур клеток (ECACC), Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Иллюстративной линией клеток миеломы человека является U266 (ATTC CRL-TIB-196). Другие применимые линии клеток включают линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), такие как CHO-K1SV (Lonza Biologics, Уолкерсвилл, Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

[00149] Полипептиды LukA и LukB, описанные в данном документе, могут быть получены любой из множества методик с использованием выделенных полинуклеотидов, векторов и клеток-хозяев, описанных выше. В целом белки получают с помощью стандартных методик клонирования и культивирования клеток, которые обычно используются для получения рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и восстановления белков или полипептидов из культуральной среды. Трансфекция клетки-хозяина может быть осуществлена с помощью различных методик, обычно используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, с помощью электропорации, осаждения с фосфатом кальция, трансфекции с использованием DEAE-декстрана и тому подобного.

[00150] Описанные в данном документе полипептиды LukA и/или LukB могут быть посттрансляционно модифицированы при помощи таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или ковалентная модификация, которая не встречается в природе, такая как добавление фрагментов полиэтиленгликоля (ПЭГ) (пегилирование) и липидирование. Такие модификации могут происходить *in vivo* или *in vitro*.

[00151] В любом варианте осуществления полинуклеотиды и/или полипептиды LukA и LukB, описанные в данном документе, предпочтительно являются «выделенными» полинуклеотидами и/или полипептидами. Термин «выделенный» при использовании для описания полинуклеотидов и/или полипептидов, раскрытых в данном документе, означает, что полинуклеотиды и/или полипептиды были идентифицированы, отделены и/или восстановлены из компонента среды их продуцирования. Предпочтительно выделенные полинуклеотиды и/или полипептиды

не характеризуются ассоциацией с другими компонентами среды их продуцирования. Компоненты среды их продуцирования, представляющие собой контаминанты, такие как происходящие из клеток, которые были трансфицированы рекомбинантными нуклеиновыми кислотами, представляют собой материалы, которые обычно могут мешать фармацевтическому применению, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Полинуклеотиды и/или полипептиды восстанавливают и очищают из культур клеток, полученных из применением рекомбинации, при помощи известных способов, включая без ограничения очистку с использованием белка А, осаждение с сульфатом аммония или этанолом, кислотную экстракцию, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, хроматографию гидрофобного взаимодействия, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите и лектиновую хроматографию. Высокоэффективная жидкостная хроматография («HPLC») также может быть использована для очистки.

Вакцинные композиции против *S. aureus*

[00152] Другой аспект настоящего изобретения относится к вакцинным композициям против *Staphylococcus aureus*. В любом варианте осуществления вакцинная композиция против *S. aureus* содержит любой один или более вариантов полипептида LukA, описанных в данном документе, или одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих описанные в данном документе варианты полипептида LukA. В частности, вариант полипептида LukA в вакцинной композиции предусматривает вставку, замену и/или делецию аминокислотного остатка по любому из одного или более аминокислотных остатков, идентифицированных и описанных в данном документе. В любом варианте осуществления вариант LukA в вакцинной композиции предусматривает вариант под SEQ ID NO: 25 или вариант под любым из SEQ ID NO: 1, 2 или 26—38. В любом варианте осуществления вариант LukA в вакцинной композиции предусматривает вариант под SEQ ID NO: 1 (CC8). Иллюстративные варианты LukA из CC8 предусматривают без ограничения варианты LukA под SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9 и 13. В любом варианте осуществления вариант LukA в вакцинной композиции предусматривает вариант под SEQ ID NO: 2 (CC45). Иллюстративные варианты LukA из CC45 предусматривают без ограничения варианты LukA под SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 11, 12 и 14.

[00153] В любом варианте осуществления вакцинная композиция против *S. aureus*, раскрытая в данном документе, содержит вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

5 **[00154]** В любом варианте осуществления вакцинная композиция против *S. aureus*, раскрытая в данном документе, содержит вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

[00155] В любом варианте осуществления вакцинная композиция против *S. aureus*, раскрытая в данном документе, содержит вариант LukA из CC45, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

10 **[00156]** В любом варианте осуществления вакцинная композиция против *S. aureus*, раскрытая в данном документе, содержит любой один или более вариантов белка или полипептида LukB, описанных в данном документе, или одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих варианты белка или полипептида LukB, описанные в данном документе. В частности, вариант полипептида LukB в вакцинной

15 композиции предусматривает вставку, замену и/или делецию аминокислотного остатка по любому из одного или более аминокислотных остатков, идентифицированных и описанных в данном документе. В любом варианте осуществления вариант LukB в вакцинной композиции предусматривает вариант под SEQ ID NO: 39 или вариант под любым из SEQ ID NO: 15, 16 или 40—51. В любом варианте осуществления вариант

20 LukB в вакцинной композиции предусматривает вариант под SEQ ID NO: 15 (CC8). Иллюстративные варианты LukB из CC8 предусматривают без ограничения варианты LukB под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В любом варианте осуществления вариант LukB в вакцинной композиции предусматривает вариант под SEQ ID NO: 16 (CC45). Иллюстративные варианты LukB из CC45 предусматривают без ограничения варианты

25 LukB под SEQ ID NO: 18, 20 и 21.

[00157] В любом варианте осуществления вакцинная композиция, раскрытая в данном документе, содержит как белки LukA, так и LukB. Соответственно, в любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 1 в комбинации с последовательностью LukB из CC8, которая не является

30 вариантом, под SEQ ID NO: 15 или вариантом последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления последовательность варианта последовательности LukB из CC8 предусматривает

аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. Например, в любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 3 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется 85% или более идентичностью последовательности с LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности LukB из CC8, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 5 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности LukB из CC8, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 7 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности LukB из CC8, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 9 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности LukB из CC8, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21.

[00158] В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, и вариант LukB из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15.

[00159] В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, и вариант LukB из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17.

[00160] В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 1 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или вариантом последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления вариант последовательности LukB из CC45 предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. Например, в любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 3 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариантом последовательности LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 5 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариантом последовательности LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 7 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариантом последовательности LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 9 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариантом последовательности LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22.

[00161] В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и вариант LukB из CC45, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

[00162] В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и вариант LukB из CC45, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

[00163] В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID

NO: 5, и вариант LukB из CC45, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

5 [00164] В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и вариант LukB из CC45, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

10 [00165] В любом варианте осуществления вакцинные композиции содержат вариант белка LukA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, и белок LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

15 [00166] В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 2 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или вариантом последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления вариант последовательности LukB из CC45 предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. Например, в любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 4 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариантом последовательности LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 6 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариантом последовательности LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 8 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариантом LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 10 в

комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариантом LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В любом варианте осуществления

5 вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 11 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариантом LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В любом варианте осуществления

10 вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 12 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариантом LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22.

15 **[00167]** В одном варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, в комбинации с LukB из CC45, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

20 **[00168]** В одном варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 11, в комбинации с LukB из CC45, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

25 **[00169]** В одном варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 12, в комбинации с LukB из CC45, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

30 **[00170]** В одном варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 8, в комбинации с LukB из CC45, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

[00171] В одном варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, в комбинации с вариантом LukB из CC45, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

[00172] В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO:2 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или вариантом последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления вариант последовательности LukB из CC8 предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. Например, в любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 4 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 6 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 8 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 9 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 10 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант

LukA из CC45 под SEQ ID NO: 11 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 12 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21.

[00173] Другой аспект настоящего изобретения относится к вакцинной композиции против *Staphylococcus aureus*, которая содержит любой из вариантов полипептида LukB, описанных в данном документе, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант LukB. В частности, вариант полипептида LukB в вакцинной композиции предусматривает одну или более вставок, замен и/или делеций аминокислотных остатков, описанных в данном документе. В любом варианте осуществления вариант LukB в вакцинной композиции предусматривает вариант под SEQ ID NO: 15 (CC8). Иллюстративные варианты LukB из CC8 предусматривают без ограничения варианты LukB под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В любом варианте осуществления вариант LukB в вакцинной композиции предусматривает вариант под SEQ ID NO: 16 (CC45). Иллюстративные варианты LukB из CC45 предусматривают без ограничения варианты LukB под SEQ ID NO: 18, 20 и 22.

[00174] В любом варианте осуществления вакцинная композиция, раскрытая в данном документе, содержит вариант полипептида LukB, описанный в данном документе, с белком или полипептидом LukA. Соответственно, в любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukB из CC8 под SEQ ID NO:15, *например* вариант под SEQ ID NO: 17, 19 и 21, в комбинации с последовательностью LukA из CC8 под SEQ ID NO: 1 или вариантом последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukB из CC8 под SEQ ID NO:15, *например* вариант под SEQ ID NO: 17, 19 и 21, в комбинации с последовательностью LukA из CC45 под SEQ ID NO: 2 или вариантом

последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 2.

5 [00175] В любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukB из CC45 под SEQ ID NO:16, например вариант под SEQ ID NO: 18, 20 или 22, в комбинации с последовательностью LukA из CC8 под SEQ ID NO: 1 или вариантом последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 1. В
10 любом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант LukB из CC45 под SEQ ID NO:16, например вариант под SEQ ID NO: 18, 20 или 22, в комбинации с последовательностью LukA из CC45 под SEQ ID NO: 2 или вариантом последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью
15 последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 2.

[00176] Вакцинные композиции по настоящему изобретению получают путем составления полипептидов LukA и/или LukB, описанных в данном документе, с фармацевтически приемлемым носителем и необязательно фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом. Состав фармацевтически активных
20 ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известен из уровня техники, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21-е издание (2005) и любые последующие издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают буферы, разбавители, растворители, средства для регулирования тонуса, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие средства.
25 Один или более фармацевтически приемлемых носителей можно применять при составлении фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

[00177] Используемые в данном документе термины «фармацевтически приемлемый носитель» и «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» (например, добавки, такие как разбавители, иммуностимуляторы, адъюванты, антиоксиданты, консерванты и солюбилизаторы) являются нетоксичными для
30 субъекта, которому вводится композиция в используемых дозах и концентрациях. Примеры фармацевтически приемлемых носителей предусматривают воду, например забуференную фосфатом, цитратом или другой органической кислотой. Типичные примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, которые могут быть

полезны в настоящем изобретении, предусматривают антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества.

[00178] В любом варианте осуществления вакцинная композиция, описанная в данном документе, представляет собой жидкую композицию. Предпочтительным примером жидкой композиции является водный состав, т. е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может предусматривать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т. п. Водный состав обычно содержит по меньшей мере 50% вес/вес воды, или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, или по меньшей мере 95% вес/вес воды.

[00179] Вакцинная композиция может дополнительно включать один или более адъювантов. Используемый в данном документе термин «адъювант» относится к соединению, которое при введении вместе с полипептидами LukA и/или LukB, описанными в данном документе, обеспечивает повышение, усиление и/или стимулирование иммунного ответа на полипептиды. Однако, если соединение, представляющее собой адъювант, вводят отдельно, оно не обеспечивает генерирование иммунного ответа на вышеупомянутые полипептиды или полинуклеотиды, кодирующие их. Адъюванты могут обеспечить усиление иммунного ответа за счет нескольких механизмов, включая, например, вовлечение лимфоцитов, стимуляцию В-и/или Т-клеток и стимуляцию антигенпрезентирующих клеток.

[00180] Вакцинная композиция, описанная в данном документе, содержащая полипептиды LukA и/или LukB и/или полинуклеотиды, кодирующие их, содержит адъювант или вводится в комбинации с адъювантом. Адъювант для введения в комбинации с вакцинной композицией, описанной в данном документе, может быть введен до введения вакцинной композиции, одновременно с этим или после этого.

[00181] Подходящие адъюванты известны из уровня техники и предусматривают без ограничения флагеллин, полный адъювант Фрейнда, неполный адъювант Фрейнда, гидроксид алюминия, лизолецитин, плуроник-полиолы, полианионы, пептиды,

масляную эмульсию, динитрофенол, iscomatrix и липосомные частицы поликатиона и ДНК. Дополнительные примеры адъювантов предусматривают, например, β -глюкан, описанный в патенте США 6355625, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, или гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (GCSF).

[00182] Дополнительные иллюстративные адъюванты предусматривают без ограничения соли алюминия (квасцы) (такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия и оксид алюминия, включая наночастицы, содержащие квасцы или наноквасцовые составы), фосфат кальция (*например*, работа Masson JD et al, *Expert Rev Vaccines* 16: 289-299 (2017), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), монофосфориллипид А (MPL) или 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL) (*см.*, *например*, патенты Объединенного Королевства Великобритании GB2220211, EP0971739, EP1194166, US6491919, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), AS01, AS02, AS03 и AS04 (*см.*, *например*, EP1126876, US7357936 для AS04, EP0671948, EP0761231, US5750110 для AS02, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), имидазопиридиновые соединения (*см.* WO2007/109812, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), имидазохиноксалиновые соединения (*см.* WO2007/109813, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), дельта-инулин (*например*, работа Petrovsky N and PD Cooper, *Vaccine* 33: 5920-5926 (2015), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), STING-активирующие синтетические циклические динуклеотиды (*например*, US20150056224, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте), комбинации гомополимеров лецитина и карбомера (*например*, US6676958, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и сапонины, такие как Quil A и QS21 (*см.*, *например*, работу Zhu D and W Tuo, 2016, *Nat Prod Chem Res* 3: e113 (doi:10.4172/2329-6836.1000e113), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), необязательно в комбинации с QS7 (*см.* Kensil et al., в *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (ред. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5057540, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В любом варианте осуществления адъювант представляет собой адъювант Фрейнда (полный или неполный). В любом варианте осуществления адъювант содержит Quil-A, такой как,

например, коммерчески доступный от Brenntag (сейчас 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 индуцируют сильный адьювантный ответ как на Т-зависимые, так и на Т-независимые антигены, а также сильные цитотоксические ответы CD8+-лимфоцитов и потенцируют ответ на антигены в слизистых оболочках. Соответственно, в любом варианте осуществления адьювант предусматривает сапонины. В любом варианте осуществления адьювант предусматривает QS-21.

[00183] В любом варианте осуществления сапонин объединен с холестерином и фосфолипидами с формированием иммуностимулирующих комплексов (ISCOM), которые могут активировать как антителоопосредованный, так и клеточноопосредованный иммунный ответ на широкий спектр антигенов из различных источников. В определенных вариантах осуществления адьювант представляет собой AS01, например AS01B. AS01 представляет собой адьювантную систему, содержащую MPL (3-О-дезацил-4'-монофосфориллипид А), QS21 (*Quillaja saponaria* Molina, фракция 21) и липосомы. В определенных вариантах осуществления AS01 коммерчески доступен или может быть получен, как описано в WO 96/33739, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Определенные адьюванты предусматривают эмульсии, которые представляют собой смеси двух несмешивающихся жидкостей, например масла и воды, одна из которых взвешена в виде мелких капель внутри другой и стабилизирована за счет поверхностно-активных веществ. В эмульсиях типа масло в воде вода образует непрерывную фазу, окружая небольшие капли масла, в то время как в эмульсиях типа вода в масле масло образует непрерывную фазу. Определенные эмульсии типа масло в воде содержат сквален (метаболизируемое масло). Определенные адьюванты содержат блок-сополимеры, которые представляют собой сополимеры, которые образуются, когда два мономера вместе формируют кластер и образуют блоки повторяющихся единиц. Примером эмульсии типа вода в масле, содержащей блок-сополимер, сквален и стабилизатор микрочастиц, является TiterMax®, которую можно коммерчески получить от Sigma-Aldrich.

[00184] Необязательно эмульсии можно комбинировать с дополнительными иммуностимулирующими компонентами, такими как агонист TLR4, или они могут содержать их. Подходящие, но не ограничивающие примеры комбинаций адьювантов

для применения в композициях, раскрытых в данном документе, предусматривают эмульсии типа масло в воде (такие как сквален или арахисовое масло), MF59 (см., например, EP0399843, US 6299884, US6451325, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и AS03, необязательно в комбинации со стимуляторами иммунитета, такими как монофосфорил-липид А и/или QS21, как в AS02 (см. работу Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336: 86-91 (1997), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Дополнительными примерами адъювантов являются липосомы, содержащие иммуностимуляторы, такие как MPL и QS21, такие как в AS01E и AS01B (см., например, US 2011/0206758, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Другими примерами адъювантов являются CpG и имидазохинолины (такие как имиквимод и R848) (см., например, работу Reed G. et al., *Nature Med.* 19: 1597-1608 (2013), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В любом варианте осуществления согласно данному изобретению адъювант представляет собой адъювант Th1.

[00185] В любом варианте осуществления адъювант вакцинной композиции, раскрытой в данном документе, содержит агонист toll-подобного рецептора 4 (TLR4) отдельно или в комбинации с другим адъювантом. Агонисты TLR4 хорошо известны из уровня техники, см., например, работу Ireton GC and SG Reed, *Expert Rev Vaccines* 12: 793-807 (2013), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В любом варианте осуществления адъювант представляет собой агонист TLR4, содержащий липид А или его аналог или производное.

[00186] В любом варианте осуществления адъювант вакцинной композиции содержит липид А или аналог или производное липида А. Используемый в данном документе термин «липид А» относится к гидрофобному липидному фрагменту молекулы LPS, который содержит глюкозамин и связан с кетодезоксиоктулозонатом во внутреннем ядре молекулы LPS кетозидной связью, которая заякоривает молекулу LPS в наружном листке наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Липид А, как используется в данном документе, предусматривает встречающийся в природе липид А, его смеси, аналоги, производные и предшественники. Термин предусматривает моносахариды, например предшественник липида А, называемый липидом Х; дисахарид липида А; гептаацил липида А; гексаацил липида А; пентаацил липида А; тетраацил липида А, например тетраацильный предшественник липида А, называемый липидом IVA; дефосфорилированный липид А; монофосфорил липида А; дифосфорил

липид А, такой как липид А из *Escherichia coli* и *Rhodobacter sphaeroides*. Некоторые иммуноактивирующие структуры на основе липида А содержат 6 ацильных цепей. Четыре первичные ацильные цепи, присоединенные непосредственно к сахарам глюкозамина, представляют собой 3-гидроксиацильные цепи, обычно имеющие длину от 10 до 16 атомов углерода. Две дополнительные ацильные цепи часто присоединены к 3-гидроксигруппам первичных ацильных цепей. В качестве примера липид А *E. coli* обычно содержит четыре 3-гидроксиацильные цепи C14, присоединенные к сахарам, и одну C12 и одну C14, присоединенные к 3-гидроксигруппам первичных ацильных цепей в положениях 2' и 3' соответственно.

[00187] Используемый в данном документе термин «аналог или производное липида А» относится к молекуле, которая по структуре и иммунологической активности напоминает активность липида А, но которая не обязательно естественным образом встречается в природе. Аналоги или производные липида А можно модифицировать из обеспечением их укорачивания или конденсации и/или для того, чтобы их остатки глюкозамина были замещены другим остатком аминсахара, например остатками галактозамина, чтобы на восстанавливающем конце содержался 2-дезоксид-2-аминоглюконат вместо глюкозамин-1-фосфата, чтобы в положении 4' находился фрагмент галактуроновой кислоты вместо фосфата. Аналоги или производные липида А могут быть получены из липида А, выделенного из бактерии, например, путем химического получения или химического синтеза, например путем первоначального определения структуры предпочтительного липида А и осуществления синтеза его аналогов или производных. Аналоги или производные липида А также можно использовать в качестве адъювантов-агонистов TLR4 (см., например, работу Gregg KA et al, *MBio* 8, eDD492-17, doi: 10.1128/mBio.00492-17 (2017), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00188] MPL и 3D-MPL представляют собой аналоги или производные липида А, которые были модифицированы для обеспечения аттенуации токсичности липида А. Липид А, MPL и 3D-MPL содержат сахарный остов, к которому присоединены длинные цепи жирных кислот, где остов содержит два 6-углеродных остатка сахара в гликозидной связи и фосфорильный фрагмент в положении 4. Как правило, от пяти до восьми длинноцепочечных жирных кислот (обычно по 12—14 атомов углерода) присоединены к сахарному остову. Вследствие происхождения из естественных источников MPL или 3D-MPL могут присутствовать в виде композиции или смеси из

целого ряда паттернов 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 данном документе, однако синтетические варианты липида А также могут быть определенными и однотипными.

5 MPL и его производство описаны в US 4436727, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. 3D-MPL описан в US 4912094B1 (который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и отличается от MPL селективным удалением остатка ацильного сложного эфира 3-гидроксимиристиновой кислоты, который посредством сложноэфирной связи связан с
10 глюкозамином на восстанавливающем конце в положении 3. Примеры липида А (аналоги, производные), подходящие для включения в вакцинные композиции, описанные в данном документе, предусматривают MPL, 3D-MPL, RC529 (см., например, EP1385541, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), PET-липид А, GLA (гликопиранозиллипидный адъювант, синтетический гликолипид на основе дисахарида; см., например, US20100310602 и
15 US8722064, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), SLA (см., например, работы Carter D et al, *Clin. Transl. Immunology* 5: e108 (doi:10.1038/cti.2016.63) (2016), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и в которой описывается структурно-функциональный
20 подход к оптимизации лигандов TLR4 для вакцин для людей), PHAD (фосфорилированный гексаацилдисахарид; структура которого такая же, как у GLA), 3D-PHAD, 3D-(6-ацил)-PHAD (3D(6A)-PHAD), E6020 (номер CAS 287180-63-6), ONO4007, OM-174 и т. п. В любом варианте осуществления адъювант вакцинной композиции представляет собой адъювант-агонист TLR4, предусматривающий аналог
25 или производное липида А, выбранные из 3D-MPL, GLA или SLA. В некоторых вариантах осуществления аналог или производное липида А содержится в липосомах.

[00189] Адъювант, предпочтительно предусматривающий агонист TLR4, может быть составлен различными способами, например, в эмульсии, такой как эмульсия типа вода в масле (в/м) или эмульсия типа масло в воде (м/в) (примерами являются MF59, AS03), стабильные (нано-)эмульсии (SE), липидные суспензии, липосомы,
30 (полимерные) наночастицы, виросомы, адсорбированные квасцы, водные составы (AF) и т. п., которые представляют различные системы доставки для иммуномодулирующих молекул в адъюванте и/или для иммуногенов (см., например, Reed et al, *Nature Med*, 19:

1597-1608 (2013) и Alving CR et al, *Curr Opin Immunol* 24: 310-315 (2012), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00190] В любом варианте осуществления иммуностимулирующий агонист TLR4 может быть необязательно объединен с другими иммуномодулирующими компонентами, такими как скваленовая эмульсия типа масло в воде (SE) (*например*, MF59; AS03); сапонины (*например*, QuilA, QS7, QS21, Matrix M, Iscoms, Iscomatrix и т. д.); соли алюминия, активаторы для других TLR (*например*, имидазохинолины, флагеллин, аналоги dsRNA, агонисты TLR9, такие как CpG и т. д.) и т. п. (*см.*, *например*, работу Reed G. et al., *Nature Med*, 19: 1597-1608 (2013), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00191] В любом варианте осуществления адъювант вакцинной композиции, раскрытой в данном документе, представляет собой комбинацию агониста TLR4, *например* GLA, в комбинации с SE (*т. е.* GLA-SE). В любом варианте осуществления адъювант вакцинной композиции, раскрытой в данном документе, представляет собой комбинацию агониста TLR4, *например* GLA, в комбинации с сапонином (*например*, GLS-QS21). В любом варианте осуществления вышеупомянутые адъюванты могут быть составлены в виде липосом. Таким образом, иллюстративный адъювант также предусматривает GLA-LSQ, который содержит синтетический агонист TLR4 (*например*, MPL [GLA]) и сапонин (*например*, QS21), составленные в виде липосом.

[00192] Дополнительные иллюстративные адъюванты для применения в вакцинных композициях, описанных в данном документе, предусматривают аналог или производное липида А и включают, *например*, SLA-SE (синтетический MPL [SLA], скваленовая эмульсия типа масло в воде), 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), AS01 (MPL, QS21, липосомы), AS02 (MPL, QS21, эмульсия типа масло в воде), AS25 (MPL, эмульсия типа масло в воде), 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; патент США № 4987237; патент США № 4436727; патент США № 4877611; патент США № 4866034; патент США № 4912094; патент США № 4987237; патент США № 5191072; патент США № 5593969; патент США № 6759241; патент США № 9017698; патент США № 9149521; патент США

№ 9149522; патент США № 9415097; патент США № 9415101; патент США № 9504743; Reed G. et al., *Nature Med*, 19: 1597-1608 (2013), Johnson et al., *J Med Chem*, 42:4640-4649 (1999) и Ulrich and Myers, 1995, *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*; под ред. Powell and Newman; Plenum: Нью-Йорк, 495-524, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00193] В любом варианте осуществления белки LukA и/или LukB или их полипептиды в составе вакцинной композиции могут быть конъюгированы с иммуногенной молекулой-носителем. Подходящие иммуногенные молекулы-носители предусматривают без ограничения бычий сывороточный альбумин, овальбумин куриного яйца, гемоцианин моллюска *Megathura crenulata*, столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин, тиреоглобулин, пневмококковый капсульный полисахарид, CRM 197 и менингококковый белок внешней мембраны.

[00194] Вакцинная композиция может дополнительно содержать один или более дополнительных антигенов *S. aureus*, выбранных из группы, состоящей из антигена, представляющего собой полисахарид серотипа 336, фактора комкования A, фактора комкования B, фибриногенсвязывающего белка, коллагенсвязывающего белка, эластинсвязывающего белка, белка-аналога МНС, полисахарида внутриклеточной адгезии, бета-гемолизина, дельта-гемолизина, лейкоцидина Пантона-Валентайна, лейкоцидина M, эксфолиативного токсина A, эксфолиативного токсина B, протеазы V8, гиалуронатлиазы, липазы, стафилокиназы, энтеротоксина, суперантигена, представляющего собой энтеротоксин SEA, суперантигена, представляющего собой энтеротоксин SAB, токсина-1 синдрома токсического шока, поли-N-сукцинил-бета-1→6 глюкозамина, каталазы, бета-лактамазы, тейхоевой кислоты, пептидогликана, пенициллинсвязывающего белка, белка, ингибирующего хемотаксис, ингибитора комплемента, Sbi, антигена типа 5, антигена типа 8 и липотейхоевой кислоты. Другой антиген *S. aureus*, подходящий для включения в вакцинные композиции, описанные в данном документе, предусматривает без ограничения CP5, CP8, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, EsxAB (слитый продукт), IsdA, IsdB, IsdC, MntC, rTSST-1, rTSST-1v, TSST-1, SasF, vWbp, vWh, витронектинсвязывающий белок, Aaa, Aap, Ant, аутолизинглюкозаминидазу, аутолизинамидазу, Can, коллагенсвязывающий белок, Csa1A, EFB, эластинсвязывающий белок, EPB, FbpA, фибриногенсвязывающий белок, фибронектинсвязывающий белок, FhuD, FhuD2, FnbA, FnbB, GehD, HarA, HBP, иммунодоминантный транспортер ABC, IsaA/PisA, рецептор ламинина, липазу GehD, MAP, транспортер Mg²⁺, аналог МНС II, MRPII, NP-азу, RNA III-активирующий белок

(RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, экзотоксины, представляющие собой SEA, экзотоксины, представляющие собой SEB, mSEB, SitC, транспортер Ni ABC, SitC/MntC/связывающий белок слюны, SsaA, SSP-1, SSP-2, Sta006 и Sta011.

5 [00195] В любом варианте осуществления вакцинная композиция составлена в виде препарата для инъекций, который можно вводить, например, посредством устройства для инъекций (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекция может доставляться, например, внутримышечно, внутривенно, интравитреально или внутривенно.

10 [00196] Вакцинная композиция по данному изобретению может быть составлена для парентерального введения. Растворы, суспензии или эмульсии композиции можно получать в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также можно получать в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях в маслах. Иллюстративными маслами являются масла нефтяного, животного, растительного или синтетического

15 происхождения, например арахисовое масло, соевое масло или минеральное масло. В общем вода, физиологический раствор, водный раствор декстрозы и соответствующего сахара и гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, являются предпочтительными жидкими носителями, особенно для растворов для инъекций. При обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для

20 предупреждения роста микроорганизмов.

[00197] Фармацевтические вакцинные композиции, пригодные для применения путем инъекции, предусматривают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна

25 быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий

30 полиэтиленгликоль), их подходящие смеси и растительные масла.

[00198] В любом варианте осуществления вакцинная композиция, описанная в данном документе, представляет собой твердый состав, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть или к которой врач или пациент добавляют растворители и/или разбавители перед

использованием. Твердые лекарственные формы могут предусматривать таблетки, такие как прессованные таблетки и/или покрытые оболочкой таблетки, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Вакцинная композиция также может быть, например, в форме пакетиков, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для растворения.

[00199] Лекарственные формы вакцинной композиции могут характеризоваться немедленным высвобождением, в этом случае они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут характеризоваться отсроченным высвобождением, устойчивым высвобождением или модифицированным высвобождением, в этом случае они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

[00200] В других вариантах осуществления вакцинная композиция может доставляться интраназально, интрабуккально или сублингвально.

[00201] Уровень pH в водном составе вакцинной композиции может находиться между pH 3 и pH 10. В одном варианте осуществления pH вакцинной композиции составляет от приблизительно 7,0 до приблизительно 9,5. В другом варианте осуществления pH вакцинной композиции составляет от приблизительно 3,0 до приблизительно 7,0.

Применение вакцинных композиций против *S. aureus*

[00202] Другой аспект настоящего изобретения относится к применению описанных в данном документе вакцинных композиций для предупреждения или ингибирования начала инфекции, обусловленной *S. aureus*, у субъекта. В одном варианте осуществления данное изобретение относится к способу обеспечения генерирования иммунного ответа на *S. aureus* у субъекта, который предусматривает введение субъекту вакцинной композиции, описанной в данном документе, при условиях, эффективных для генерирования указанного иммунного ответа на *S. aureus* у указанного субъекта. Другой вариант осуществления относится к способу лечения или предупреждения инфекции, обусловленной *S. aureus*, у нуждающегося в этом субъекта, который предусматривает введение эффективного количества вакцинной композиции, описанной в данном документе. Другой вариант осуществления относится к способу обеспечения деколонизации или предупреждения колонизации или повторной колонизации *S. aureus* у нуждающегося в этом субъекта, который предусматривает введение эффективного количества вакцинной композиции, описанной в данном

документе. В соответствии с этим аспектом описанные в данном документе способы подходят для предупреждения краткосрочной и стойкой колонизации или повторной колонизации *S. aureus* у нуждающегося в этом субъекта.

5 [00203] Эти способы предусматривают введение любой из описанных в данном документе вакцинных композиций нуждающемуся в этом субъекту, *например* субъекту, подверженному риску контакта с *S. aureus* или инфицирования им. В одном варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант полипептида LukA (т. е. вариант SEQ ID NO: 1 или 2) и белок или полипептид LukB дикого типа, описанные выше. В другом варианте осуществления вакцинная композиция содержит белок или 10 полипептид LukA дикого типа и вариант полипептида LukB (т. е. вариант под SEQ ID NO: 15 или 16), описанные выше. В другом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вариант полипептида LukA и вариант полипептида LukB, описанные выше. Подходящим субъектом для лечения в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения является субъект, подверженный риску развития инфекции, 15 обусловленной *S. aureus*.

[00204] В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения субъекту вводят профилактически эффективное количество вакцинной композиции для генерирования иммунного ответа на инфекцию, обусловленную *S. aureus*. Профилактически эффективное количество представляет собой количество, 20 необходимое для генерирования или обусловливания гуморального (т. е. антителоопосредованного) и клеточного (Т-клетки) иммунных ответов. Вызванный гуморальный ответ является достаточным для предупреждения или по меньшей мере уменьшения степени развития инфекции, обусловленной *S. aureus*, которая в противном случае развилась бы при отсутствии такого ответа. Предпочтительно 25 введение профилактически эффективного количества вакцинной композиции, описанной в данном документе, индуцирует нейтрализующий иммунный ответ на *S. aureus* у субъекта. Для обеспечения эффективного иммунного ответа у субъекта композиция может дополнительно содержать один или более дополнительных антигенов *S. aureus* или адъювант, описанные выше. В альтернативном варианте 30 осуществления адъювант вводят субъекту отдельно от композиции — до введения композиции по настоящему изобретению, после этого либо одновременно с этим.

[00205] Для целей этого аспекта данного изобретения «субъект»-мишень охватывает любое животное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека. В контексте введения вакцинной композиции с целью предупреждения,

ингибирования или уменьшения тяжести инфекции, обусловленной *S. aureus*, и степени колонизации *S. aureus* у субъекта субъект-мишень охватывает любого субъекта, который подвержен риску инфицирования *S. aureus*. Особенно восприимчивые субъекты включают младенцев, подростков, взрослых и пожилых людей с ослабленным иммунитетом. Однако любого младенца, подростка, взрослого или пожилого человека, подверженных риску инфицирования *S. aureus*, можно лечить в соответствии с описанными в данном документе способами и вакцинной композицией. Особенно подходящие субъекты включают тех, кто подвержен риску инфицирования метициллинрезистентным *S. aureus* (MRSA) или метициллинчувствительным *S. aureus* (MSSA). Другие подходящие субъекты включают тех субъектов, которые могут иметь или подвержены риску развития состояния, возникающего в результате инфекции, обусловленной *S. aureus*, *т. е.* состояния, ассоциированного с *S. aureus*, такого как, например, раны и инфекции кожи, абсцессы тканей, фолликулит, остеомиелит, пневмония, синдром ошпаренной кожи, септицемия, септический артрит, миокардит, эндокардит и синдром токсического шока.

[00206] В любом варианте осуществления возраст субъекта составляет по меньшей мере 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 находится в любом диапазоне, который можно получить в пределах указанного выше). В определенных вариантах осуществления субъект или пациент, описанный в данном документе, например субъект, представляющий собой человека, является субъектом-ребенком. Субъект-ребенок является субъектом, возраст которого определяется как менее 18 лет. В любом варианте осуществления возраст субъекта-ребенка составляет 2 года или менее. В любом варианте осуществления возраст субъекта-ребенка составляет менее 1 года. В любом варианте осуществления возраст субъекта-ребенка составляет менее 6 месяцев. В любом варианте осуществления возраст субъекта-ребенка составляет 2 месяца или менее. В любом варианте осуществления возраст пациента-человека составляет 65 лет или более. В любом варианте осуществления человек-пациент является медицинским работником. В любом варианте осуществления пациент является пациентом, которому предстоит хирургическая процедура.

[00207] Многочисленные другие факторы также могут быть учтены при введении вакцинной композиции в условиях, эффективных для индуцирования устойчивого иммунного ответа. Эти факторы предусматривают, например и без

ограничения, концентрацию активных средств в композиции, способ и частоту введения, а также данные о субъекте, такие как возраст, вес и общее состояние здоровья и иммунитета. Общее руководство можно найти, например, в публикациях Международной конференции по гармонизации и в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company 1990), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Клиницист может вводить вакцинную композицию, описанную в данном документе, до достижения дозы, которая обеспечивает желаемый или требуемый профилактический эффект, например желаемые титры антител. В случае профилактики мониторинг развития ответа можно легко осуществлять с помощью обычных анализов.

[00208] В одном варианте осуществления настоящего изобретения вакцинную композицию, описанную в данном документе, вводят с профилактической целью для предупреждения, задержки или ингибирования развития инфекции, обусловленной *S. aureus*, у субъекта, подверженного риску инфицирования *S. aureus* или риску развития ассоциированного состояния. В любом варианте осуществления настоящего изобретения профилактическое введение вакцинной композиции эффективно для полного предупреждения инфекции, обусловленной *S. aureus*, у индивидуума. В других вариантах осуществления профилактическое введение эффективно для предупреждения полного развития инфекции, которая в противном случае развилась бы в отсутствие такого введения, т. е. по сути оно предупреждает или подавляет инфекцию, обусловленную *S. aureus*, у индивидуума.

[00209] В контексте применения профилактических композиций для предупреждения инфекции, обусловленной *S. aureus*, доза композиции является достаточной для генерирования титра антител, с помощью которых можно нейтрализовать цитотоксичность, опосредованную LukAB *S. aureus*, и достичь уменьшения ряда симптомов, уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома, или задержки дальнейшего прогрессирования по меньшей мере одного симптома, или даже общего смягчения протекания инфекции.

[00210] Профилактически эффективные количества вакцинных композиций, описанных в данном документе, будут зависеть от того, вводится ли совместно адъювант, при этом в отсутствие адъюванта требуются более высокие дозы. Количество варианта LukA и/или LukB для введения может варьироваться от 1 мкг до 500 мкг на пациента. В любом варианте осуществления для каждой инъекции для человека используется 5, 10, 20, 25, 50 или 100 мкг. Иногда используется более высокая

доза, составляющая 1—50 мг на инъекцию. Обычно для каждой инъекции для человека используется приблизительно 10, 20, 30, 40 или 50 мг. Время введения инъекций может значительно варьироваться и составляет от одного раза в год до одного раза в десять лет. Как правило, мониторинг для установления эффективной дозы можно осуществлять путем получения образца жидкости от субъекта, как правило образца сыворотки крови, и определения титра антител, которые образовались в ответ на LukA, LukB или LukAB, с применением способов, хорошо известных из уровня техники и легко адаптируемых к специфическому антигену, подлежащему измерению. В идеале образец отбирают до первоначального введения дозы, а последующие образцы отбирают и титруют после каждой иммунизации. Как правило, желательными являются доза или схема введения доз, которые обеспечивают титр, поддающийся выявлению, который по меньшей мере в четыре раза превышает контрольные или «фоновые» уровни при разведении сыворотки крови в соотношении 1:100, где фоновый уровень определяется относительно контрольной сыворотки крови или относительно фонового уровня для планшета в ELISA-анализах.

[00211] Вакцинные композиции по настоящему изобретению можно вводить парентерально, местно, внутривенно, перорально, внутривнутрибрюшинно, интраназально или внутримышечно для профилактического лечения.

[00212] Вакцинные композиции по настоящему изобретению могут быть составлены для парентерального введения. Растворы, суспензии или эмульсии композиции можно получать в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также можно получать в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях в маслах. Иллюстративными маслами являются масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло или минеральное масло. В общем вода, физиологический раствор, водный раствор декстрозы и соответствующего сахара и гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, являются предпочтительными жидкими носителями, особенно для растворов для инъекций. При обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предупреждения роста микроорганизмов.

[00213] Фармацевтические вакцинные составы, пригодные для применения путем инъекции, предусматривают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна

быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), их подходящие смеси и растительные масла.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00214] В настоящем изобретении предусмотрены следующие неограничивающие варианты осуществления.

[00215] В варианте осуществления 1 предусмотрен вариант полипептида, который представляет собой лейкоцидин A (LukA) *Staphylococcus aureus*, под SEQ ID NO:25, при этом указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[00216] В варианте осуществления 2 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 1, где указанный вариант полипептида LukA дополнительно предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует Glu323 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[00217] В варианте осуществления 3 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 2, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Glu323, предусматривает замену глутаминовой кислоты на аланин (Glu323Ala).

[00218] В варианте осуществления 4 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 1—3, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Lys83, предусматривает замену лизина на метионин (Lys83Met).

[00219] В варианте осуществления 5 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 1—4, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Ser141, предусматривает замену серина на аланин (Ser141Ala).

[00220] В варианте осуществления 6 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 1—5, где аминокислотная замена по

аминокислотному остатку, который соответствует Val113, предусматривает замену валина на изолейцин (Val113Ile).

5 [00221] В варианте осуществления 7 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 1—6, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Val193, предусматривает замену валина на изолейцин (Val193Ile).

10 [00222] В варианте осуществления 8 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 2—7, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[00223] В варианте осуществления 9 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 8, где аминокислотные замены предусматривают Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala.

15 [00224] В варианте осуществления 10 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 1, где указанный вариант представляет собой вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 1, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile и Glu320Ala в последовательности под SEQ ID NO: 1.

20 [00225] В варианте осуществления 11 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 10, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

25 [00226] В варианте осуществления 12 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 1, где указанный вариант представляет собой вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 2, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile и Glu321Ala в последовательности под SEQ ID NO: 2.

30 [00227] В варианте осуществления 13 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 12, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

[00228] В варианте осуществления 14 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 1—13, где указанный вариант полипептида LukA дополнительно предусматривает аминокислотную замену по одному или более

аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

5 [00229] В варианте осуществления 15 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 14, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Tyr74, предусматривает замену тирозина на цистеин (Tyr74Cys).

10 [00230] В варианте осуществления 16 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 14 или варианту осуществления 15, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Asp140, предусматривает замену аспарагина на цистеин (Asp140Cys).

[00231] В варианте осуществления 17 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 14—16, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Gly149, предусматривает замену глицина на цистеин (Gly149Cys).

15 [00232] В варианте осуществления 18 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 14—17, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Gly156, предусматривает замену глицина на цистеин (Gly156Cys).

20 [00233] В варианте осуществления 19 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 14—18, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

25 [00234] В варианте осуществления 20 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 14, где указанный вариант представляет собой вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 1, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Glu320Ala, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys и Gly153Cys в последовательности под SEQ ID NO: 1.

30 [00235] В варианте осуществления 21 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 20, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

[00236] В варианте осуществления 22 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 14, где указанный вариант представляет собой вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 2, который предусматривает аминокислотные замены,

которые соответствуют Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Glu321Ala, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys и Gly154Cys в последовательности под SEQ ID NO: 2.

5 [00237] В варианте осуществления 23 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 22, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

10 [00238] В варианте осуществления 24 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 1—23, где указанный вариант полипептида LukA дополнительно предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[00239] В варианте осуществления 25 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 24, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Thr249, предусматривает замену треонина на валин (Thr249Val).

15 [00240] В варианте осуществления 26 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 25, где указанный вариант белка LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

20 [00241] В варианте осуществления 27 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 1—26, дополнительно содержащий аминоконцевую сигнальную последовательность.

[00242] В варианте осуществления 28 предусмотрен вариант полипептида LukA по варианту осуществления 27, где аминоконцевая сигнальная последовательность предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23.

25 [00243] В варианте осуществления 29 предусмотрен вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 1—28, дополнительно содержащий аминоконцевую последовательность для очистки.

[00244] В варианте осуществления 30 предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 1—29.

30 [00245] В варианте осуществления 31 предусмотрен вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 30.

[00246] В варианте осуществления 32 предусмотрена клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по варианту осуществления 31.

[00247] В варианте осуществления 33 предусмотрен вариант белка или полипептида, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB) *Staphylococcus aureus*, под SEQ ID NO: 39, при этом указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Val53 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

[00248] В варианте осуществления 34 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 33, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Val53, предусматривает замену валина на лейцин (Val53Leu).

[00249] В варианте осуществления 35 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 33, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, который предусматривает аминокислотную замену, которая соответствует Val53Leu в последовательности под SEQ ID NO: 15.

[00250] В варианте осуществления 36 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 35, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17.

[00251] В варианте осуществления 37 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 33, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, который предусматривает аминокислотную замену, которая соответствует Val53Leu в последовательности под SEQ ID NO: 16.

[00252] В варианте осуществления 38 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 37, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

[00253] В варианте осуществления 39 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 33 или варианту осуществления 34, где указанный вариант дополнительно предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

[00254] В варианте осуществления 40 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 39, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Glu45, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин (Glu45Cys).

[00255] В варианте осуществления 41 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 39 или варианту осуществления 40, где аминокислотная

замена по аминокислотному остатку, который соответствует Glu109, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин (Glu109Cys).

5 [00256] В варианте осуществления 42 предусмотрен вариант полипептида LukB по любому из вариантов осуществления 39—41, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Thr121, предусматривает замену треонина на цистеин (Thr121Cys).

10 [00257] В варианте осуществления 43 предусмотрен вариант полипептида LukB по любому из вариантов осуществления 39—42, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Arg154, предусматривает замену аргинина на цистеин (Arg154Cys).

15 [00258] В варианте осуществления 44 предусмотрен вариант полипептида LukB по любому из вариантов осуществления 39—43, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

20 [00259] В варианте осуществления 45 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 39, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Val53Leu, Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys в последовательности под SEQ ID NO: 15.

[00260] В варианте осуществления 46 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 45, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19.

25 [00261] В варианте осуществления 47 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 39, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Val53Leu, Glu45Cys, Glu110Cys, Thr123Cys и Arg155Cys в последовательности под SEQ ID NO: 16.

30 [00262] В варианте осуществления 48 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 47, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

[00263] В варианте осуществления 49 предусмотрен вариант белка или полипептида, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB) *Staphylococcus aureus*, под SEQ ID NO: 39, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает

аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

[00264] В варианте осуществления 50 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 49, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Glu45, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин (Glu45Cys), а аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Thr121, предусматривает замену треонина на цистеин (Thr121Cys).

[00265] В варианте осуществления 51 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 49 или варианту осуществления 50, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Glu109, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин (Glu109Cys), а аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Arg154, предусматривает замену аргинина на цистеин (Arg154Cys).

[00266] В варианте осуществления 52 предусмотрен вариант полипептида LukB по любому из вариантов осуществления 49—51, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

[00267] В варианте осуществления 53 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 52, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys в последовательности под SEQ ID NO: 15.

[00268] В варианте осуществления 54 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 53, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21.

[00269] В варианте осуществления 55 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 52, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Glu45Cys, Glu110Cys, Thr123Cys и Arg155Cys в последовательности под SEQ ID NO: 16.

[00270] В варианте осуществления 56 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 55, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

5 **[00271]** В варианте осуществления 57 предусмотрен вариант полипептида LukB по любому из вариантов осуществления 33—56, дополнительно содержащий аминоконцевую сигнальную последовательность.

[00272] В варианте осуществления 58 предусмотрен вариант полипептида LukB по варианту осуществления 57, где аминоконцевая сигнальная последовательность предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23.

10 **[00273]** В варианте осуществления 59 предусмотрен вариант полипептида LukB по любому из вариантов осуществления 33—58, дополнительно содержащий аминоконцевую метку для очистки.

[00274] В варианте осуществления 60 предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант полипептида LukB по любому из вариантов
15 осуществления 33—59.

[00275] В варианте осуществления 61 предусмотрен вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 60.

[00276] В варианте осуществления 62 предусмотрен вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 30,
20 функционально связанную с молекулой нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 60.

[00277] В варианте осуществления 63 предусмотрен вектор экспрессии по варианту осуществления 62, содержащий нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%,
25 по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 55 (вариант LukA из CC45), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с
30 нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 59 (LukB из CC45).

[00278] В варианте осуществления 64 предусмотрен вектор экспрессии по варианту осуществления 62, содержащий нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с

нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 55 (вариант LukA из CC45), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 61 (вариант LukB из CC45).

[00279] В варианте осуществления 65 предусмотрен вектор экспрессии по варианту осуществления 62, содержащий нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 54 (вариант LukA из CC8), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 58 (LukB из CC8).

[00280] В варианте осуществления 66 предусмотрен вектор экспрессии по варианту осуществления 62, содержащий нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 54 (вариант LukA из CC8), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 61 (вариант LukB из CC45).

[00281] В варианте осуществления 67 предусмотрен вектор экспрессии по варианту осуществления 62, содержащий нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 54 (вариант LukA из CC8), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 60 (вариант LukB из CC8).

[00282] В варианте осуществления 68 предусмотрена клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по любому из вариантов осуществления 61—67.

[00283] В варианте осуществления 69 предусмотрена вакцинная композиция против *Staphylococcus aureus*, содержащая вектор экспрессии по любому из вариантов осуществления 61—67.

5 **[00284]** В варианте осуществления 70 предусмотрена вакцинная композиция против *Staphylococcus aureus*, содержащая один или более вариантов полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 1—29.

[00285] В варианте осуществления 71 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 70, где вариант полипептида LukA представляет собой вариант под SEQ ID NO: 1.

10 **[00286]** В варианте осуществления 72 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 70 или варианту осуществления 71, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB), где указанные белок или полипептид LukB характеризуются по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID
15 NO: 15.

[00287] В варианте осуществления 73 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 70 или варианту осуществления 71, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB), где указанные белок или полипептид LukB характеризуются по меньшей мере 85%
20 сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

[00288] В варианте осуществления 74 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 73, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые
25 соответствуют аминокислотным остаткам Lys80, Ser138, Val110, Val190 и Glu320Ala в последовательности под SEQ ID NO: 1.

[00289] В варианте осуществления 75 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 74, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%
30 идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3, а полипептид LukB предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 18.

[00290] В варианте осуществления 76 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 74, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, а полипептид LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:18.

5 **[00291]** В варианте осуществления 77 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 74, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

10 **[00292]** В варианте осуществления 78 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 74, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

15 **[00293]** В варианте осуществления 79 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 70, где вариант полипептида LukA представляет собой вариант под SEQ ID NO: 2.

20 **[00294]** В варианте осуществления 80 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 79, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB), где указанные белок или полипептид LukB характеризуются по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

25 **[00295]** В варианте осуществления 81 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 79, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB), где указанные белок или полипептид LukB характеризуются по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 15.

30 **[00296]** В варианте осуществления 82 предусмотрена вакцинная композиция по любому из вариантов осуществления 79—81, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys81, Ser139, Val111, Val191 и Glu321Ala в последовательности под SEQ ID NO: 2.

[00297] В варианте осуществления 83 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 82, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ

ID NO: 4, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:16.

[00298] В варианте осуществления 84 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 82, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:16.

[00299] В варианте осуществления 85 предусмотрена вакцинная композиция против *Staphylococcus aureus*, содержащая один или более вариантов белка или полипептида LukB по любому из вариантов осуществления 33—56.

[00300] В варианте осуществления 86 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 85, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин А (LukA), где указанные белок или полипептид LukA характеризуются по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1 (CC8).

[00301] В варианте осуществления 87 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 85, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин А (LukA), где указанные белок или полипептид LukA характеризуются по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2 (CC45).

[00302] В варианте осуществления 88 предусмотрена вакцинная композиция против *Staphylococcus aureus*, содержащая вариант полипептида LukA по любому из вариантов осуществления 1—32, и вариант полипептида LukB по любому из вариантов осуществления 33—56.

[00303] В варианте осуществления 89 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 74, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:15.

[00304] В варианте осуществления 90 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 74, где вариант полипептида LukA предусматривает

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15.

[00305] В варианте осуществления 91 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 74, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:17.

[00306] В варианте осуществления 92 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 74, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17.

[00307] В варианте осуществления 93 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 74, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:18.

[00308] В варианте осуществления 94 предусмотрена вакцинная композиция по варианту осуществления 74, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

[00309] В варианте осуществления 95 предусмотрена вакцинная композиция по любому из вариантов осуществления 64—69—94, дополнительно содержащая адъювант.

[00310] В варианте осуществления 96 предусмотрена вакцинная композиция по любому из вариантов осуществления 69—94, содержащая один или более дополнительных антигенов *S. aureus*.

[00311] В варианте осуществления 97 предусмотрен способ обеспечения генерирования иммунного ответа на *S. aureus* у субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту вакцинной композиции по любому из вариантов

осуществления 69—94 при условиях, эффективных для генерирования указанного иммунного ответа на *S. aureus* у указанного субъекта.

[00312] В варианте осуществления 98 предусмотрена вакцинная композиция по любому из вариантов осуществления 66—94 для применения в способе обеспечения генерирования иммунного ответа на *S. aureus* у субъекта.

ПРИМЕРЫ

[00313] Следующие примеры предусмотрены для иллюстрации вариантов осуществления настоящего изобретения, но ни в коем случае не предназначены для ограничения его объема.

Пример 1. Иллюстративные варианты полипептида LukA, варианты полипептида LukB и стабильные комплексы LukAB

[00314] Для экспрессии гетеродимерных белков LukAB клетки *E. coli* BL21(DE3) контрансформировали конструкцией *lukA*, клонированной в pCDFDuet-1, и конструкцией *lukB*, клонированной в pETDuet-1. Трансформанты культивировали в 50 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл спектиномицина для отбора в отношении pETDuet-1 и pCDFDuet-1, соответственно, в бульоне Лурии-Бертани при 37°C со встряхиванием при 190 об./мин. в течение ночи. Для экспрессии свежую среду Terrific Broth инокулировали разбавлением 1:50 ночной культуры при 37°C со встряхиванием при 190 об./мин. до достижения культурами OD₆₀₀ = 2. Затем индуцировали экспрессию путем добавления изопропил-β-d-1-тиогалактопиранозида до конечной концентрации 1 mM и индукцию продолжали при 37°C в течение дополнительных 5 часов. В случае экспрессии гетеродимеров LukAB, которые предусматривали пары цистеиновых замен в LukA и/или LukB, экспрессию осуществляли в цитоплазме клеток *E. coli* Origami 2(DE3) для способствования образованию дисульфидных связей. Экспрессию мономеров LukA в периплазме *E. coli* BL21(DE3) осуществляли путем трансформации конструкций *lukA* в pD861-CH с индукцией в Terrific Broth (с добавлением 30 мкг/мл канамицина) с использованием рамнозы при конечной концентрации, составляющей 4 mM, при 37°C в течение 4 часов. После индукции как цитоплазматических, так и периплазматических конструкций экспрессии клетки собирали путем центрифугирования при 4000 об./мин. при 4°C в течение 15 мин. и затем ресуспендировали в буфере для лизиса (94% Bugbuster [EMD Millipore] + 6% 5 M NaCl + 0,4% 4 M имидазола + смесь ингибиторов протеазы [ProteaseArrest, G-Biosciences]). После лизиса при комнатной температуре в течение 20 минут лизаты инкубировали на льду в течение 45 минут, а затем центрифугировали при 16100 x g, 4°C в течение

35 минут. Белки очищали с помощью 6xHis-метки на N-конце LukA с использованием колонок AKTA Pure 25M FPLC и HisTrap и элюировали с помощью градиента имидазола (50—500 мМ имидазола в 50 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7,4, 200 мМ NaCl). Фракции, содержащие очищенный белок, как определено с помощью SDS-
5 PAGE, объединяли и подвергали диализу в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, 200 мМ NaCl, 10% глицерине при 4°C в течение ночи. Количественное определение очищенных белков осуществляли с помощью анализа белка с бикарбонатовой кислотой (BCA) (Pierce).

Таблица 4. Иллюстративные LukA, LukB и гетеродимерные комплексы LukAB, используемые в исследованиях, описанных в данном документе

Название анатоксина/ токсина	LukA	Замены в LukA	SEQ ID NO:	LukB	Замены в LukB	SEQ ID NO:
RARPR-013	CC45 W94	E321A, Lys81Leu, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile	11	CC45	Отсутствуют	16
RARPR-015	CC45 W95	E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile	4	CC45	Отсутствуют	16
RARPR-017	CC45 W96	E321A, Lys81Leu, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val	12	CC45	Отсутствуют	16
RARPR-019	CC45 W97	E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val	8	CC45	Отсутствуют	16
RARPR-30	CC45 W95	E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile	4	CC45	Val53Leu	18
RARPR-31	CC8 W95	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile	3	Отсутствует		
RARPR-32	CC8 W95	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile	3	CC8	Отсутствуют	15
RARPR-33	CC8 W95	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile	3	CC45	Val53Leu	18
RARPR-34	CC8 W95	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile	3	CC8	Val53Leu	17
Мономер LukA	CC8 W97 W72	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Thr246Val, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	9	Отсутствует		
Мономер LukA	CC45 W97 W72	E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys	10	Отсутствует		
	CC8 W95 W72	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	5	CC45	Отсутствуют	16

Название анатоксина/токсина	LukA	Замены в LukA	SEQ ID NO:	LukB	Замены в LukB	SEQ ID NO:
	CC8 W95 W72	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	5	CC45	Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys	22
	CC8 W95 W72	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	5	CC45	Val53Leu	18
	CC8 W95 W72	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	5	CC45	Val53Leu, Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys	20
CC8delta10	CC8	Делеция С-концевых остатков 312—321	64	CC8	Отсутствуют	15
CC45delta10	CC45	Делеция С-концевых остатков 313—322	65	CC45	Отсутствуют	16
Токсин из CC8	CC8	Отсутствуют	1	CC8	Отсутствуют	15
Токсин из CC45	CC45	Отсутствуют	2	CC45	Отсутствуют	16

Пример 2. Цитотоксичность анатоксинов дикого типа, LukA и LukAB

[00315] Цитотоксичность белков, которые представляют собой анатоксины на основе LukAB (как определено в таблице 4), оценивали по сравнению с токсином LukAB дикого типа, используя промоноцитарную линию клеток ТНР-1 или свежeweделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (hPMN).

[00316] Дифференцирование клеток ТНР-1 обеспечивали в присутствии фобол-12-миристан-13-ацетата перед тестированием в отношении цитотоксичности. Для анализов цитотоксичности ТНР-1 в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли в целом 1×10^5 клеток в 50 мкл RPMI. Белки, представляющие собой токсины LukAB и анатоксины на их основе, регулировали до стандартной концентрации белка, последовательно разводили в ледяной среде RPMI и объемы каждого, составляющие 50 мкл, добавляли в соответствующие лунки. В дополнение к отрицательным контролям, представляющим собой отдельно RPMI, в качестве положительного контроля добавляли Triton X-100 до конечной концентрации 0,1%. Планшеты

инкубировали в течение 2 часов при 37°C, 5% CO₂ до оценки высвобождения цитоплазматического фермента лактатдегидрогеназы, который служил маркером целостности мембраны, с помощью анализа CytoTox-ONE (Promega).

[00317] Цитотоксичность анатоксинов LukA и LukAB в отношении дифференцированных клеток THP-1 представлена в таблице 5 ниже. Дифференцированные клетки THP-1 были чувствительны к токсинам дикого типа, так как токсины дикого типа, представляющие собой LukAB как из CC8, так и из CC45, уничтожали 30% или более популяции клеток при низких концентрациях токсинов, как 0,313 мкг/мл. Делеция последних 10 аминокислотных остатков на С-конце LukA (delta10) уменьшала цитотоксичность токсина CC8delta10 до уровня, отвечающего гибели менее 5% клеток, при 40 мкг/мл, но не уменьшала цитотоксичность токсина CC45delta10 в отношении дифференцированных клеток THP-1. Ни один из мономеров LukA не характеризовался цитотоксичностью в отношении дифференцированных клеток THP-1. Этот результат был ожидаемым, так как LukA не должен образовывать активный комплекс пор в отсутствие LukB. Каждый из димерных анатоксинов LukAB, включая RARPR-33, RARPR-34 и RARPR-15, характеризовался заметно сниженной цитотоксичностью в отношении дифференцированных клеток THP-1, при этом показатель гибели клеток находился на уровне 1% или менее для каждого из протестированных анатоксинов при самой высокой тестируемой концентрации, составляющей 40 мкг/мл.

Таблица 5. Цитотоксичность белков LukA или LukAB в отношении дифференцированных клеток THP-1, линии клеток моноцитов человека, с использованием стандартизированного количества токсина. Данные представлены как процент мертвых клеток.

Анатоксин/токсин	Концентрация LukAB (мкг/мл)											
	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,04	0,02
RARPR-15	-12	-12	-12	-14	-14	-15	-10	-14	-12	-11	-9	-7
RARPR-30	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RARPR-31	0	0	-1	0	0	0	-1	-1	0	0	-1	-1
RARPR-32	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
RARPR-33	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
RARPR-34	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
CC8 LukA W97 (мономер)	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
CC45 LukA W97 (мономер)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
CC8delta10	4	3	1	1	0	0	0	0	0	-1	0	0
CC45delta10	53	39	32	31	33	41	54	55	53	35	13	5
Токсин из CC8	41	44	43	39	39	38	37	30	15	6	2	1

Токсин из CC45	42	34	31	34	40	46	46	36	18	4	1	0
----------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---	---	---

[00318] Для hPMN перед интоксикацией все токсины нормализовали до 2,5 мкг/мл (на субъединицу), а затем пипеткой вносили 20 мкл токсина в верхние лунки 96-луночного планшета и серийно разбавляли в 2 раза в 10 мкл 1X PBS. PMN выделяли и нормализовали до 200000 клеток на 90 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). Затем пипеткой вносили 90 мкл PMN в каждую лунку и смесь токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 1 часа. Для оценки токсичности в 96-луночный планшет добавляли 10 мкл раствора CellTiter 96 Aqueous One (CellTiter; Promega) и смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 1,5 часа. Жизнеспособность PMN оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader по поглощению при длине волны 492 нм.

[00319] Цитотоксичность мономеров LukA и димерных анатоксинов LukAB в отношении первичных клеток PMN человека представлена в таблице 6 ниже. Токсины дикого типа из CC8 и CC45 характеризовались более 90% уничтожением первичных PMN человека при концентрациях токсина 0,313 мкг/мл и 1,25 мкг/мл соответственно. Для сравнения — цитотоксичность каждого из анатоксинов LukAB и мономеров LukA была значительно снижена по отношению к этим клеткам. В случае делеции 10 С-концевых остатков в LukA из CC8 цитотоксичность в отношении дифференцированных клеток THP-1 фактически исчезала, в то время как этот токсин сохранял цитотоксичность в отношении hPMN, причем в концентрациях, составляющих 5 мкг/мл или более, наблюдалось уничтожение на уровне более 20%. Мономеры LukA из CC8 и CC45 характеризовались незначительной цитотоксичностью в отношении hPMN, как и ожидалось для анатоксинов, лишенных компонента LukB, критически важного для образования активного комплекса пор. Каждый из димерных анатоксинов LukAB характеризовался заметно сниженной цитотоксичностью в отношении клеток hPMN по сравнению с токсинами LukAB дикого типа из CC8 и CC45. Анатоксин LukAB RARPR-33, а также родственные анатоксины RARPR-32 и -34 характеризовались меньшей цитотоксичностью, чем CC8delta10, причем RARPR-33 уничтожал только 15% популяции клеток при самой высокой тестируемой концентрации, составляющей 20 мкг/мл.

Таблица 6. Цитотоксичность белков LukA или LukAB в отношении первичных полиморфноядерных лейкоцитов человека при использовании стандартизированного количества токсина. Данные представлены как процент мертвых клеток.

Анатоксин/токсин	Концентрация LukAB (мкг/мл)										
	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,04	0,02
RARPR-15	42	36	31	20	14	11	11	11	6	10	11
RARPR-30	27	17	14	10	5	0	0	0	0	0	0
RARPR-31	12	2	1	0	0	3	0	0	0	0	0
RARPR-32	17	6	4	4	2	1	0	0	0	0	0
RARPR-33	15	8	6	3	1	0	0	0	0	0	0
RARPR-34	16	9	5	3	0	0	0	0	0	0	0
CC8 LukA W97 (мономер)	5	3	2	1	2	1	1	2	0	2	1
CC45 LukA W97 (мономер)	7	6	2	3	4	1	0	1	2	0	0
CC8delta10	29	26	22	18	11	11	4	4	3	4	3
Токсин из CC8	93	96	97	96	97	93	90	87	75	52	29
Токсин из CC45	97	97	97	97	96	85	72	57	49	30	19

Пример 3. Цитотоксичность анатоксинов LukAB RARPR-33 и других вариантов токсинов LukAB WT

[00320] Проводили дополнительный эксперимент для оценки цитотоксичности и иммуногенности RARPR-33 и различных вариантов токсина LukAB WT и мономеров LukA. Для исследований иммуногенности использовали мышей.

[00321] Цитотоксичность LukAB токсинов, анатоксинов и мономеров оценивали на PMN человека. Перед интоксикацией все токсины нормализовали до 100 мкг/мл (на субъединицу), а затем пипеткой вносили 20 мкл токсина в верхние лунки 96-луночного планшета и серийно разбавляли в 2 раза в 10 мкл 1X PBS. PMN выделяли от различных доноров и нормализовали до 200000 клеток на 90 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). Пипеткой вносили 90 мкл PMN в каждую лунку и смесь токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 1 часа. Для оценки токсичности в 96-луночный планшет добавляли 10 мкл раствора CellTiter 96 Aqueous One (CellTiter; Promega) и смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 1,5 часа. Жизнеспособность PMN оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader по поглощению при длине волны 492 нм. Процент мертвых клеток рассчитывали путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X100, которые принимают за 100% мертвых.

[00322] Цитотоксичность мономеров LukA и токсинов LukAB в отношении первичных клеток PMN человека представлена на ФИГ. 3. Токсины LukAB дикого типа из CC8 и CC45 характеризовались более 90% уничтожением первичных PMN человека при концентрациях токсина 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно. Максимальное уничтожение также наблюдалось для гибридных токсинов LukAB CC8/CC45 и CC45/CC8 при 2,5 мкг/мл. Для сравнения — цитотоксичность анатоксинов LukAB и мономеров LukA была значительно снижена по отношению к этим клеткам. В случае делеции 10 С-концевых остатков в LukA из CC8 цитотоксичность в отношении hPMN сохранялась, причем в концентрациях, составляющих 5 мкг/мл или более, наблюдалось уничтожение на уровне более 20%. Момеры LukA из CC8 и CC45, а также комбинация этих мономеров характеризовались незначительной цитотоксичностью в отношении hPMN. Анатоксин LukAB RARPR-33 характеризовался меньшей цитотоксичностью, чем CC8Δ10C, причем RARPR-33 уничтожал только 15% популяции клеток при самой высокой тестируемой концентрации, составляющей 20 мкг/мл.

Пример 4. Иммуногенность у мышей

[00323] Для определения иммуногенности различных вариантов LukAB мышам Envigo Hsd:ND4 (в возрасте 4 недели) (n = 5/антиген) подкожно вводили 20 мкг LukAB в 50 мкл 10% глицерина 1X TBS, смешанного с 50 мкл адъюванта TiterMax® Gold. Когорта из 5 мышей также получала иммунизацию имитационным контролем, который состоял из равных объемов 10% глицерина 1X TBS и TiterMax® Gold. После двух бустерных введений одного и того же коктейля антиген-адъювант с интервалом в две недели у мышей брали кровь с помощью сердечной пункции и получали сыворотку крови.

[00324] Для определения титра антител к LukAB проводили ELISA. LukAB из CC8 или CC45 WT разводили до 2 мкг/мл в 1X PBS и наносили 100 мкл на 96-луночные планшеты Immulon 2HB (Thermo Fisher, кат. № 3455) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем планшеты промывали 3X буфером для промывания (1X PBS + 0,05% Tween) и затем блокировали с помощью 200 мкл блокирующего буфера (2,5% молока в 1X PBS) в течение 1 ч. Получали пятикратные серийные разведения, начиная с 1:500, сыворотки крови в блокирующем буфере и обеспечивали их инкубацию на шейкере в течение 1 ч. Затем планшеты снова промывали 3X и добавляли антитело, представляющее собой IgG-HRP мыши (Biorad), разведенное в соотношении 1:5000 в блокирующем буфере, и инкубировали в течение 1 ч. при комнатной температуре.

Несвязанное вторичное антитело промывали в трех последовательных промывках буфером для промывки. В каждую лунку добавляли ТМВ (100 мкл), нагретый до комнатной температуры, и инкубировали под крышкой в течение 25 мин. После завершения реакции в каждую реакционную лунку добавляли равное количество 2 н. серной кислоты, чтобы остановить реакцию. Затем планшеты считывали на устройстве для считывания планшетов Envision по поглощению при длине волны 450 нм. Тепловые карты, изображенные на фигурах 4А и 4В, показывают средние значения поглощения из повторных измерений, где черным цветом обозначено высокое поглощение и связывание антител с покрывающим антигеном, а белым обозначено низкое поглощение и отсутствие связывания антител.

[00325] RARPR-33 вызывала возникновение устойчивых титров антител, которые представляли собой IgG к LukAB из CC8 и CC45 (фиг. 4А и фиг. 4В). Иммунизация с помощью RARPR-33 вызывала ответы в виде антитела, представляющего собой IgG к CC8, сопоставимые с иммунизацией токсином из CC8 WT, гибридным токсином CC8/CC45 и анатоксином CC8Δ10C. Титры IgG к LukAB из CC8, индуцированные отдельным мономером LukA из CC8, были не такими высокими, как титры, индуцированные токсином LukAB из CC8 или гибридным токсином CC8/CC45, гибридным токсином CC45/CC8 и гибридными антигенами RARPR 33 (ФИГ. 4А).

[00326] Титры антитела к LukAB из CC45 у мышей, иммунизированных с помощью RARPR-33, были выше, чем титры, вызванные гибридным антигеном CC8/CC45 WT, и были на одном уровне с титрами, вызванными антигеном из CC45 WT. Комбинирование мономеров LukA из CC8 и CC45 вызвало образование титров антител к LukAB как из CC8, так и из CC45 (ФИГ. 4В). Однако эти титры антител к LukAB из CC8 и CC45, вызванные объединенными мономерами LukA из CC8 и CC45, были не такими высокими, как титры, вызванные RARPR 33. Отдельный мономер LukA из CC45 вызывает образование очень высоких титров антитела к LukAB из CC45, которые схожи с уровнями, вызванными гибридом CC45/CC8, и лишь немного ниже, чем уровни, вызванные RARPR-33 или токсином из CC45 WT. Эти результаты показывают, что при иммунизации с помощью RARPR-33 индуцируются реакции в виде антител к LukAB как из CC8, так и из CC45, которые характеризуются высоким значением.

Пример 5. Опосредованная антителом нейтрализация цитотоксичности токсина

[00327] Опосредованную антителом нейтрализацию цитотоксичности токсина оценивали с использованием сыворотки крови, полученной от мышей, иммунизированных, как описано выше в примере 4. Объединенные образцы сыворотки крови, инаktivированные нагреванием, нормализовали до 40% сыворотки крови в PBS, а затем пипеткой вносили 20 мкл сыворотки крови в верхние лунки 96-луночного планшета и серийно разводили в 2 раза в 10 мкл 1X PBS. LD₉₀ каждого из вариантов последовательности клонального комплекса токсина LukAB добавляли в планшет (10 мкл/лунка) на 15 мин. при комнатной температуре. Свежевыделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (hPMN), нормализованные до 200000 клеток на 80 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA), затем добавляли к смеси сыворотки крови и токсина и инкубировали в течение 1 ч. при 37°C + 5% CO₂. Для оценки токсичности в 96-луночный планшет добавляли 10 мкл раствора CellTiter 96 Aqueous One (CellTiter; Promega) и смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 1,5 часа. Жизнеспособность PMN оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader по поглощению при длине волны 492 нм. Данные по нейтрализации антител представлены на ФИГ. 5.

[00328] Образцы сыворотки крови от мышей, иммунизированных с помощью RARPR-33, проявили наиболее эффективную LukAB-нейтрализующую способность широкого спектра действия для всех антигенов (ФИГ. 5). Образцы сыворотки крови от мышей, иммунизированных с помощью RARPR 33, в значительной степени нейтрализовали цитотоксический эффект всех 11 протестированных вариантов LukAB уже при уровне 0,25% сыворотки крови, и для большинства вариантов LukAB также обеспечивали защиту уже при уровне 0,063—0,125% сыворотки крови (ФИГ. 5). Иммунизация отдельными мономерами LukA из CC8 и CC45 обеспечила получение образцов сыворотки крови с LukAB-нейтрализующей способностью, сильно смещенной к остову антигена (ФИГ. 5). Комбинация мономера LukA из CC8 с LukA из CC45, введенная из расчета 20 мкг каждого мономера (40 мкг общего белка) для каждой иммунизации, обеспечила получение образцов сыворотки крови с LukAB-нейтрализующей способностью, которая характеризовалась как широким спектром действия, так и эффективностью, обеспечивая нейтрализацию всех протестированных 11 вариантов LukAB уже при уровне 0,5% сыворотки крови (ФИГ. 5), однако это ниже, чем наблюдалось в случае образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных с помощью RARPR-33.

[00329] В совокупности данные, представленные в примерах 3—5, показывают, что аттенуирующие и стабилизирующие мутации, включенные в остов LukAB из CC8/CC45 RARPR-33, обеспечивают улучшение в отношении широты спектра иммуногенных эффектов гибрида LukAB из CC8/CC45 WT (ФИГ. 4 и 5), одновременно также обеспечивая высокую степень аттенуации RARPR-33 по сравнению с токсином LukAB из CC8/CC45 WT (ФИГ. 3).

Пример 6. Нейтрализация токсинов, обеспечиваемая в образцах сыворотки крови с антителами

[00330] Опосредованную антителами нейтрализацию цитотоксичности токсина оценивали с использованием сыворотки крови, полученной от мышей, иммунизированных с помощью LukAB дикого типа, гибридами LukAB дикого типа (т. е. LukA из CC8/LukB из CC45 и LukA из CC45/LukB из CC8), мономерами LukA или анатоксинами LukAB. Объединенные образцы сыворотки крови, инактивированные нагреванием, нормализовали до 40% сыворотки крови в PBS, а затем пипеткой вносили 20 мкл сыворотки крови в верхние лунки 96-луночного планшета и серийно разводили в 2 раза в 10 мкл 1X PBS. Затем LD₉₀ каждого из вариантов последовательности клонального комплекса токсина LukAB добавляли в лунки планшета (10 мкл/лунка), который содержал 2%, 1% или 0,5% сыворотки крови, на 15 мин. при комнатной температуре. Свежевыделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (hPMN) от различных доноров, нормализованные до 200000 клеток на 80 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA), затем добавляли к смеси сыворотки крови и токсина и инкубировали в течение 1 ч. при 37°C + 5% CO₂. Для оценки токсичности в 96-луночный планшет добавляли 10 мкл раствора CellTiter 96 Aqueous One (CellTiter; Promega) и смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 1,5 часа. Жизнеспособность PMN оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader по поглощению при длине волны 492 нм. Данные по нейтрализации антител представлены в таблицах на ФИГ. 6А (2% сыворотки крови с антителами), ФИГ. 6В (1% сыворотки крови с антителами) и ФИГ. 6С (0,5% сыворотки крови с антителами).

[00331] Иммунизация с помощью LukAB дикого типа из CC8 и CC45 вызвала образование антител, которые нейтрализовали встречающиеся в природе варианты последовательностей токсинов LukAB с паттерном, отражающим состав последовательности антигена, которым осуществляли иммунизацию. Антитела, образование которых было вызвано токсином LukAB из CC8, эффективно

нейтрализовали токсины, полученные из CC8, CC1, CC5 и других линий *S. aureus*, но они не обеспечивали полной нейтрализации токсинов, полученных из CC30, CC45 или ST22A *S. aureus*. Аналогичным образом иммунизация токсином LukAB из CC45 вызвала образование антител, которые эффективно нейтрализовали токсины, полученные из линий CC30, CC45 или ST22A *S. aureus*, но не токсины, полученные из других линий.

[00332] Иммунизация мышей неестественным гибридом LukAB, либо LukA из CC8 в комбинации с LukB из CC45, либо LukA из CC45 в комбинации с LukB из CC8, вызвала образование антител, которые характеризовались более широким спектром нейтрализации вариантов последовательности LukAB по сравнению с встречающимися в природе комбинациями димеров. Из неестественных гибридных димеров LukA из CC8 и LukB из CC45 характеризовались несколько лучшим профилем нейтрализации, чем противоположная комбинация, а именно паттерн, который сохранялся в белках, которые характеризуются заменой Glu на Ala в предпоследнем остатке LukA (E323A). Как наблюдалось для образования антител к токсинам дикого типа, мономеры LukA вызывали образование антител, которые характеризовались паттерном нейтрализации, указывающим на составы их последовательности. Комбинация мономеров LukA из CC8 и LukA из CC45 (RARPR-31 + CC45 LukA W97) вызывала образование антител, которые характеризовались широким нейтрализующим паттерном, но эффективность нейтрализации была снижена по сравнению с димерными антигенами, о чем свидетельствует сниженный уровень нейтрализации в случае 1% или 0,5% образцов сыворотки крови.

[00333] Среди димерных анатоксинов RARPR-15, RARPR-33 и RARPR-34 демонстрировали ответ в виде нейтрализующих антител с широким спектром действия на все протестированные варианты последовательности LukAB. Неестественные комбинации димеров дикого типа также характеризовались широким профилем нейтрализации, хотя эффективность нейтрализующего ответа уступала той, которая наблюдалась для нескольких анатоксинов. Как гибридные антигены дикого типа, так и антигены, представляющие собой анатоксины, характеризовались широким нейтрализующим профилем при тестировании с использованием 2% (ФИГ. 6А) и 1% (ФИГ. 6В) образцов сыворотки крови, но улучшенная эффективность ответа на анатоксины была очевидна при тестировании с использованием 0,5% образцов сыворотки крови (ФИГ. 6С). При этой самой низкой протестированной концентрации каждый из RARPR-15, RARPR-32, RARPR-33 и RARPR-34 характеризовался

нейтрализующим ответом широкого спектра. RARPR-33, в частности, обеспечивал получение образцов сыворотки крови, которые сохраняли нейтрализующий ответ широкого спектра, тогда как гибридные антигены дикого типа и анатоксины E323A не вызывали ответа с широким спектром защиты при использовании 0,5% образцов сыворотки крови, а паттерн нейтрализации, вызванной анатоксином из CC45 RARPR-15 при самой низкой протестированной концентрации, отражал состав его последовательности, поскольку высокие уровни нейтрализации наблюдались только для токсинов LukAB из CC30, CC45 и ST22A. Гибридный димерный анатоксин RARPR-33 вызвал нейтрализующий иммунный ответ, который характеризовался эффективностью и широким спектром действия.

Пример 7. Цитотоксичность RARPR-33 при высоких концентрациях

Способы

[00334] Анализ цитотоксичности. Для оценки цитотоксичности каждого соответствующего белкового комплекса LukAB свежевыделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (PMN) подвергали интоксикации токсинами *S. aureus*. PMN выделяли от различных доноров и нормализовали до 200000 клеток на 50 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). К клеткам добавляли 50 мкл токсина в PBS и смесь токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 1 ч. Для оценки токсичности в 96-луночный планшет добавляли 10 мкл раствора CellTiter 96 Aqueous One (CellTiter; Promega) и смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 1,5 ч. Жизнеспособность PMN оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader по поглощению при длине волны 492 нм. % мертвых клеток рассчитывают путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X, которые принимают за 100% мертвых.

[00335] Анализ на основе выявления LDH. Чтобы оценить, может ли каждый соответствующий белковый комплекс LukAB вызывать лизис клеток, свежевыделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (PMN) от разных доноров подвергали интоксикации токсинами, представляющими собой LukAB *S. aureus*, и измеряли высвобождение LDH. Токсины WT серийно разводили в 2 раза в PBS и тестировали в концентрациях, находящихся в диапазоне 5—0,0024 мкг/мл. Анатоксины LukAB разводили в PBS и тестировали при концентрациях 2,5, 2, 1, 1,5 и 0,5 мг/мл. PMN выделяли и нормализовали до 200000 клеток на 50 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). Затем 50 мкл PMN пипеткой вносили в каждую лунку и

добавляли 50 мкл разведенного токсина на лунку. Смесь токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 2 ч. Для оценки высвобождения LDH планшеты центрифугировали при 1500 об./мин. в течение 5 мин., затем 25 мкл супернатанта удаляли из каждой лунки и переносили в 96-луночные черные планшеты с прозрачным дном. 25 мкл реагента для определения равномерной целостности мембран CytoTox-ONE (Promega) добавляли в черный 96-луночный планшет с прозрачным дном и смесь инкубировали в течение 10 мин. при комнатной температуре в темноте. Лизис клеток оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader путем регистрации флуоресценции с длиной волны возбуждения 560 нм и длиной волны испускания 590 нм. % мертвых клеток рассчитывали путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X, которые принимали за 100% мертвых.

Результаты

[00336] В предыдущих примерах цитотоксичность анатоксина LukAB RARPR-33 относительно hPMN определяли до концентрации 20 мкг/мл. Далее осуществляли мониторинг цитотоксичности в отношении PMN человека в присутствии более высоких концентраций (до 2,5 мг/мл) RARPR-33. Максимальная цитотоксичность в отношении PMN человека (4—6 доноров) на основе измерений с помощью CellTiter наблюдалась для токсинов LukAB из CC8 WT, CC45 и CC8/CC45 после 1-часовой интоксикации с помощью приблизительно 0,156 мкг/мл токсина (ФИГ. 7А). Для RARPR-33 и мономера LukA из CC8 процент мертвых клеток, измеренный с помощью CellTiter, составлял приблизительно 10% при концентрации 0,5 мг/мл (ФИГ. 7В). Инкубация PMN с RARPR-33 или мономером LukA из CC8 в концентрациях до 2,5 мг/мл не приводила к дальнейшему увеличению процента мертвых клеток, определенного с помощью измерений с использованием CellTiter.

[00337] С помощью значения LD₁₅ обозначают концентрацию антигена, которая вызывает гибель 15% клеток. LD₁₅ определяли с помощью линейной регрессии. Для LukAB из CC8 WT значение LD₁₅ составляло 0,013 мкг/мл, для LukAB из CC45 WT значение LD₁₅ составляло 0,004 мкг/мл, а для гибрида LukAB из CC8/CC45 значение LD₁₅ составляло 0,002 мкг/мл. Значение LD₁₅ для LukAB RARPR-33 составляло 2,5 мг/мл. Значения LD₁₅ сравнивали путем деления концентраций LD₁₅ RARPR-33 на концентрацию LD₁₅ антигенов WT. На основании этих наблюдений токсичность LukAB RARPR-33 в более чем 192308 раз меньше, чем у LukAB из CC8 WT, в более чем

625000 раз меньше, чем у LukAB из CC45 WT, и в более чем 1250000 раз меньше, чем у гибрида LukAB CC8/CC45.

[00338] Кроме того, проводили анализ на основе выявления LDH для оценки повреждения цитоплазматической мембраны после двух часов инкубации с различными токсинами WT, мономером LukA из CC8 или RARPR-33. Цитотоксичность в отношении PMN человека индуцировали через 2 часа после контакта с токсинами WT, CC8 WT, CC45 WT или гибридным токсином из CC8/CC45 (ФИГ. 7C). Максимальный уровень гибели клеток, определенный с помощью LDH, наблюдался при концентрации 0,625 мкг/мл токсина. Напротив, не наблюдалось повреждение цитоплазматической мембраны PMN человека после двух часов контакта с RARPR-33 или мономером LukA из CC8 при концентрациях до 2,5 мг/мл (ФИГ. 7D). Эти данные показывают, что RARPR-33 теряет токсические свойства и не способен индуцировать гибель клеток PMN человека при концентрациях до 2,5 мг/мл. Мутации, включенные в остов LukAB из CC8/CC45 RARPR-33, обеспечивали высокую степень аттенуации цитотоксичности по сравнению с токсином LukAB из CC8/CC45 WT.

Пример 8. Сравнение RARPR-33 и анатоксина D39A/R23E

[00339] Получали анатоксин LukAB на основе остова CC8, в котором LukA характеризуется наличием мутации D39A, а LukB характеризуется наличием точечной мутации R23E. Этот «анатоксин D39A/R23E» описан в работе Kailasan, S. et al, «Rational Design of Toxoid Vaccine Candidates for *Staphylococcus aureus* Leukocidin AB (LukAB)», *Toxins* 11(6): (2019), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Этот анатоксин получали на остове LukAB из CC8, и согласно описанию его токсичность была аттенуирована в более чем 36000 раз по сравнению с токсином LukAB из CC8 WT. Цитотоксичность определяли с использованием линии клеток HL-60, дифференцированной с обеспечением сходства с PMN. В настоящем эксперименте проводили сравнение между анатоксином D39A/R23E и RARPR-33. Определяли цитотоксичность в отношении полиморфноядерных лейкоцитов человека (PMN) и оценивали способность индуцировать токсин-нейтрализующие антитела с широким спектром действия после иммунизации.

Способы

[00340] Анализы цитотоксичности. Для оценки цитотоксичности каждого соответствующего белкового комплекса LukAB свежевыделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (PMN) от различных доноров подвергали

интоксикации токсинами *S. aureus*. PMN выделяли и нормализовали до 200000 клеток на 50 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). К клеткам добавляли 50 мкл токсина в PBS и смесь токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 2 ч. Для оценки токсичности в 96-луночный планшет добавляли 10 мкл раствора CellTiter 96 Aqueous One (CellTiter; Promega) и смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 1,5 ч. Жизнеспособность PMN оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader по поглощению при длине волны 492 нм. Процент мертвых клеток рассчитывают путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X, которые принимают за 100% мертвых.

[00341] Анализ на основе выявления LDH. Чтобы оценить, вызывает ли каждый соответствующий белковый комплекс LukAB лизис клеток, свежевыделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (PMN) от разных доноров подвергали интоксикации токсинами, представляющими собой LukAB *S. aureus*, и измеряли высвобождение LDH. Токсины WT серийно разводили в 2 раза в PBS и тестировали в концентрациях, находящихся в диапазоне 0,5 мкг/мл — 0,00024 мкг/мл. Анатоксины LukAB разводили в PBS до концентрации, находящейся в диапазоне от 1 мкг/мл до 0,03125 мкг/мл, и тестировали. PMN выделяли и нормализовали до 200000 клеток на 50 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). Затем PMN (50 мкл) пипеткой вносили в каждую лунку и добавляли 50 мкл разведенного токсина на лунку. Смеси токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 2 ч. Для оценки высвобождения LDH планшеты центрифугировали при 1500 об./мин. в течение 5 мин., затем 25 мкл супернатанта удаляли из каждой лунки и переносили в 96-луночные черные планшеты с прозрачным дном. 25 мкл реагента для определения равномерной целостности мембран CytoTox-ONE (Promega) добавляли в черный 96-луночный планшет с прозрачным дном и смесь инкубировали в течение 10 мин. при комнатной температуре в темноте. Лизис клеток оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader путем регистрации флуоресценции с длиной волны возбуждения 560 нм и длиной волны испускания 590 нм. Процент мертвых клеток рассчитывали путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X, которые принимали за 100% мертвых.

[00342] Иммунизации мышей. Мышам Envigo Hsd:ND4 (в возрасте 4 недели) (n = 5/антиген) подкожно вводили 20 мкг LukAB в 50 мкл 10% глицерина 1X TBS,

смешанного с 50 мкл адьюванта TiterMax® Gold. После двух бустерных введений одного и того же коктейля антиген/адьювант у мышей брали кровь с помощью сердечной пункции и получали сыворотку крови для исследований нейтрализации токсинов.

5 **[00343] Анализ нейтрализации токсинов.** Образцы сыворотки крови от иммунизированных мышей собирали из каждой группы и инаktivировали путем нагревания на водяной бане при 55°C в течение 30 мин. Затем объединенные образцы сыворотки крови, инаktivированные нагреванием, разбавляли до 40% PBS. Потом получали дальнейшие разведения образцов сыворотки крови путем серийного
10 разведения 40% исходных растворов в 2 раза в 10 мкл PBS в 96-луночном планшете. Токсин (10 мкл) добавляли в лунки с сывороткой крови в конечной концентрации 0,156 мкг/мл токсина (LD90). В каждую лунку добавляли 80 мкл hPMN в концентрации 200000 клеток в RPMI + 0,1% HSA + 10 mM HEPES. Затем планшеты инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 1 ч. После инкубации добавляли Cell Titer к
15 образцам, для которых была обеспечена интоксикация, и инкубировали в течение 1,5 ч. После инкубации планшеты затем считывали на устройстве для считывания планшетов при длине волны поглощения 492 нм. Проценты мертвых клеток рассчитывали путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X, которые принимают за 100% мертвых.

20 **Результаты**

[00344] Сообщалось, что цитотоксичность анатоксина D39A/R23E тестировали до приблизительно 12 мкг/мл. В данном документе цитотоксичность RARPR-33 и анатоксина D39A/R23E определяли в отношении PMN человека до концентрации 1 мг/мл. Кроме того, для сравнения были протестированы LukAB из CC8, CC45 и
25 CC8/CC45 WT. Максимальная цитотоксичность в отношении PMN человека на основе измерений с помощью CellTiter наблюдалась после 1-часовой интоксикации с помощью приблизительно 0,02 мкг/мл LukAB из CC8/CC45 WT, приблизительно 0,03 мкг/мл LukAB из CC8 и 0,125 мкг/мл LukAB из CC45 (ФИГ. 8A). Показано среднее значение для 5 доноров. Для анатоксина D39A/R23E при инкубации с 1 мг/мл наблюдалась
30 примерно 22% цитотоксичность. Для RARPR-33 процент мертвых клеток, измеренный с помощью CellTiter, составлял примерно 3% при концентрации 1 мг/мл (ФИГ. 8B).

[00345] Кроме того, проводили анализ на основе выявления LDH для оценки повреждения цитоплазматической мембраны после двух часов инкубации с различными токсинами WT, анатоксином D39A/R23E и RARPR-33. Цитотоксичность в

отношении PMN человека индуцировали через 2 часа после контакта с токсинами WT, CC8 WT, CC45 WT и гибридами, которые являются комбинацией токсинов из CC8/CC45 (ФИГ. 8С). Максимальный уровень гибели клеток, определенный с помощью LDH, наблюдался при концентрации токсина 0,25 мкг/мл токсина. После

5 контакта PMN человека с анатоксином D39A/R23E с концентрациями до 1 мг/мл в течение двух часов наблюдалась гибель примерно 8% клеток. При инкубации PMN человека с аналогичной концентрацией RARPR-33 не наблюдалось повреждения цитоплазматической мембраны, что указывает на отсутствие гибели клеток (ФИГ. 8D). Эти результаты указывают на то, что RARPR-33 является аттенуированной ниже

10 предела обнаружения в анализе и является более аттенуированной, чем анатоксин D39A/R23E.

[00346] Образцы сыворотки крови от мышей, иммунизированных с помощью RARPR-33 или анатоксином D39A/R23E, тестировали в анализе нейтрализации токсина для оценки способности образцов сыворотки крови предупреждать вызванную

15 токсинами гибель PMN-клеток человека. Нейтрализацию шестнадцати различных токсинов LukAB тестировали на PMN, выделенных от 4 доноров.

[00347] В присутствии 0,125% образцов сыворотки крови от иммунизированных с помощью RARPR 33 мышей цитотоксический эффект всех 16 протестированных вариантов LukAB был нейтрализован (ФИГ. 9). При аналогичной концентрации

20 сыворотки крови образцы сыворотки крови от мышей, иммунизированных анатоксином D39A/R23E, защищали лишь от цитотоксического эффекта LukAB из CC8 точно так же, как образцы сыворотки крови от мышей, иммунизированных с помощью RARPR-33. Против всех других токсинов не наблюдалось защиты или наблюдался значительно более низкий уровень защиты для образцов сыворотки крови, полученных

25 от мышей, иммунизированных анатоксином D39A/R23E. Эти результаты показывают, что иммунизация с помощью RARPR-33 вызвала ответ в виде нейтрализации токсинов, который характеризовался значительно более широким спектром действия, чем иммунизация анатоксином D39A/R23E.

Пример 9. Термическая стабилизация анатоксинов LukAB

[00348] Стабильность анатоксинов LukAB по сравнению с белком дикого типа оценивали с помощью экспериментов термического развертывания с использованием собственной флуоресценции триптофана или тирозина для оценки температуры плавления (Tm), соответствующей средней точке перехода белка из свернутого в

30 развернутое состояние. Термическую стабильность оценивали с помощью прибора

PromethiusNT.Plex от NanoTemper (NanoTemper Inc., Германия). Измерения термического разворачивания проводили на образцах белка в концентрации от 0,3 до 1 мг/мл (20 мкл, буфер: 50 мМ натрий-фосфатный буфер, 200 мМ NaCl, pH 7,4, 10% глицерин) в двух повторных анализах для каждого образца. Интерфейс пользователя Prometheus NanoDSF (вкладка Melting Scan) использовался для настройки экспериментальных параметров для цикла. Термические сканирования для типичного образца охватывают диапазон от 20°C до 95°C со скоростью 1,0°C/мин. Стандартное mAb (CNT05825 или NIST) в том же буфере, который использовался для образцов, включали в качестве контроля и анализы проводили в двух повторностях. Профили термического плавления анализировали с помощью программного обеспечения поставщика PR.ThermControl с определением температуры, при которой разворачивается 50% белка (T_m).

[00349] В таблицах 7А и 7В показана термическая стабильность белков, которые представляют собой анатоксины на основе LukA и LukAB, оцененная с помощью nanoDSF. Показаны температура начала разворачивания белка (Tonset) и средняя точка перехода (T_{m1}) разворачивания белка, а также разница в T_m между сравнительными конструкциями со стабилизирующими заменами и без них (ΔT_m).

Таблица 7А. Одиночные замены в генетической основе CC45 и комбинированные замены в гибридной генетической основе CC8/CC45

Название токсина	LukA	LukB	Tonset	T _{m1}	ΔT _m ^a
Токсин из CC45	CC45 LukA ^{E321A}	CC45 LukB ^{wt}	40,3	47,3	--
Токсин из CC8/CC45	CC8 LukA ^{E320A}	CC45 LukB ^{wt}	37,7	43,9	--
	CC45 LukA ^{E321A, Lys81Met}	CC45 LukB ^{wt}	40,5	47,4	0,1
	CC45 LukA ^{E321A, Ser139Ala}	CC45 LukB ^{wt}	40,5	47,4	0,1
	CC45 LukA ^{E321A, Val111Ile}	CC45 LukB ^{wt}	40,0	47,7	0,4
	CC45 LukA ^{E321A, Val190Ile}	CC45 LukB ^{wt}	40,5	47,5	0,2
	CC45 LukA ^{E321A, Thr247Val}	CC45 LukB ^{wt}	41,3	47,3	0
	CC45 LukA ^{E321A}	CC45 LukB ^{Val53Leu}	40,7	47,8	0,5
RARPR-15	CC45 LukA ^{E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile}	CC45 LukB ^{wt}	41,2	48,9	1,6
RARPR-33	CC8 LukA ^{E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile}	CC45 LukB ^{Val53Leu}	40,0	47,9	4,0
Мономер LukA	CC8 LukA ^{E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Thr246Val, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys}	LukB отсутствует	45,2	61,8	--
Мономер	CC45 LukA ^{E321A, Lys81Met}	LukB отсутствует	51,9	58,1	--

LukA	Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys				
------	---	--	--	--	--

^a ΔT_m представляет собой разницу между значениями T_m для токсинов из CC45 или CC8/CC45 без стабилизирующих замен и дисульфидных связей по сравнению с соответствующими белками LukAB, несущими одну или более замен.

Мономеры LukA содержали N-концевую сигнальную последовательность PelB для направления экспрессии в периплазму *E. coli* для способствования образованию дисульфидной связи.

Димеры LukAB, несущие пары цистеиновых замен для способствования образованию дисульфидной связи, экспрессировались в цитоплазме клеток *E. coli* Origami 2(DE3).

Таблица 7B. Одиночные замены в генетической основе CC8 и комбинированные замены в гибридной генетической основе CC8/CC45

Название токсина	LukA	LukB	Tonset	Tm1	ΔT_m^a
Токсин из CC45	CC45 LukA ^{E321A}	CC45 LukB ^{wt}	37,8	45,3	--
Токсин из CC8/CC45	CC8 LukA ^{E320A}	CC45 LukB ^{wt}	35,3	42,2	--
	CC8 LukA ^{E320A, Lys80Met}	CC45 LukB ^{wt}	38,8	44,9	2,7
	CC8 LukA ^{E320A, Ser138Ala}	CC45 LukB ^{wt}	38,9	44,7	2,5
	CC8 LukA ^{E320A, Val110Ile}	CC45 LukB ^{wt}	38,0	44,0	1,8
	CC8 LukA ^{E320A, Val190Ile}	CC45 LukB ^{wt}	37,2	43,5	1,3
	CC8 LukA ^{E320A, Thr246Ile}	CC45 LukB ^{wt}	36,4	43,1	0,9
	CC8 LukA ^{E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Thr246Val}	CC45 LukB ^{wt}	40,5	46,8	4,6
RARPR-33	CC8 LukA ^{E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile}	CC45 LukB ^{Val53Leu}	38,8	46,3	4,1

[00350] Результаты. Анализ термической стабильности (таблица 7A) показал, что белок CC45 LukA^{E321A}/LukB из CC45 характеризовался значением T_m на 3°C выше, чем T_m для гибридного белка CC8 LukA^{E321A}/LukB из CC45. Отдельные замены в LukA из CC45 в сочетании с LukB^{wt} из CC45 приводили к умеренному увеличению T_m от 0 до 0,4°C. Замена Val53Leu в LukB приводила к увеличению T_m на 0,5°C. Поскольку гибридные анатоксины LukAB включали основу LukA из CC8, отдельные аминокислотные замены тестировали в LukA из CC8 в сочетании с LukB из CC45 дикого типа (таблица 7B). Как видно для LukA из CC45, отдельные замены в LukA из CC8 также обеспечивали повышение значений T_m выше, чем у LukAB дикого типа.

Комбинации замен в LukA (RARPR-15) обеспечивали значение T_m , которое было на 1,6°C выше, чем для белка CC45 LukA^{E321A}/LukB из CC45, а комбинация замен в LukA из CC8 с LukB^{Val53Leu} (RARPR-33) обеспечивала значение T_m , которое было на 4°C выше, чем для гибрида CC8 LukA^{E321A}/LukB из CC45. Повышенная термическая стабильность RARPR-33 наблюдалась в обоих наборах данных (таблицы 7A и 7B). Хотя наноDSF может обуславливать некоторую вариабельность для белков, которые разворачиваются при температуре ниже 50°C, ΔT_m , определенная с помощью контролей, которые анализировали в каждом наборе, была постоянной в наборах данных при 4,0 и 4,1°C соответственно. Мономеры LukA предусматривали как комбинации замен, так и пары цистеиновых замен и характеризовались повышенными значениями T_m , составляющими $\geq 58^\circ\text{C}$, что указывает на дальнейший вклад дисульфидных связей в повышение термической стабильности.

Обсуждение примеров 1—9

[00351] Описанные в данном документе стабильные варианты гетеродимерных анатоксинов LukAB обладают рядом характеристик, которые обеспечивают их высокую степень пригодности в качестве кандидатов для применения в качестве антигенов в вакцине против *S. aureus*.

[00352] Во-первых, описанные в данном документе мономеры LukA и димерные анатоксины LukAB, включая RARPR-30, RARPR-31, RARPR-32, RARPR-33, RARPR-34 и RARPR-15, характеризовались заметно сниженной цитотоксичностью в отношении дифференцированных THP-1 человека и PMN человека по сравнению с токсинами дикого типа и другими известными анатоксинами (т. е. анатоксинами CC8delta10 и CC45delta10). Даже в концентрациях до 2,5 мг/мл RARPR-33 оставался нецитотоксическим, демонстрируя полную аттенуацию.

[00353] Во-вторых, комбинация замен, введенных в варианты белков LukA и LukB, обеспечивала значительное повышение термической стабильности гетеродимерных комплексов RARPR по сравнению с соответствующими анатоксинами, которые характеризуются наличием только одной замены. В частности, комбинации замен в LukA (RARPR-15) обеспечивали значение T_m , которое было на 1,6°C выше, чем для белка CC45 LukA^{E321A}/LukB из CC45, а комбинация замен в LukA из CC8 с LukB^{Val53Leu} (RARPR-33) обеспечивала значение T_m , которое было на 4°C выше, чем для гибрида CC8 LukA^{E321A}/LukB из CC45.

[00354] Помимо аттенуированной цитотоксичности и повышенной термической стабильности описанные в данном документе анатоксины LukAB RARPR, в частности

RARPR-15, RARPR-33 и RARPR-34, вызывали ответ в виде нейтрализации токсинов, который характеризовался сопоставимым или более широким спектром действия, и более высокие титры нейтрализующих антител, чем токсины CC45 и CC8 дикого типа, гибридные токсины дикого типа и анатоксины, включая анатоксины E323A и анатоксин D39A/R23E.

[00355] Таким образом, аттенуированная цитотоксичность, улучшенная термическая стабильность, надежная иммуногенность и широкий профиль нейтрализующих антител делают описанные в данном документе анатоксины LukAB RARPR идеальными кандидатами для применения в качестве антигенов в вакцине.

[00356] Хотя предпочтительные варианты осуществления были изображены и подробно описаны в данном документе, специалистам в соответствующей области будет очевидно, что различные изменения, дополнения, замены и тому подобное могут быть сделаны без отступления от сути данного изобретения, и поэтому они считаются входящими в объем данного изобретения, как определено в приведенной ниже формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариант полипептида, который представляет собой лейкоцидин А (LukA) *Staphylococcus aureus*, под SEQ ID NO:25, при этом указанный вариант полипептида
5 LukA предусматривает
 аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25.
2. Вариант полипептида LukA по п. 1, где указанный вариант полипептида
10 LukA дополнительно предусматривает
 аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует Glu323 в последовательности под SEQ ID NO: 25.
3. Вариант полипептида LukA по п. 2, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Glu323, предусматривает замену
15 глутаминовой кислоты на аланин (Glu323Ala).
4. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 1—3, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Lys83, предусматривает замену лизина на метионин (Lys83Met).
5. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 1—4, где аминокислотная
20 замена по аминокислотному остатку, который соответствует Ser141, предусматривает замену серина на аланин (Ser141Ala).
6. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 1—5, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Val113, предусматривает замену валина на изолейцин (Val113Ile).
7. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 1—6, где аминокислотная
25 замена по аминокислотному остатку, который соответствует Val193, предусматривает замену валина на изолейцин (Val193Ile).
8. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 2—7, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому
30 аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323 в последовательности под SEQ ID NO: 25.
9. Вариант полипептида LukA по п. 8, где аминокислотные замены предусматривают Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala.

10. Вариант полипептида LukA по п. 1, где указанный вариант представляет собой вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 1, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile и Glu320Ala в последовательности под SEQ ID NO: 1.

5 11. Вариант полипептида LukA по п. 10, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

12. Вариант полипептида LukA по п. 1, где указанный вариант представляет собой вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 2, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile и Glu321Ala в последовательности под SEQ ID NO: 2.

10 13. Вариант полипептида LukA по п. 12, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

14. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 1—13, где указанный вариант полипептида LukA дополнительно предусматривает

15 аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

15. Вариант полипептида LukA по п. 14, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Tyr74, предусматривает замену тирозина на цистеин (Tyr74Cys).

20 16. Вариант полипептида LukA по п. 14 или п. 15, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Asp140, предусматривает замену аспарагина на цистеин (Asp140Cys).

25 17. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 14—16, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Gly149, предусматривает замену глицина на цистеин (Gly149Cys).

18. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 14—17, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Gly156, предусматривает замену глицина на цистеин (Gly156Cys).

30 19. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 14—18, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

20. Вариант полипептида LukA по п. 14, где указанный вариант представляет собой вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 1, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Glu320Ala, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys и Gly153Cys в последовательности под SEQ ID NO: 1.

21. Вариант полипептида LukA по п. 20, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

22. Вариант полипептида LukA по п. 14, где указанный вариант представляет собой вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 2, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Glu321Ala, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys и Gly154Cys в последовательности под SEQ ID NO: 2 .

23. Вариант полипептида LukA по п. 22, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

24. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 1—23, где указанный вариант полипептида LukA дополнительно предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

25. Вариант полипептида LukA по п. 24, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Thr249, предусматривает замену треонина на валин (Thr249Val).

26. Вариант полипептида LukA по п. 25, где указанный вариант белка LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO: 8.

27. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 1—26, дополнительно содержащий аминоконцевую сигнальную последовательность.

28. Вариант полипептида LukA по п. 27, где аминоконцевая сигнальная последовательность предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23.

29. Вариант полипептида LukA по любому из пп. 1—28, дополнительно содержащий аминоконцевую последовательность для очистки.

30. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант полипептида LukA по любому из пп. 1—29.

31. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 30.

32. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 31.

33. Вариант белка или полипептида, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB) *Staphylococcus aureus*, под SEQ ID NO: 39, при этом указанный вариант полипептида LukB предусматривает

5 аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Val53 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

34. Вариант полипептида LukB по п. 33, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Val53, предусматривает замену валина на лейцин (Val53Leu).

10 35. Вариант полипептида LukB по п. 33, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, который предусматривает аминокислотную замену, которая соответствует Val53Leu в последовательности под SEQ ID NO: 15.

15 36. Вариант полипептида LukB по п. 35, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17.

37. Вариант полипептида LukB по п. 33, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, который предусматривает аминокислотную замену, которая соответствует Val53Leu в последовательности под SEQ ID NO: 16.

20 38. Вариант полипептида LukB по п. 37, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

25 39. Вариант полипептида LukB по п. 33 или п. 34, где указанный вариант дополнительно предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

40. Вариант полипептида LukB по п. 39, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Glu45, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин (Glu45Cys).

30 41. Вариант полипептида LukB по п. 39 или п. 40, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Glu109, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин (Glu109Cys).

42. Вариант полипептида LukB по любому из пп. 39—41, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Thr121, предусматривает замену треонина на цистеин (Thr121Cys).

43. Вариант полипептида LukB по любому из пп. 39—42, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Arg154, предусматривает замену аргинина на цистеин (Arg154Cys).

44. Вариант полипептида LukB по любому из пп. 39—43, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

45. Вариант полипептида LukB по п. 39, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Val53Leu, Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys в последовательности под SEQ ID NO: 15.

46. Вариант полипептида LukB по п. 45, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19.

47. Вариант полипептида LukB по п. 33, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Val53Leu, Glu45Cys, Glu110Cys, Thr123Cys и Arg155Cys в последовательности под SEQ ID NO: 16.

48. Вариант полипептида LukB по п. 47, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

49. Вариант белка или полипептида, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB) *Staphylococcus aureus*, под SEQ ID NO:39, при этом указанный вариант полипептида LukB предусматривает

аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

50. Вариант полипептида LukB по п. 49, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Glu45, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин (Glu45Cys), а аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Thr121, предусматривает замену треонина на цистеин (Thr121Cys).

51. Вариант полипептида LukB по п. 49 или п. 50, где аминокислотная замена по аминокислотному остатку, который соответствует Glu109, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин (Glu109Cys), а аминокислотная замена по

аминокислотному остатку, который соответствует Arg154, предусматривает замену аргинина на цистеин (Arg154Cys).

52. Вариант полипептида LukB по любому из пп. 49—51, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

53. Вариант полипептида LukB по п. 52, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys в последовательности под SEQ ID NO: 15.

54. Вариант полипептида LukB по п. 53, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21.

55. Вариант полипептида LukB по п. 52, где указанный вариант представляет собой вариант LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, который предусматривает аминокислотные замены, которые соответствуют Glu45Cys, Glu110Cys, Thr123Cys и Arg155Cys в последовательности под SEQ ID NO: 16.

56. Вариант полипептида LukB по п. 55, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

57. Вариант полипептида LukB по любому из пп. 33—56, дополнительно содержащий аминоконцевую сигнальную последовательность.

58. Вариант полипептида LukB по п. 57, где аминоконцевая сигнальная последовательность предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23.

59. Вариант полипептида LukB по любому из пп. 33—58, дополнительно содержащий аминоконцевую метку для очистки.

60. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант полипептида LukB по любому из пп. 33—59.

61. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 60.

62. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 30, функционально связанную с молекулой нуклеиновой кислоты по п. 60.

63. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 61 или п. 62.

64. Вакцинная композиция против *Staphylococcus aureus*, содержащая один или более вариантов белка или полипептида LukA по любому из пп. 1—29.

65. Вакцинная композиция по п. 64, где вариант полипептида LukA представляет собой вариант под SEQ ID NO: 1.

66. Вакцинная композиция по п. 64 или п. 65, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB), при этом указанные белок или полипептид LukB характеризуются по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 15.

67. Вакцинная композиция по п. 64 или п. 65, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB), при этом указанные белок или полипептид LukB характеризуются по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

68. Вакцинная композиция по п. 67, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys80, Ser138, Val110, Val190 и Glu320Ala в последовательности под SEQ ID NO: 1.

69. Вакцинная композиция по п. 68, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, а полипептид LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

70. Вакцинная композиция по п. 68, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15.

71. Вакцинная композиция по п. 68, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17.

72. Вакцинная композиция по п. 64, где вариант полипептида LukA представляет собой вариант под SEQ ID NO: 2.

73. Вакцинная композиция по п. 72, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB), при этом указанные белок или полипептид LukB характеризуются по меньшей мере 85%

сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

74. Вакцинная композиция по п. 72, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин В (LukB), при этом указанные белок или полипептид LukB характеризуются по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 15.

75. Вакцинная композиция по п. 73, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys81, Ser139, Val111, Val191 и Glu321Ala в последовательности под SEQ ID NO: 2.

76. Вакцинная композиция по п. 75, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, а белок или полипептид LukB предусматривают аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

77. Вакцинная композиция против *Staphylococcus aureus*, содержащая один или более вариантов белка или полипептида LukB по любому из пп. 33—56.

78. Вакцинная композиция по п. 77, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин А (LukA), при этом указанные белок или полипептид LukA характеризуются по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1 (CC8).

79. Вакцинная композиция по п. 77, дополнительно содержащая белок или полипептид, которые представляют собой лейкоцидин А (LukA), при этом указанные белок или полипептид LukA характеризуются по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2 (CC45).

80. Вакцинная композиция против *Staphylococcus aureus*, содержащая вариант полипептида LukA по любому из пп. 1—32 и вариант полипептида LukB по любому из пп. 33—56.

81. Вакцинная композиция по любому из пп. 64—80, дополнительно содержащая адъювант.

82. Вакцинная композиция по любому из пп. 64—81, дополнительно содержащая

один или более дополнительных антигенов *S. aureus*.

5 83. Способ обеспечения генерирования иммунного ответа на *S. aureus* у субъекта, при этом указанный способ включает

введение субъекту вакцинной композиции по любому из пп. 64—81 при условиях, эффективных для генерирования указанного иммунного ответа на *S. aureus* у указанного субъекта.

10 84. Вакцинная композиция по любому из пп. 64—81 для применения в способе обеспечения генерирования иммунного ответа на *S. aureus* у субъекта.

Выравнивание последовательности LukA

```

SEQ_ID_NO:1      ---HKDSQDQNKKEHVVDKSQQQKDKRNVTNKDKNSTAPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNI 57 CC8
SEQ_ID_NO:2      ---ANKDSQDQTKKEHVVDKAQQQKEKRNVDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNI 58 CC45
SEQ_ID_NO:27     NSANKDSQDQTKKEHVVDKAQQQKEKRNVDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNI 60 HMPREF0772__044(TCH60)
SEQ_ID_NO:36     NSANKDSQDQTKKEHVVDKAQQQKEKRNVDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNI 60 SAR2108(MRSA252)
SEQ_ID_NO:34     NSANKDSQDQTKKEHVVDKAQQQKEKRNVDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNI 60 SALG_02329(A9635)
SEQ_ID_NO:35     NSANKDSQDQTKKEHVVDKAQQQKEKRNVDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTETVYDEKTNI 60 SAFIG2061(ST398)
SEQ_ID_NO:37     NSANKDSQDQTKKEHVVDKAQQQKEKRNVDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTETVYDEKTNI 60 SATG_01930(D139)
SEQ_ID_NO:26     NSAHKDSQDQNKKEHVVDKSQQQKDKRNVTNKDKNSTAPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNI 60 NEWMAN
SEQ_ID_NO:32     NSAHKDSQDQNKKEHVVDKSQQQKDKRNVTNKDKNSTVPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNI 60 SAB1876C(RF122)
SEQ_ID_NO:38     NSAHKDSQDQNKKEHVVDKSQQQKDKRNVTNKDKNSTVPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNI 60 SAV2005(Mu50)
SEQ_ID_NO:31     NSAHKDSQDQNKKEHVVDKSQQQKDKRNVTNKDKNSTVPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNI 60 SA1813(N315)
SEQ_ID_NO:33     NSAHKDSQDQNKKEHVVDKSQQQKDKRNVTNKDKNSTAPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNI 60 SACOL2006
SEQ_ID_NO:29     NSAHKDSQDQNKKEHVVDKSQQQKDKRNVTNKDKNSTAPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNI 60 USA300(TCH959)
SEQ_ID_NO:28     NSAHKDSQDQNKKEHVVDKSQQQKEKRNVTNKKDKNSTVPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNI 60 TCH130
SEQ_ID_NO:30     NSAHKDSQDQNKKEHVVDKSQQQKEKRNVTNKKDKNSTVPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNI 60 MW1942 (MW2)
                  :*****:*****:***:****:*****:*****:*****:***:***
SEQ_ID_NO:25     NSAHKDSQDQNKKEHVVDKSQQQKEKRNVTNKKDKNSTVPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNI 60 Большинство

SEQ_ID_NO:1      LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDQVQVRN 117
SEQ_ID_NO:2      LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHNETNASWLKYPSEYHVDQVQVRN 118
SEQ_ID_NO:27     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHNETNASWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:36     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHNETNASWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:34     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHNETNASWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:35     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHKEENNSSWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:37     LQNLQFDFIDDPITYDKNILLVKKQGSIHNSNLKFESHKEENNSSWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:26     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:32     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:38     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:31     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:33     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:29     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:28     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
SEQ_ID_NO:30     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDQVQVRN 120
                  *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
SEQ_ID_NO:25     LQNLQFDFIDDPITYDKNVLLVKKQGSIHNSNLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDQVQVRN 120

```

74

83

113

ФИГ. 1

Выравнивание последовательности LukA

(продолж.)

SEQ_ID_NO:1	RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGI	177
SEQ_ID_NO:2	PKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSLGGKFDSTKGI	178
SEQ_ID_NO:27	PKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSLGGKFDSTKGI	180
SEQ_ID_NO:36	PKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSLGGKFDSTKGI	180
SEQ_ID_NO:34	PKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSLGGKFDSTKGI	180
SEQ_ID_NO:35	RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYNSGGKFDSTKGI	180
SEQ_ID_NO:37	RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYNSGGKFDSTKGI	180
SEQ_ID_NO:26	RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGI	179
SEQ_ID_NO:32	RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGI	180
SEQ_ID_NO:38	RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGI	180
SEQ_ID_NO:31	RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGI	180
SEQ_ID_NO:33	RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGI	180
SEQ_ID_NO:29	PKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGI	179
SEQ_ID_NO:28	RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGI	180
SEQ_ID_NO:30	PKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGI	180

*****.*****.*****.*****.*****.*****

SEQ_ID_NO:25	RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGI	180
--------------	---------------------------------------	-----

140/141 149 156

SEQ_ID_NO:1	SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVR	237
SEQ_ID_NO:2	SGKNNNRHVHWSVIANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTRLSTVENPELSFASKYRYPALVR	238
SEQ_ID_NO:27	SGKNNNRHVHWSVIANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTRLSTVENPELSFASKYRYPALVR	240
SEQ_ID_NO:36	SGKNNNRHVHWSVIANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTRLSTVENPELSFASKYRYPALVR	240
SEQ_ID_NO:34	SGKNNNRHVHWSVIANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTRLSTVENPELSFASKYRYPALVR	240
SEQ_ID_NO:35	SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDDFLFYRNTRLSTVENPELSFASKYRYPALVR	240
SEQ_ID_NO:37	SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDEFLFYRTTTLSTVENPELSFASKYRYPALVR	240
SEQ_ID_NO:26	SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVR	239
SEQ_ID_NO:32	IGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVR	240
SEQ_ID_NO:38	SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVR	240
SEQ_ID_NO:31	SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVR	240
SEQ_ID_NO:33	SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVR	240
SEQ_ID_NO:29	SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVR	239
SEQ_ID_NO:28	SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVR	240
SEQ_ID_NO:30	SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVR	240

*****.*****.*****.*****.*****.*****

SEQ_ID_NO:25	SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVR	240
--------------	--	-----

193

ФИГ. 1. (продолж.)

Выравнивание последовательности LukA

(продолж.)

SEQ_ID_NO:1	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFEV	TYTRNQDILKNRPGI	HYAPPFILEKKNKD	GQRLIVTYE	297
SEQ_ID_NO:2	SGFNPEFLT	TYISNEKTNDKTRFE	VTYTRNQDILKNKPG	IHYGQFILEQNKG	QRFIVVYE	298
SEQ_ID_NO:27	SGFNPEFLT	TYISNEKSNEKTRFE	VTYTRNQDILKNKPG	IHYGQFILEQNKG	QRFIVVYE	300
SEQ_ID_NO:36	SGFNPEFLT	TYISNEKSNEKTRFE	VTYTRNQDILKNKPG	IHYGQFILEQNKG	QRFIVVYE	300
SEQ_ID_NO:34	SGFNPEFLT	TYISNEKTNDKTRFE	VTYTRNQDILKNKPG	IHYGQFILEQNKG	QRFIVVYE	300
SEQ_ID_NO:35	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFE	VTYTRNQDVLKNKPG	IHYAPPFILEKKN	KDQRLIVTYE	300
SEQ_ID_NO:37	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFE	VTYTRNQDILKNKPG	IHYAPPFILEKKN	KDQRLIVTYE	300
SEQ_ID_NO:26	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFE	VTYTRNQDILKNRPG	IHYAPPFILEKKN	KDQRLIVTYE	299
SEQ_ID_NO:32	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFE	VTYTRNQDILKNRPG	IHYAPPFILEKKN	KDQRLIVTYE	300
SEQ_ID_NO:38	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFE	VTYTRNQDILKNRPG	IHYAPSILEKKN	KDQRLIVTYE	300
SEQ_ID_NO:31	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFE	VTYTRNQDILKNRPG	IHYAPPFILEKKN	KDQRLIVTYE	300
SEQ_ID_NO:33	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFE	VTYTRNQDILKNRPG	IHYAPPFILEKKN	KDQRLIVTYE	300
SEQ_ID_NO:29	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFE	VTYTRNQDILKNRPG	IHYAPPFILEKKN	KEGQRLIVTYE	299
SEQ_ID_NO:28	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFE	VTYTRNQDILKNRPG	IHYAPPFILEKKN	KEGQRLIVTYE	300
SEQ_ID_NO:30	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFE	VTYTRNQDILKNRPG	IHYAPPFILEKKN	KEGQRLIVTYE	300

*****:*****:*:*:*****:***:*****.***:***:***:***.***

SEQ_ID_NO:25	SGFNPEFLT	TYLSNEKSNEKTQFE	VTYTRNQDILKNRPG	IHYAPPFILEKKN	KDQRLIVTYE	300
--------------	-----------	-----------------	-----------------	---------------	------------	-----

249

SEQ_ID_NO:1	VDWKNKTVKVVDKYS	DDNKPYKEG	321
SEQ_ID_NO:2	VDWKNKTVKVVEKYS	DQNKPYKEG	322
SEQ_ID_NO:27	VDWKNKTVKVVEKYS	DQNKPYKEG	324
SEQ_ID_NO:36	VDWKNKTVKVVEKYS	DQNKPYKEG	324
SEQ_ID_NO:34	VDWKNKTVKVVEKYS	DQNKPYKEG	324
SEQ_ID_NO:35	VDWKNKTVKVIDKYS	DENKPYKEG	324
SEQ_ID_NO:37	VDWKNKTVKVIDKYS	DDNKPYKEG	324
SEQ_ID_NO:26	VDWKNKTVKVVDKYS	DDNKPYKEG	323
SEQ_ID_NO:32	VDWKNKTVKVVDKYS	DDNKPYKEG	324
SEQ_ID_NO:38	VDWKNKTVKVVDKYS	DDNKPYKEG	324
SEQ_ID_NO:31	VDWKNKTVKVVDKYS	DDNKPYKEG	324
SEQ_ID_NO:33	VDWKNKTVKVVDKYS	DDNKPYKEG	324
SEQ_ID_NO:29	VDWKNKTVKVVDKY	TDN-KSFREG	322
SEQ_ID_NO:28	VDWKNKTVKVVDKYS	DN-KSFREG	323
SEQ_ID_NO:30	VDWKNKTVKVVDKYS	DN-KSFREG	323

*****:***:***:***:***

SEQ_ID_NO:25	VDWKNKTVKVVDKYS	DDNKPYKEG	324
--------------	-----------------	-----------	-----

323

ФИГ. 1. (продолж.)

Выравнивание последовательности LukB

```

SEQ_ID_NO:15      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 CC8
SEQ_ID_NO:16      EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 CC45
SEQ_ID_NO:40      EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 A9635
SEQ_ID_NO:43      EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 E1410
SEQ_ID_NO:45      EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 MRSA252
SEQ_ID_NO:42      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 D139
SEQ_ID_NO:46      KINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 Mu.50
SEQ_ID_NO:44      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 JKD6008
SEQ_ID_NO:41      -----DKETVFIKAKGT 12 COL
SEQ_ID_NO:50      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 USA300_FPR3757
SEQ_ID_NO:51      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 NEWMAN
SEQ_ID_NO:48      KINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 RF122
SEQ_ID_NO:47      KINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 MW2
SEQ_ID_NO:49      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 TCH130

```

```

SEQ_ID_NO:39      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60

```

45

53

```

SEQ_ID_NO:15      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:16      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 120
SEQ_ID_NO:40      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 120
SEQ_ID_NO:43      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 120
SEQ_ID_NO:45      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 120
SEQ_ID_NO:42      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:46      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:44      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:41      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 71
SEQ_ID_NO:50      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:51      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:48      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:47      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:49      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 119

```

*****:****:***** ***** ,*****

```

SEQ_ID_NO:39      IGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNN-NTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGY 119

```

109

Выравнивание последовательности LukB (продолж.)

SEQ_ID_NO:15	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG	179
SEQ_ID_NO:16	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQPTTNKGVAWKVEAHSINNMG	180
SEQ_ID_NO:40	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQPTTNKGVAWKVEAHSINNMG	180
SEQ_ID_NO:43	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQPTTNKGVAWKVEAHSINNMG	180
SEQ_ID_NO:45	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQPTTNKGVAWKVEAHSINNMG	180
SEQ_ID_NO:42	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQPTTNKGVAWKVEAHLINNMG	179
SEQ_ID_NO:46	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG	179
SEQ_ID_NO:44	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG	179
SEQ_ID_NO:41	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG	131
SEQ_ID_NO:50	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG	179
SEQ_ID_NO:51	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG	179
SEQ_ID_NO:48	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG	179
SEQ_ID_NO:47	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG	179
SEQ_ID_NO:49	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG	179

*****:*** *****:*****:*** *:*** ***** *****

SEQ_ID_NO:39	KTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG	179
	121	154

SEQ_ID_NO:15	HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	239
SEQ_ID_NO:16	HDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	240
SEQ_ID_NO:40	HDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	240
SEQ_ID_NO:43	HDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	240
SEQ_ID_NO:45	HDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	240
SEQ_ID_NO:42	HDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	239
SEQ_ID_NO:46	HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	239
SEQ_ID_NO:44	HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	239
SEQ_ID_NO:41	HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	191
SEQ_ID_NO:50	HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	239
SEQ_ID_NO:51	HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	239
SEQ_ID_NO:48	HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	239
SEQ_ID_NO:47	HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	239
SEQ_ID_NO:49	HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	239

*****:*** *****:*****:*****:*****:*****:*****

SEQ_ID_NO:39	HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK	239
--------------	--	-----

ФИГ. 2 (продолж.)

Выравнивание последовательности LukB (продолж.)

```

SEQ_ID_NO:15      KDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:16      NDKGKSRLFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKLSALYEVDWKTHDVKL 300
SEQ_ID_NO:40      NDKGKSRLFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKLSALYEVDWKTHDVKL 300
SEQ_ID_NO:43      NDKGKSRLFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKLSALYEVDWKTHDVKL 300
SEQ_ID_NO:45      NDKGKSRLFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKLSALYEVDWKTHDVKL 300
SEQ_ID_NO:42      KDEGKSKEFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:46      KDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHDVKF 299
SEQ_ID_NO:44      KDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:41      KDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHNVKF 251
SEQ_ID_NO:50      KDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:51      KDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:48      KDEGKSKEFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHDVKF 299
SEQ_ID_NO:47      KDEGKSKEFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:49      KDEGKSKEFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHNVKF 299
                  :*:***:*:*****;*:***:*****;*****;*:***;

```

```

SEQ_ID_NO:39      KDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHNVKF 299

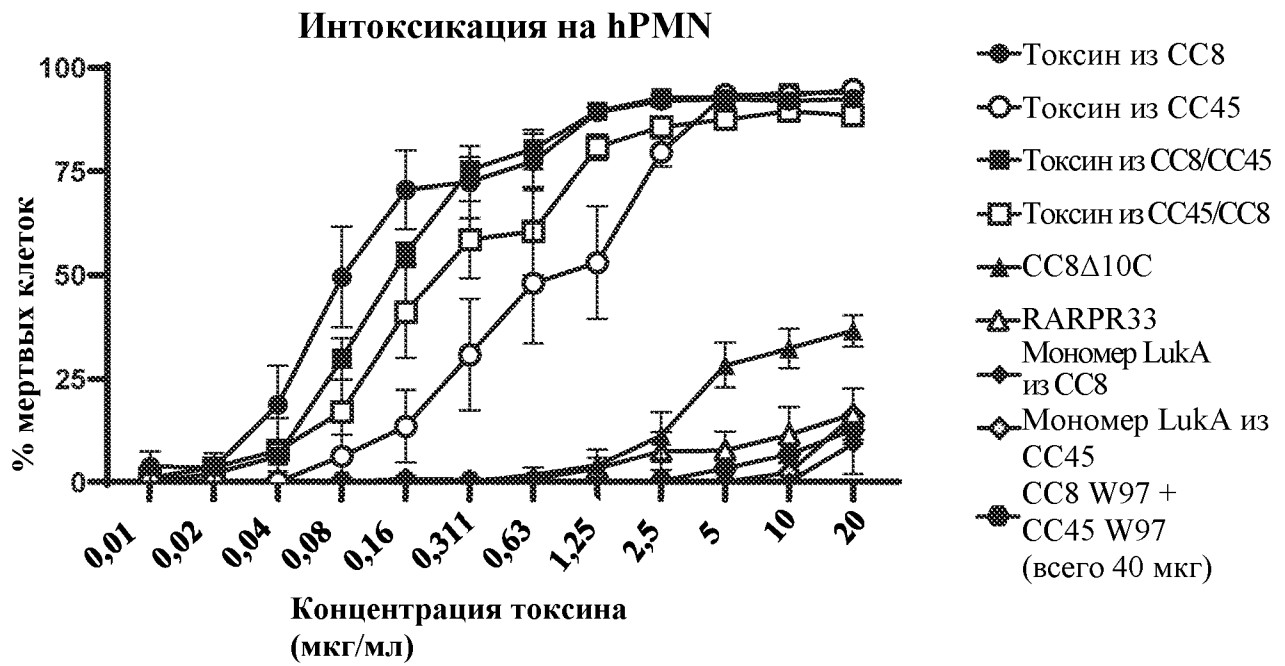
```

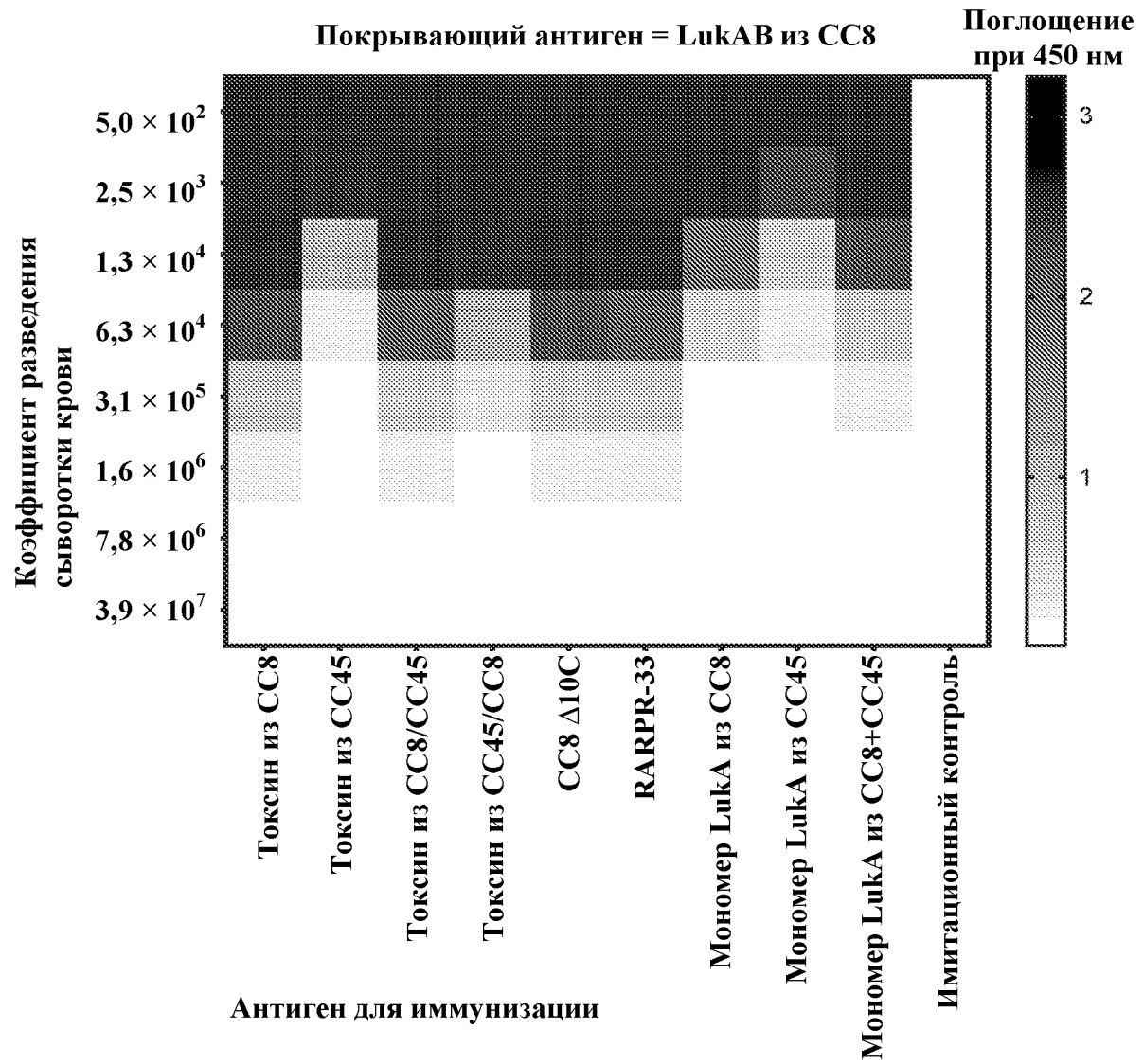
```

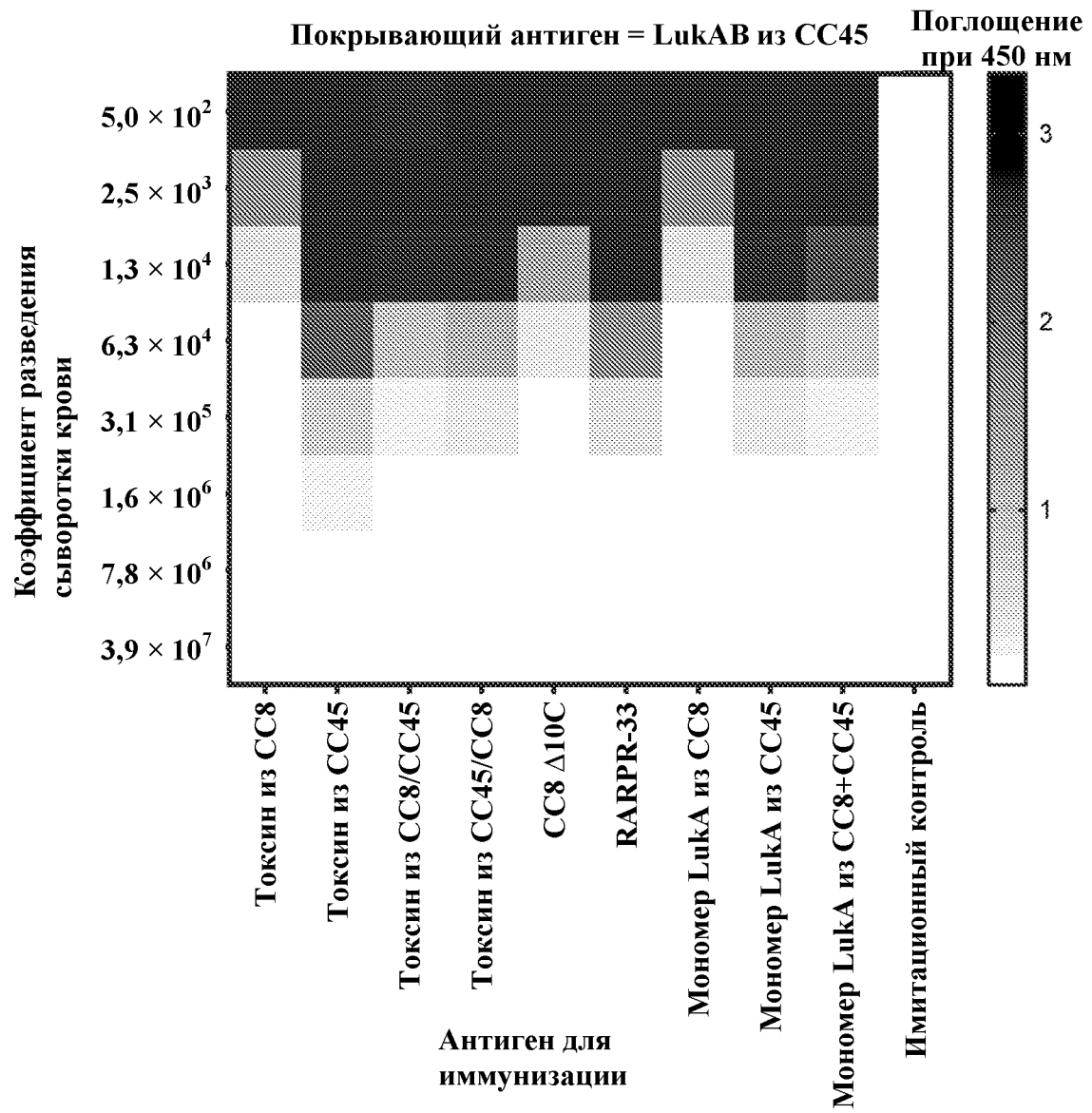
SEQ_ID_NO:15      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:16      IKTFNDKEKK 310
SEQ_ID_NO:40      IKTFNDKEKK 310
SEQ_ID_NO:43      IKTINDKEQK 310
SEQ_ID_NO:45      IKTINDKEQK 310
SEQ_ID_NO:42      IKVLNDKEKK 309
SEQ_ID_NO:46      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:44      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:41      VKVLNDNEKK 261
SEQ_ID_NO:50      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:51      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:48      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:47      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:49      VKVLNDNEKK 309
                  :*.:**:*:*
SEQ_ID_NO:39      VKVLNDNEKK 309

```

ФИГ. 2 (продолж.)

**ФИГ. 3**

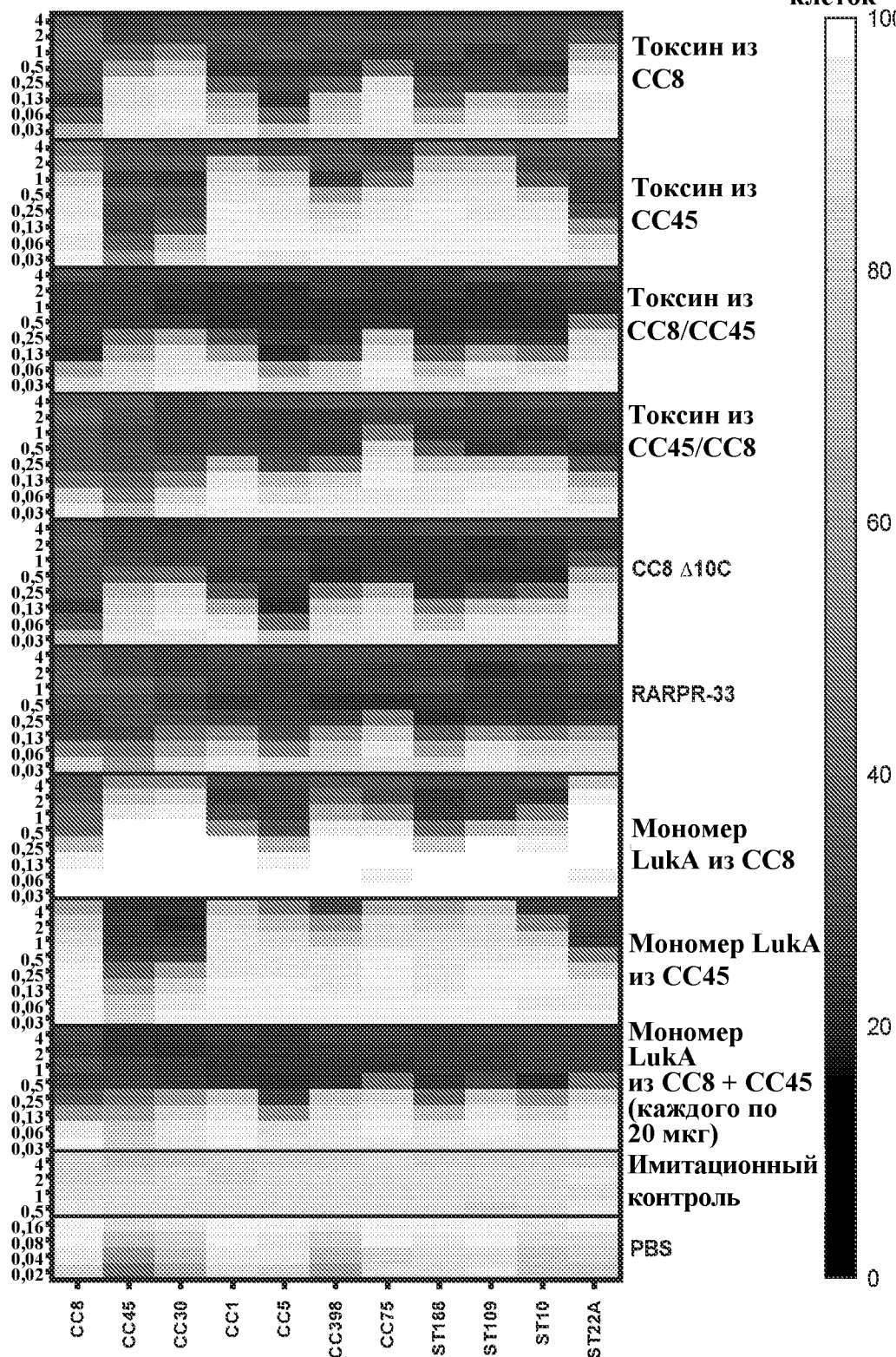
**ФИГ. 4А**

**ФИГ. 4В**

% сыворотки
крови

Антиген для
иммунизации

% гибели
клеток



Токсин LukAB (0,156 мкг/мл)

ФИГ. 5

Анализ нейтрализации: % мертвых PMN человека (интоксикация с помощью LD₉₀ вариантов LukAB + 2% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n = 4 донора

Антиген LukAB для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8	8,86	19,09	11,91	2,07	3,14	2,35	3,34	3,11	2,57	2,46	33,02
CC45	79,63	1,50	1,05	81,08	80,10	50,46	67,85	81,92	75,50	38,83	2,60
CC8/CC45	4,11	1,46	0,00	0,38	0,00	0,96	1,73	0,00	0,00	0,00	0,76
CC45/CC8	8,80	1,84	1,41	0,13	0,22	0,54	0,54	2,94	0,95	0,99	1,73
CC8 E323A/CC45	2,90	1,37	0,66	1,65	0,23	0,00	4,37	0,06	4,26	0,86	3,91
CC45 E323A/CC8	7,92	1,28	0,00	0,00	0,56	0,00	9,29	2,91	2,30	2,22	2,86
CC8 E323A/CC45 B5	37,18	51,31	53,86	40,06	39,43	74,44	49,27	23,54	47,20	66,59	35,62
CC45 E323A/CC8 B5	19,57	10,70	47,46	54,36	44,74	64,77	71,72	82,49	75,41	49,76	13,32
RARPR 13	23,49	6,31	3,94	42,95	29,57	1,87	4,58	32,08	16,15	8,42	7,25
RARPR 15	9,22	4,02	4,33	4,02	6,08	4,60	7,66	7,07	6,82	7,15	8,81
RARPR 17	56,11	8,90	4,35	58,37	64,23	4,36	5,00	52,92	40,46	7,22	8,88
RARPR 19	42,11	10,05	10,23	40,04	49,00	9,71	9,49	44,67	17,04	9,39	9,81
SM1W97	9,59	87,32	89,66	2,63	2,90	22,13	16,21	4,85	6,57	5,60	87,96
Имитационный контроль	88,81	81,28	86,39	87,04	89,89	87,03	93,31	90,54	90,08	91,77	92,30

CC45 B5 и CC8 B5 представляют собой варианты LukB с делециями

*Мономер CC8 LukA W97, экспрессируемый в клетках HEK293

Анализ нейтрализации: % мертвых PMN человека (интоксикация с помощью LD₉₀ вариантов LukAB + 2% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n = 4 донора

Антиген LukAB для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8 delta10C	25,46	16,21	17,06	30,25	18,63	27,37	62,25	17,97	22,44	21,63	18,86
RARPR 30	26,73	18,82	19,72	35,26	19,17	18,00	16,62	27,99	29,64	16,48	19,95
RARPR 31	20,61	78,41	79,18	19,06	11,23	42,24	47,72	14,23	23,67	11,37	82,07
RARPR 32	15,70	30,25	30,64	4,69	6,10	6,88	5,11	9,97	5,86	6,17	43,44
RARPR 33	17,33	8,43	10,14	8,95	12,32	11,81	14,58	12,55	11,55	9,08	10,46
RARPR 34	15,77	11,63	12,92	10,47	9,79	5,96	7,19	10,11	5,42	9,00	19,29
CC8 W97	12,75	78,67	79,90	3,78	4,49	35,56	39,56	9,09	10,68	13,01	85,04
CC45 W97	86,48	26,11	23,68	87,12	88,52	81,79	88,11	85,80	86,48	84,08	40,99
RARPR 31 + CC45 SW97	20,49	27,41	35,17	49,31	18,69	52,84	69,32	22,93	45,50	36,26	44,91
Имитационный контроль	89,05	88,88	89,56	87,67	87,61	88,38	89,26	87,11	90,31	87,72	88,05

ФИГ. 6А

Анализ нейтрализации: % мертвых PMN человека (интоксикация с помощью LD₉₀ вариантов LukAB + 1% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n = 4 донора

Антиген LukAB для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8	6,31	79,12	78,00	4,08	2,72	2,12	23,47	2,31	1,45	2,06	89,11
CC45	85,25	8,41	5,43	88,18	86,90	82,07	86,32	82,99	82,13	81,55	1,64
CC8/CC45	2,95	2,99	2,55	0,00	0,00	0,00	13,65	0,92	0,00	0,00	19,64
CC45/CC8	12,02	2,54	0,00	69,77	19,76	38,40	30,76	77,31	38,67	48,34	1,02
CC8 E323A/CC45	4,92	5,40	5,15	3,89	1,29	4,67	44,20	0,03	0,50	1,49	16,39
CC45 E323A/CC8	14,19	0,00	0,00	65,49	33,06	67,53	82,11	74,34	29,92	59,20	0,00
CC8 E323A/CC45 B5	44,80	85,26	72,72	88,32	62,49	85,71	88,69	61,54	76,01	81,73	85,04
CC45 E323A/CC8 B5	56,69	58,06	63,51	86,04	73,53	81,75	87,05	86,17	88,14	80,33	72,51
RARPR 13	77,93	4,99	3,09	84,41	80,70	12,54	15,60	80,10	71,92	15,54	0,37
RARPR 15	27,35	2,99	0,67	43,23	50,38	0,93	6,47	33,91	17,17	1,51	1,63
RARPR 17	87,67	5,78	1,96	86,75	85,31	55,72	46,87	86,40	87,35	46,46	3,17
RARPR 19	87,20	6,79	3,53	90,10	89,81	36,00	51,36	87,24	82,62	26,12	5,66
SM1W97	3,48	93,22	89,90	25,96	0,00	73,66	63,47	0,70	6,14	3,10	94,47
Имитационный контроль	90,53	94,26	93,47	93,61	93,03	93,21	93,34	91,75	92,00	92,35	90,72

Анализ нейтрализации: % мертвых PMN человека (интоксикация с помощью LD₉₀ вариантов LukAB + 1% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n = 4 донора

Антиген LukAB для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8 delta10C	21,27	48,38	34,07	71,41	15,91	59,63	79,56	41,56	68,51	56,94	41,67
RARPR 30	28,95	16,90	21,28	77,12	35,04	33,77	26,01	61,04	71,73	32,93	14,38
RARPR 31	21,83	86,11	87,37	64,22	28,40	73,38	75,84	27,79	67,07	33,51	89,54
RARPR 32	9,35	65,16	67,49	4,22	4,32	2,79	12,24	4,71	2,24	2,80	76,25
RARPR 33	17,16	15,09	17,73	14,45	8,25	19,25	15,80	5,89	11,21	6,59	34,68
RARPR 34	22,52	42,51	44,83	6,80	5,30	6,77	15,77	5,37	4,55	6,97	51,43
CC8 W97	11,18	86,60	87,22	32,08	5,73	62,26	64,70	12,38	36,39	22,36	86,48
CC45 W97	88,20	49,88	54,36	86,55	86,81	87,97	87,96	88,78	86,29	86,15	63,54
RARPR 31 + CC45 SW97	37,40	57,23	64,18	85,41	53,18	74,04	81,87	55,68	79,97	67,11	73,77
Имитационный контроль	95,48	91,80	91,50	95,81	94,80	91,87	94,48	94,48	94,85	94,51	94,79

ФИГ. 6В

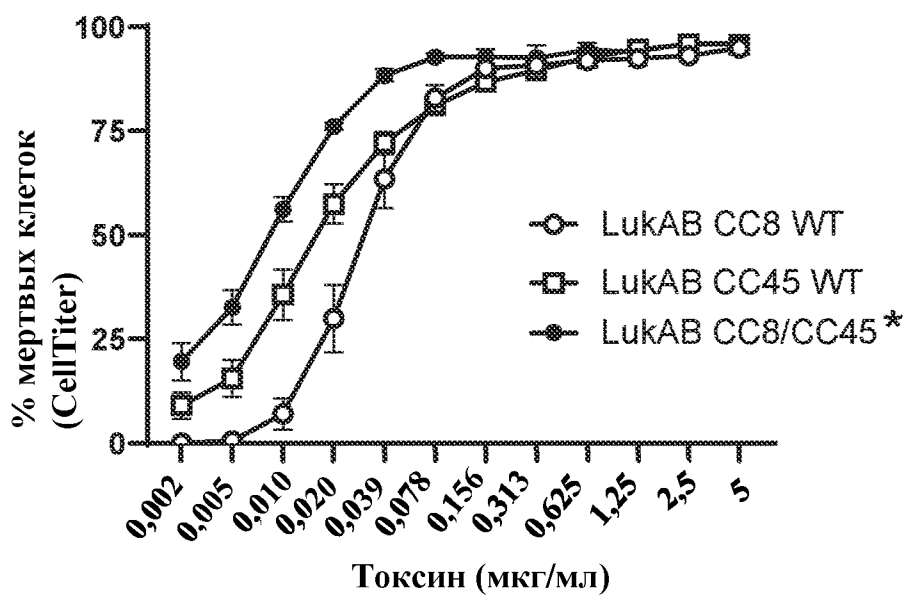
Анализ нейтрализации: % мертвых PMN человека (интоксикация с помощью LD₉₀ вариантов LukAB + 0,5% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n = 4 донора

Антиген LukAB для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8	4,72	91,20	89,33	14,98	4,66	39,86	84,43	3,02	3,41	1,99	90,83
CC45	89,11	13,32	9,54	91,24	91,47	87,94	92,77	85,99	87,64	87,15	26,57
CC8/CC45	4,20	65,59	74,67	62,14	10,51	77,09	84,91	0,29	18,82	32,31	84,21
CC45/CC8	71,54	72,15	37,01	89,70	80,64	86,07	85,81	88,62	89,05	88,11	70,59
CC8 E323A/CC45	15,35	49,18	68,28	86,87	26,99	72,20	86,68	17,24	64,65	24,31	83,01
CC45 E323A/CC8	78,55	51,02	12,91	89,15	85,25	86,12	90,10	86,75	86,46	88,42	37,10
CC8 E323A/CC45 B5	84,73	92,88	89,97	90,77	89,44	90,97	93,02	86,62	89,11	89,31	91,77
CC45 E323A/CC8 B5	89,10	88,13	90,30	89,04	90,22	88,34	91,53	90,08	88,93	91,35	91,77
RARPR 13	92,34	1,46	1,63	91,95	91,88	55,81	62,35	91,87	88,36	80,69	6,74
RARPR 15	90,27	3,35	0,00	92,63	88,06	58,82	82,81	91,54	89,57	57,13	1,32
RARPR 17	92,25	1,35	0,48	92,38	92,90	91,11	89,94	92,48	92,80	87,28	1,26
RARPR 19	92,63	3,62	2,11	90,72	89,79	84,15	87,78	91,37	93,34	85,11	4,16
SM1W97	18,13	89,96	92,05	90,59	38,57	87,10	89,10	29,16	81,63	61,72	92,22
Имитационный контроль	93,93	91,94	90,60	92,04	94,88	93,06	91,54	93,06	91,73	93,38	95,19

Анализ нейтрализации: % мертвых PMN человека (интоксикация с помощью LD₉₀ вариантов LukAB + 0,5% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n = 4 донора

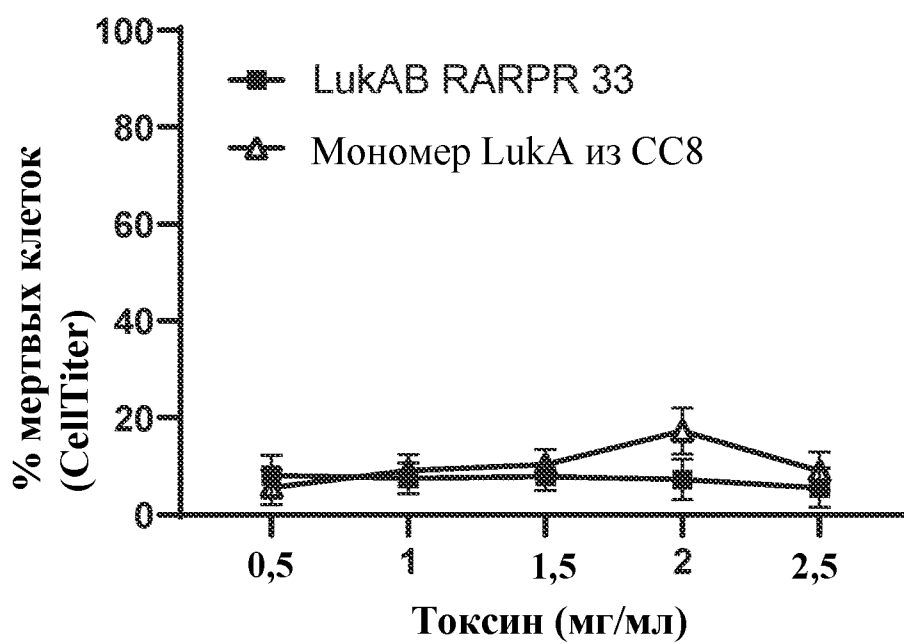
Антиген LukAB для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8 delta10C	19,20	65,77	66,31	86,52	42,23	76,84	85,46	79,13	84,89	76,20	75,26
RARPR 30	46,84	15,56	14,27	88,08	66,72	68,45	52,63	84,26	88,95	65,90	16,73
RARPR 31	34,37	87,32	86,47	86,14	59,72	85,14	86,23	67,96	87,03	70,30	87,91
RARPR 32	9,45	83,44	82,39	11,75	2,85	8,76	50,03	2,16	2,19	4,66	87,02
RARPR 33	10,98	54,83	51,44	47,75	4,47	51,89	51,85	7,31	43,18	24,47	76,12
RARPR 34	13,48	72,28	75,09	10,15	5,99	21,47	54,74	4,39	9,09	5,88	84,63
CC8 W97	72,27	80,37	87,69	18,45	60,44	81,25	52,60	58,74	54,93	78,52	84,32
CC45 W97	87,00	72,03	74,38	88,00	87,58	90,84	86,58	85,34	86,90	90,92	82,63
RARPR 31 + CC45 SW97	65,05	79,43	81,49	90,96	84,01	86,00	87,48	83,63	89,68	81,75	85,32
Имитационный контроль	93,59	88,06	90,18	94,58	94,00	90,17	93,48	94,27	94,28	92,16	92,91

ФИГ. 6С

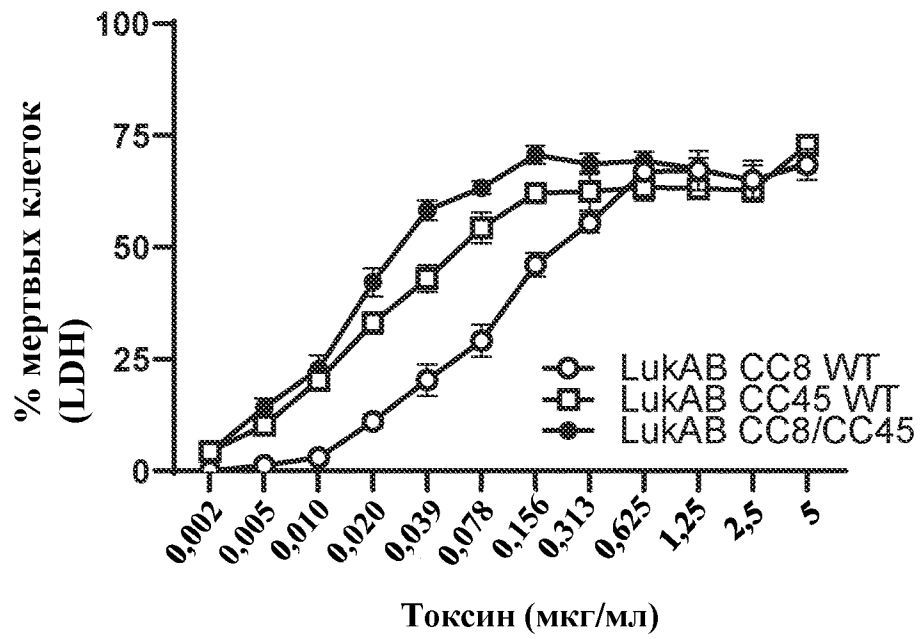
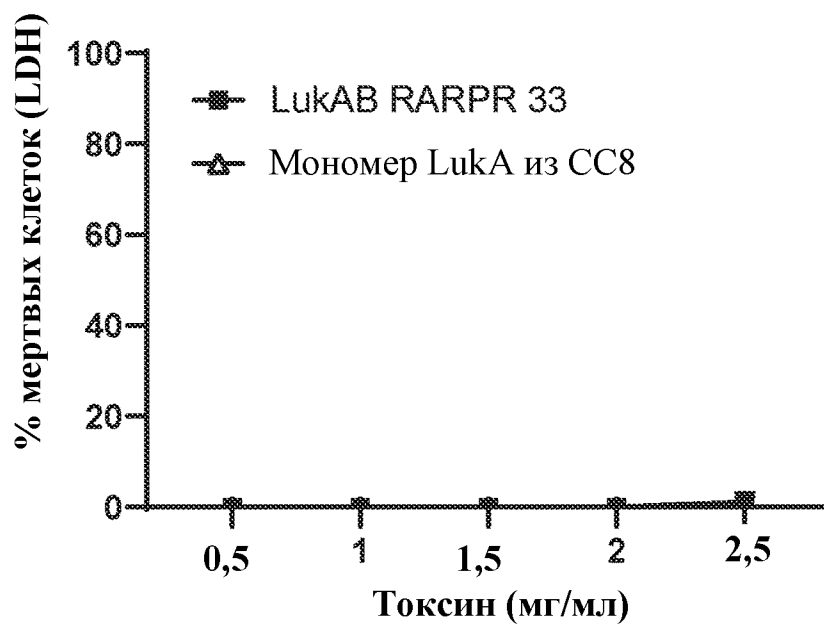


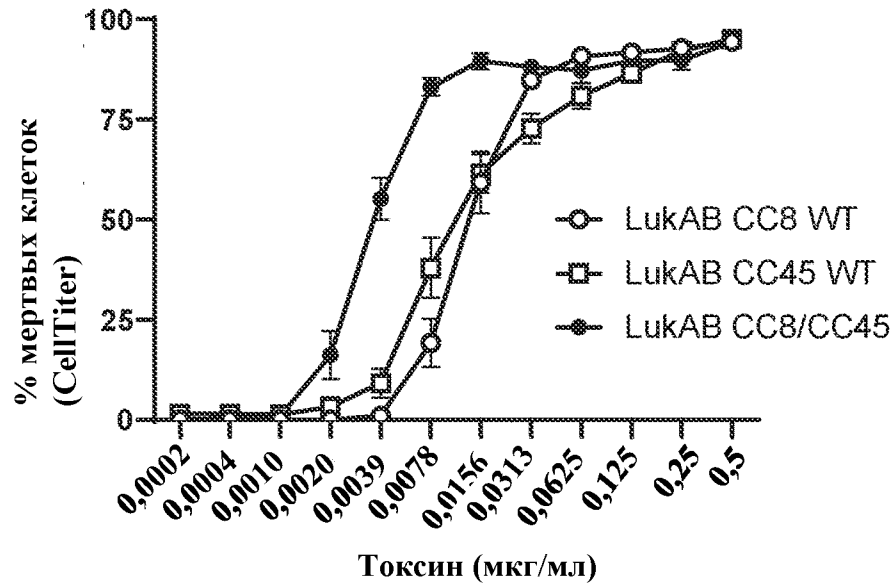
*LukAB из CC8/CC45 протестировали только у 4 доноров

ФИГ. 7А

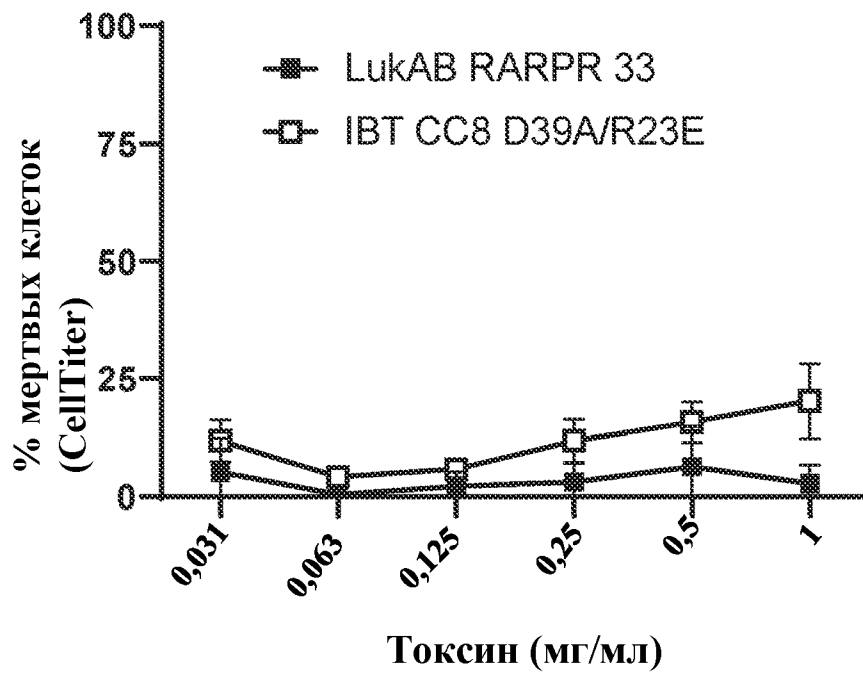


ФИГ. 7В

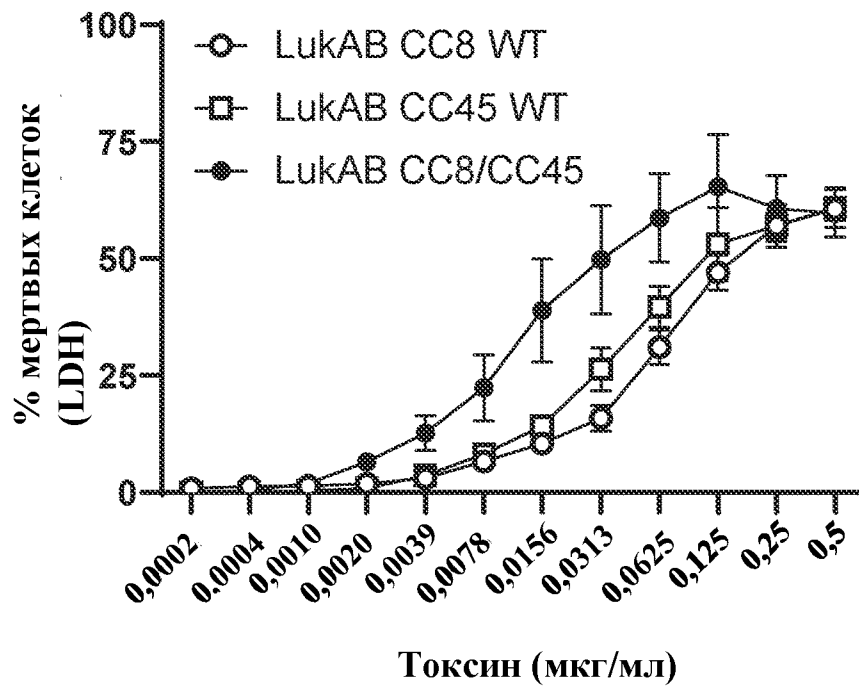
**ФИГ. 7C****ФИГ. 7D**



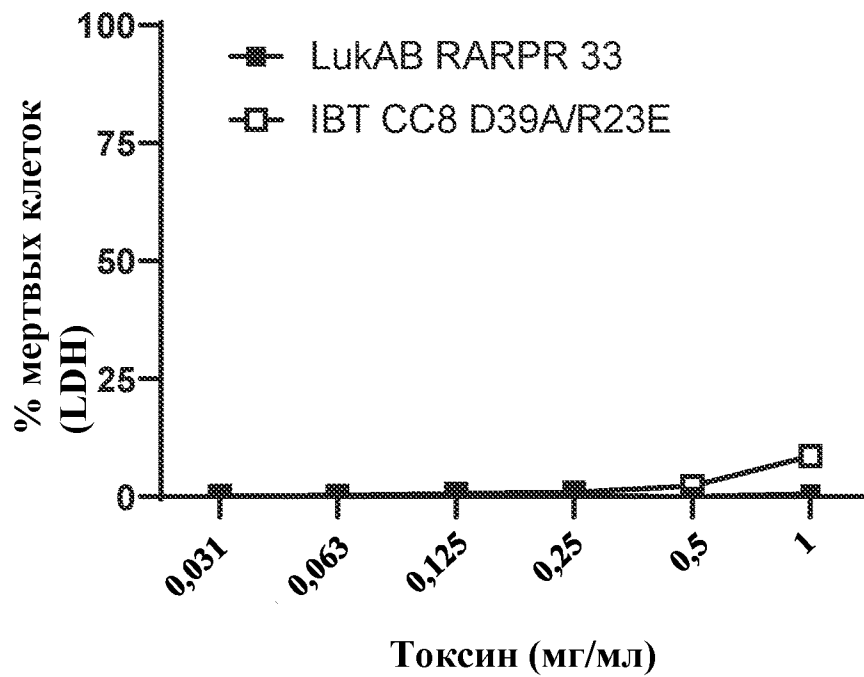
ФИГ. 8А



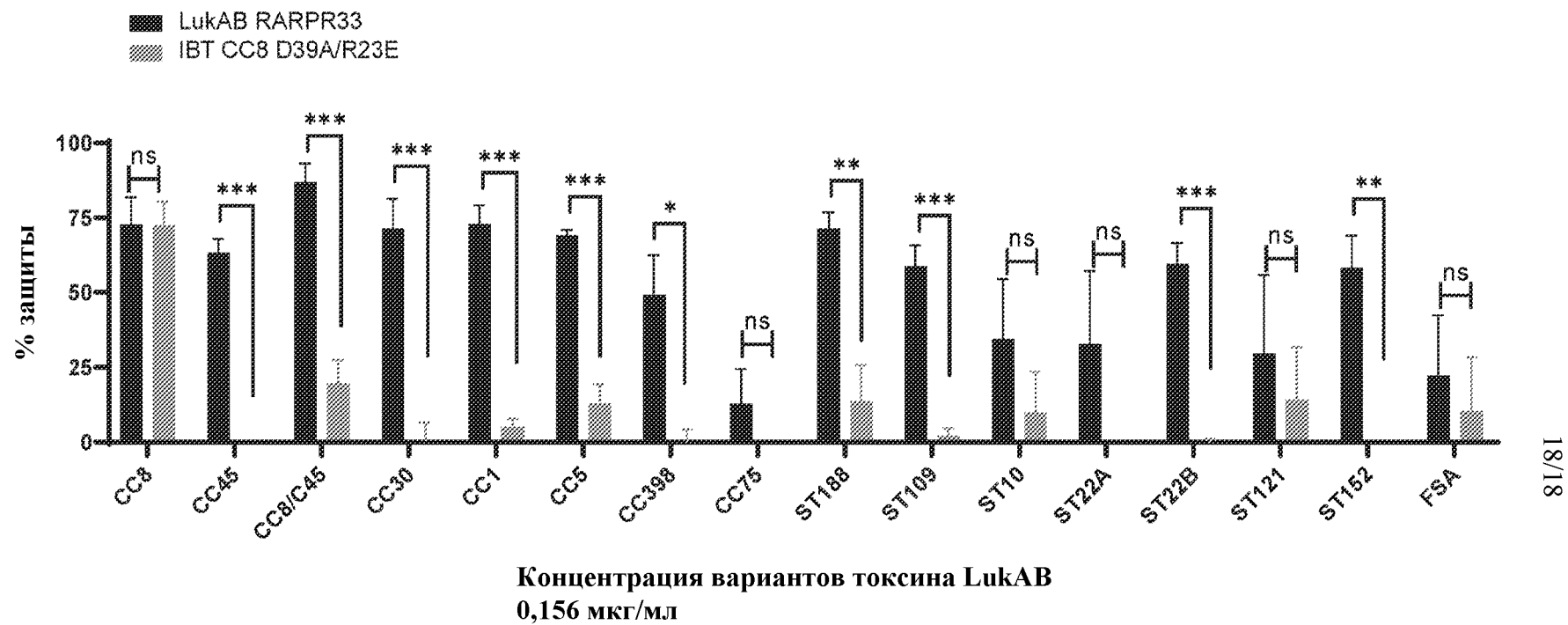
ФИГ. 8В



ФИГ. 8С



ФИГ. 8D



ФИГ. 9