(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 046662 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.05

(21) Номер заявки
202193110

(22) Дата подачи заявки
2020.05.13

(51) Int. Cl. ***A61K 38/16*** (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ВАРИАНТЫ БЕЛКА A (SPA) STAPHYLOCOCCUS

(31) **62/847,832**
(32) **2019.05.14**
(33) **US**
(43) **2022.04.25**
(86) **PCT/US2020/070048**
(87) **WO 2020/232471 2020.11.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЧИКАГО (US)

(72) Изобретатель:
Шневинд Олаф, Миссиакас Доминик, Сунь Янь, Ким Хван Кеун, Ши Мяомяо, Чэнь Синьхай (US)

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

(56) US-A1-20160074497
WO-A1-2016166221
FALUGI et al. "Role of Protein A in the Evasion of Host Adaptive Immune Responses by Staphylococcus aureus," American Society for Microbiology, 27 August 2013 (27.08.2013), Vol. 4, Iss. 5, Pgs. 1-9, entire document
LUA et al. "Role of the IgE variable heavy chain in FcεRIα and superantigen binding in allergy and immunotherapy," Journal of Allergy and Clinical Immunology, 14 April 2019 (14.04.2019), Vol. 144, Iss. 2, Pgs. 514-523, entire document
US-A1-20130096276

(57) Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам и композиции для профилактики или лечения бактериальной инфекции, в частности инфекции бактерии Staphylococcus. Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к улучшенному нетоксигенному варианту белка A (SpA).

046662 B1

046662 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по временной патентной заявке США № 62/847832, поданной 14 мая 2019 года, таким образом, включенной в качестве ссылки в полном объеме.

Уровень техники

Настоящее изобретение было создано при поддержке правительства по грантам №№ AI038897 и AI052474, присвоенным National Institutes of Health. Правительство обладает некоторыми правами на изобретение.

I. Область изобретения

Настоящее изобретение, в основном, относится к областям иммунологии, микробиологии и патологии. Более конкретно, оно относится к способам и композициям, включающим варианты бактериального белка A, который можно использовать для индуцирования иммунного ответа против бактерий.

II. Уровень техники

Количество бытовых и госпитальных инфекций повысилось за последние несколько лет, при этом увеличилось использование внутрисосудистых устройств. Госпитальные (нозокомиальные) инфекции являются основной причиной заболеваемости и смертности, более конкретно - в США, где они поражают более 2 миллионов пациентов ежегодно. Наиболее частями инфекциями являются инфекции мочевыводящих путей (33% инфекций), затем пневмония (15,5%), хирургические раневые инфекции (14,8%) и первичные инфекции кровотока (13%) (Emorl and Gaynes, 1993).

Основные нозокомиальные патогенные микроорганизмы включают Staphylococcus aureus, коагулаза-отрицательных стафилококков (главным образом, Staphylococcus epidermidis), Enterococcus spp., Escherichia coli и Pseudomonas aeruginosa. Хотя эти патогены вызывают приблизительно одинаковое количество инфекций, тяжесть нарушений, которые они могут вызывать, в комбинации с частотой резистентных к антибиотикам изолятов сдвигает баланс в сторону S. aureus и S. epidermidis как наиболее значимых нозокомиальных патогенных микроорганизмов.

Стафилококки могут вызывать широкий спектр заболеваний у людей и других животных посредством продукции токсинов или инвазии. Стафилококковые токсины также являются распространенной причиной пищевого отравления, т.к. бактерии могут расти в неправильно хранящейся пище.

Staphylococcus epidermidis является нормальным комменсалом кожи, также являющимся важным условно-патогенным микроорганизмом, отвечающим за инфекции поврежденных медицинских устройств и инфекции в участках хирургических операций. Медицинские устройства, инфицированные S. epidermidis, включают кардиостимуляторы, шунты для оттока цереброспинальной жидкости, катетеры для хронического перитонеального диализа в амбулаторных условиях, ортопедические устройства и искусственные клапаны сердца.

Staphylococcus aureus является наиболее распространенной причиной нозокомиальных инфекций со значительной заболеваемостью и смертностью. Он является причиной некоторых случаев остеомиелита, эндокардита, септического артрита, пневмонии, абсцессов и синдрома токсического шока. S. aureus могут выживать на сухих поверхностях, что повышает вероятность передачи. Любая инфекция S. aureus может вызывать стафилококковый ожогоподобный кожный синдром, кожную реакцию на экзотоксин, абсорбированный в кровоток. Он также может вызывать тип септицемии, названный пиемией, который может угрожать жизни. К сожалению, метициллин-резистентный Staphylococcus aureus (MRSA) становится основной причиной госпитальных инфекций.

Инфекции S. aureus и S. epidermidis, как правило, лечат антибиотиками, при этом пенициллин является лекарственным средством выбора, в то время как ванкомицин используют для метициллин-резистентных изолятов. Процент стафилококковых штаммов, проявляющих резистентность широкого спектра к антибиотикам, все увеличивается, что представляет угрозу для эффективной противомикробной терапии. Кроме того, недавнее появление ванкомицин-резистентного штамма S. aureus вызывает опасения, что появятся и распространятся штаммы MRSA, для которых не существует доступной эффективной терапии.

На стадии разработки находится альтернативное лечение стафилококковых инфекций антибиотиками, в котором используют антитела против стафилококковых антигенов. Эта терапия включает введение поликлональных антисывороток (WO 00/15238, WO 00/12132) или лечение моноклональными антителами против липотейхоевой кислоты (WO 98/57994).

Альтернативным подходом будет использование активной вакцинации для достижения иммунного ответа против стафилококков. Геном S. aureus секвенирован и многие кодирующие последовательности идентифицированы (WO 02/094868, EP 0786519), что может привести к идентификации потенциальных антигенов. То же верно и для S. epidermidis (WO 01/34809). Как усовершенствование этого подхода, идентифицированы белки, распознаваемые гипериммунными сыворотками от пациентов, страдающих стафилококковой инфекцией (WO 01/98499, WO 02/059148).

S. aureus секретирует множество факторов вирулентности во внеклеточную среду (Archer, 1998; Dinges et al., 2000; Foster, 2005; Shaw et al., 2004; Sibbald et al., 2006). Как и большинство секретируемых белков, эти факторы вирулентности транслоцируются с помощью аппарата Sec через плазматическую мембрану. Белки, секретируемые аппаратом Sec, несут N-концевой лидерный пептид, удаляемый лидер-

ной пептидазой, после попадания пре-белка в транслокон Sec (Dalbey and Wickner, 1985; van Wely et al., 2001). Недавний геномный анализ позволяет предположить, что Actinobacteria и представители типа Firmicutes кодируют дополнительную систему секреции, распознающую подгруппу белков Sec-независимым образом (Pallen, 2002). ESAT-6 (ранний секретируемый антиген-мишень 6 кДа) и CFP-10 (антиген фильтрата культуры 10 кДа) Mycobacterium tuberculosis представляют собой первые субстраты этой новой системы секреции, обозначенной как ESX-1 или Snm в M. tuberculosis (Andersen et al., 1995; Hsu et al., 2003; Pym et al., 2003; Stanley et al., 2003). В S. aureus два подобных ESAT-6 фактора, обозначенные как EsxA и EsxB, секретируются путем Ess (система секреции ESAT-6) (Burts et al., 2005).

Первое поколение вакцин, направленных против S. aureus или против продуцируемых ими экзобелков, имели ограниченный успех (Lee, 1996). Сохраняется потребность в разработке эффективных вакцин против стафилококковых инфекций. Также необходимы дополнительные композиции для лечения стафилококковых инфекций.

На всем протяжении настоящей заявки термин "приблизительно" используют в соответствии с его общепринятым значением в области клеточной и молекулярной биологии для указания того, что значение включает стандартное отклонение ошибки для устройства или способа, используемого для определения значения.

Термины в единственном числе при использовании в комбинации с термином "содержащий" могут означать "один", но также они соответствуют значению "один или более", "по меньшей мере один" и "один или более одного".

В рамках изобретения термины "или" и "и/или" используют для описания множества компонентов в комбинации или исключая друг друга. Например, "x, y и/или z" может относиться к только "x", только "y", только "z", "x, y и z," "(x и y) или z," "x или (y и z)" или "x, или y, или z". Конкретно предполагают, что x, y или z можно конкретно исключать из варианта осуществления.

Термины "содержащий" (и любая форма термина "содержащий", такая как "содержат" и "содержит"), "имеющий" (и любая форма термина "имеющий", такая как "имеют" и "имеет"), "включающий" (и любая форма термина "включающий", такая как "включает" и "включают"), "отличающийся" (и любая форма, включая, например, "характеризующийся как"), являются инклюзивными или неограничивающими и не исключают дополнительных, неперечисленных элементов или стадий способа.

Композиции и способы их использования могут "содержать", "состоять, по существу, из" или "состоять из" любых из ингредиентов или стадий, описанных на всем протяжении настоящего описания. Фраза "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный конкретно. Фраза "состоящий, по существу, из" ограничивает объем описываемого объекта изобретения до конкретных материалов или стадий и материалов или стадий, не влияющих существенно на основные и новые характеристики. Предполагают, что варианты осуществления, описанные в контексте термина "содержащий", также могут быть реализованы в отношении термина "состоящий из" или "состоящий, по существу, из".

Конкретно предполагают, что любое ограничение, обсужденное в контексте одного из вариантов осуществления изобретения, можно использовать в отношении любого другого варианта осуществления изобретения. Кроме того, любую композицию по изобретению можно использовать в любом способе по изобретению, и любой способ по изобретению можно использовать для получения или использования любой композиции по изобретению. Аспекты варианта осуществления, приведенные в примерах, также являются вариантами осуществления, которые могут быть реализованы в контексте вариантов осуществления, обсужденных где-либо в другом примере или где-либо в заявке, например, в сущности изобретения, подробном описании вариантов осуществления, формуле изобретения и кратком описании чертежей.

Другие цели, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя в них и указаны конкретные варианты осуществления изобретения, приведены исключительно в иллюстративных целях, т.к. различные изменения и модификации в рамках сущности и объема изобретения будут очевидны специалистам в этой области из этого подробного описания.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для улучшенных вариантов белка A со сниженным связыванием с VH3 иммуноглобулинов для снижения их токсигенности, но со стимуляцией гуморальных иммунных ответов, защищающих от стафилококкового заболевания. В некоторых вариантах осуществления улучшенный вариант белка A стимулирует гуморальные иммунные ответы, которые могут (i) предотвращать колонизацию и (ii) приводить к деколонизации активно колонизированных индивидуумов.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы включают выделенный полипептид, содержащий вариант белка A (SpA), имеющий (i) замены лизина остатками глутамина в каждом из доменов A-E, соответствующие положениям 9 и 10 в домене D, и (ii) замены глутамата в каждом из доменов A-E, соответствующие положению 33 в домене D, где полипептид, относительно отрицательного контроля, не приводит к детектируемой перекрестной сшивке IgG и IgE в крови или не активирует базофилы или тучные клетки. В некоторых вариантах осуществления область варианта SpA рассматривают как не сшивающую перекрестно IgG и/или IgE в крови и/или не активирующую базофилы настолько, чтобы

вызывать значительные проблемы с безопасностью или токсичностью для пациентов-людей или вызывать значительный риск анафилактического шока у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания K_A для VH3 из IgG человека снижена по сравнению с вариантом SpA, состоящим из замен лизина остатками глутамина в каждом из доменов A-E, соответствующих положению 9 и 10 в домене D, и замен аланина аспарагиновой кислотой в доменах A-E, соответствующих положениям 36 и 37 домена D (SpA_{KKAA}). В некоторых вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_A для VH3 из IgG человека, сниженную по меньшей мере в 2 раза по сравнению с SpA_{KKAA}. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания K_A можно измерять любым способом, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_A для VH3 из IgG человека, сниженную по меньшей мере в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3 или более раз (включая любой диапазон, получаемый из этих значений) по сравнению с $SpA_{KKAA.}$ В некоторых вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_A для VH3 из IgG человека, сниженную по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300% или более (включая любой диапазон, получаемый из этих значений) по сравнению с SpA_{KKAA}. Разумеется, следует понимать, что сравнение осуществляют с использованием тех же или сравнимых анализов. В некоторых вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_A для VH3 из IgG человека, составляющую менее приблизительно 1×10^5 M^{-1}. В некоторых вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_A для VH3 IgG человека, составляющую менее приблизительно 3, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,70,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, $0,1\times10^5$ M^{-1} (включая любой диапазон, получаемый из этих значений). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид, содержащий вариант SpA, не имеет замен в любом из доменов A-E, соответствующих положениям 36 и 37 в домене D. В некоторых вариантах осуществления единственными заменами в варианте SpA являются (i) замены лизина остатками глутамина в каждом из доменов A-E, соответствующие положениям 9 и 10 в домене D, и (ii) замены глутамата в каждом из доменов A-E, соответствующие положению 33 в домене D (обозначаемый как $SpA_{Q9,10K/S33E}$). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид состоит из варианта SpA. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид состоит из $SpA_{Q9,10K/S33E.}$

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенному полипептиду, содержащему вариант белка A (SpA), имеющий (i) замены лизина остатками глутамина в каждом из доменов A-E, соответствующие положениям 9 и 10 в домене D, и (ii) замены треонина в каждом из доменов A-E, соответствующие положению 33 в домене D, где полипептид, относительно отрицательного контроля, не приводит к детектируемой перекрестной сшивке IgG и IgE в крови или не активирует базофилы или тучные клетки. В некоторых вариантах осуществления область варианта SpA рассматривают как не сшивающую перекрестно IgG и/или IgE в крови и/или не активирующую базофилы настолько, чтобы вызывать значительные проблемы с безопасностью или токсичностью для людей-пациентов или вызывать значительный риск анафилактического шока у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания K_A для VH3 из IgG человека снижена по сравнению с вариантом SpA, состоящим из замены лизина остатками глутамина в каждом из доменов A-E, соответствующей положению 9 и 10 в домене D, и замены аланина аспарагиновой кислотой в доменах A-E, соответствующие положению 36 и 37 домена D (SpA_{KKAA}). В некоторых вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_A для VH3 из IgG человека, сниженную по меньшей мере в 2 раза по сравнению с $SpA_{KKAA.}$ В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания K_A можно измерять любым способом, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_A для VH3 из IgG человека, сниженную по меньшей мере в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3 раз или более (включая любой диапазон, получаемый из этих значений) по сравнению с $SpA_{KKAA.}$ В некоторых вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_A для VH3 из IgG человека, сниженную по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300% или более (включая любой диапазон, получаемый из этих значений) по сравнению с SpA_{KKAA}. Разумеется, следует понимать, что сравнение осуществляют с использованием тех же или сравнимых анализов. В некоторых вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_A для VH3 из IgG человека менее приблизительно 1×10^5 M^{-1}. В некоторых вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_A для VH3 IgG человека менее 3, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,70,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, $0,1\times10^5$ M^{-1} (включая любой диапазон, получаемый из этих значений). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид, содержащий вариант SpA, неимеющий замен в любом из доменов A-E, соответствующих положениям 36 и 37 в домене D. В некоторых вариантах осуществления единственными заменами в варианте SpA являются (i) замены лизина остатками глутамин в каждом из доменов A-E, соответствующие положениям 9 и 10 в домене D, и (ii) замены треонина в каждом из доменов A-E, соответствующие положению 33 в домене D (обозначаемые как $SpA_{Q9,10K/S33T}$). В некото-

рых вариантах осуществления выделенный полипептид состоит из варианта SpA. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид состоит из $SpA_{Q9,10K/S33T}$.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы включают $SpA_{Q9,10K/S33E}$. Любой вариант осуществления, описанный ниже в контексте варианта SpA, можно реализовывать конкретно с $SpA_{Q9,10K/S33E}$, имеющим критическое преимущество сниженной активности, ассоциированной с токсичностью и/или анафилактическим шоком. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам индуцирования безопасного иммунного ответа против бактерий Staphylococcus в пациента-человека, включающие введение пациенту-человеку эффективного количества композиции, содержащей $SpA_{Q9,10K/S33E}$. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам индуцирования безопасного иммунного ответа против бактерий Staphylococcus у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей $SpA_{Q9,10K/S33E}$. Индивидуум может являться лабораторным животным или промышленным животным, таким как корова, свинья, овца, коза или любое другое животное, выращенное для потребления человеком и которое может страдать стафилококковыми инфекциями, такими как мастит.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы включают $SpA_{Q9,10K/S33E}$. Любой вариант осуществления, описанный ниже в контексте варианта SpA, можно реализовывать конкретно с $SpA_{Q9,10K/S33T}$, имеющим критическое преимущество сниженной активности, ассоциированной с токсичностью и/или анафилактическим шоком. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам индуцирование безопасного иммунного ответа против бактерий Staphylococcus у пациента-человека, включающим введение пациенту-человеку эффективного количества композиции, содержащей $SpA_{Q9,10K/S33T}$.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы включают выделенный полипептид, содержащий вариант белка A (SpA), имеющий (i) замены лизина остатками глутамина, соответствующие положениям 9 и 10 в каждом из доменов A-E, и (ii) по меньшей мере одну другую замену аминокислоты, соответствующую положению 29 и/или 33 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E, где вариант SpA имеет аффинность связывания K_D для VH3 из IgG человека более $1{,}0\times10^{-4}$ M. В тех же или дополнительных вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_D для VH3 из IgE человека более $1{,}0\times10^{-6}$ M.

Варианты осуществления включают получение вариантов белка A, являющихся безопасными для использования у людей, в частности, вариантов, не связывающихся для перекрестной сшивки вариантов тяжелых цепей VH3 идиотипических молекул IgG и IgE, связанных с Fc-рецепторами на поверхности иммунных клеток, способных высвобождать иммунные медиаторы, такие как гистамин, запускающий транссудацию и анафилактические реакции.

Замены аминокислот осуществляют в каждом из доменов A, B, C, D и E (домены A-E) варианта SpA, что означает, что заменяют аминокислоты, соответствующие остаткам глутамина в положениях 9 и 10, как они пронумерованы в домене D, представляющем собой SEQ ID NO: 2; те же замены аминокислот осуществляют в соответствующих аминокислотах в доменах A, B, C и E. Варианты осуществления касаются SpA, в которых остатки лизина заменены в каждом из доменов A-E остатками глутаминовой кислоты, соответствующими положениям 9 и 10 в домене D.

В некоторых вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_D для VH3 из IgG человека более приблизительно $1{,}0\times10^{-4}$ M, $5{,}0\times10^{-4}$ M, $1{,}0\times10^{-3}$ M, $5{,}0\times10^{-3}$ M, $1{,}0\times10^{-2}$ M, $5{,}0\times10^{-2}$ M, $1{,}0\times10^{-1}$ M, $5{,}0\times10^{-1}$ M (включая любой диапазон, получаемый из этих значений). В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания для VH3 из IgG человека составляет более приблизительно $1{,}0\times10^{-2}$ M или $5{,}0\times10^{-2}$ M. В тех же или дополнительных вариантах осуществления вариант SpA имеет аффинность связывания K_D для VH3 из IgE человека более приблизительно $1{,}0\times10^{-6}$ M, $5{,}0\times10^{-6}$ M, $1{,}0\times10^{-5}$ M, $5{,}0\times10^{-5}$ M, $1{,}0\times10^{-4}$ M, $5{,}0\times10^{-4}$ M, $1{,}0\times10^{-3}$ M, $5{,}0\times10^{-3}$ M, $1{,}0\times10^{-2}$ M, $5{,}0\times10^{-2}$ M,$1{,}0\times10^{-1}$ M или $5{,}0\times10^{-1}$ M (включая любой диапазон, получаемый из этих значений). Аффинность SpA и его варианта к IgG можно измерять с использованием очищенного IgG человека (из объединенной сыворотки) и очищенных моноклональных антител человека (клонального антитела VH3 IgG1 человека трастузумаба и IgE трастузумаба). Используемыми анализами могут являться ELISA и/или поверхностный плазмонный резонанс.

В конкретных вариантах осуществления вариант SpA содержит замену аминокислоты, соответствующую положению 29 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E. В некоторых случаях замена аминокислоты, соответствующая положению 29, представляет собой аланин, лейцин, пролин, фенилаланин, глутаминовую кислоту, аргинин, лизин, серин, треонин или глутамин. В некоторых вариантах осуществления вариант SpA содержит замену аминокислоты, соответствующую положению 29, представляющую собой аланин, фенилаланин или аргинин. В других вариантах осуществления не заменяют ничем из следующего: лейцина, пролина, глутаминовой кислоты, лизина, серина, треонина или глутамина. В некоторых вариантах осуществления вариант SpA содержит замену аминокислоты, соответствующую положению 33 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E. В конкретных вариантах осуществления замена аминокислоты, соответствующая положению 33, является заменой аланином, фенилаланином, глутаминовой

кислотой, лизином или глутамином. В конкретных случаях замена является заменой фенилаланином, глутаминовой кислотой или глутамином. В других вариантах осуществления замена не является заменой аланином или лизином. В некоторых вариантах SpA существуют замены, представленные в настоящем описании, соответствующие положениям 29 и 33 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E. Их можно комбинировать или не комбинировать с заменой аминокислоты, соответствующей одному или обоим положениям 36 и 37 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E. В некоторых случаях существуют замены в обоих положениях 36 и 37. В некоторых случаях замены аминокислот, соответствующие положениям 36 и 37, представляют собой замены остатков аланина остатками аспарагиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления полипептид варианта SpA содержит варианты доменов A-E (что означает полипептид с вариантом домена A, вариантом домена B, вариантом домена C, вариантом домена D и вариантом домена E), и каждый из вариантов доменов является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 96%, идентичным полипептиду домена D (SEQ ID NO: 2), домена E (SEQ ID NO: 3), домена A (SEQ ID NO: 4), домена C (SEQ ID NO: 5), домена B (SEQ ID NO: 6) белка A. Альтернативно, полипептид варианта SpA содержит варианты доменов A-E (что означает полипептид с вариантом домена A, вариантом домена B, вариантом домена C, вариантом домена D и вариантом домена E), и каждый из вариантов доменов является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным полипептиду домена D (SEQ ID NO: 2), домена E (SEQ ID NO: 3), домена A (SEQ ID NO: 4), домена C (SEQ ID NO: 5), домена B (SEQ ID NO: 6) белка A в отношении иных аминокислот, чем указанные конкретно как имеющие замену аминокислоты. Другими словами, вариант SpA с заменами в положениях 9, 10 и 29 может иметь домены A-E, в остальном на 100% идентичные последовательностям не-варианта. В некоторых вариантах осуществления, например, вариант SpaA содержит варианты доменов A-E, несодержащие какие-либо замены аминокислот в SEQ ID NO: 2, за исключением соответствующих положениям 9, 10, 29, 33, 36 и/или 37.

В конкретных вариантах осуществления вариант SpaA содержит варианты доменов A-E, состоящие исключительно из замен аминокислот, соответствующих положениям 9, 10 и 29 в SEQ ID NO: 2. В некоторых других вариантах осуществления вариант SpaA содержит варианты доменов A-E, состоящие исключительно из замен аминокислот, соответствующих положениям 9, 10 и 33 в SEQ ID NO: 2. В дополнительных вариантах осуществления вариант SpaA содержит варианты доменов A-E, состоящие исключительно из замен аминокислот, соответствующих положениям 9, 10, 29 и 33 в SEQ ID NO: 2. Кроме того, другие варианты осуществления относятся к варианту SpaA, содержащему варианты доменов A-E, состоящие исключительно из замен аминокислот, соответствующих положениям 9, 10, 29, 36 и 37 в SEQ ID NO: 2. В дополнительных вариантах осуществления вариант SpaA содержит варианты доменов A-E, состоящие исключительно из замен аминокислот, соответствующих положениям 9, 10, 33, 36 и 37 в SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления вариант SpaA содержит варианты доменов A-E, состоящие исключительно из замен аминокислот, соответствующих положениям 9, 10, 29, 33, 36 и 37 в SEQ ID NO: 2.

В дополнительных вариантах осуществления вариант SpA является частью выделенного полипептида. Выделенный полипептид может включать или не включать область, не полученную из белка A. В некоторых случаях сегмент не-белка A является сегментом второго антигена, который может являться или не являться сегментом стафилококкового антигена. В некоторых вариантах осуществления сегмент может содержать сегмент Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB и/или SasF.

Варианты осуществления включают использование вариантов белка A в способах и композициях для лечения бактериальной и/или стафилококковой инфекции. Настоящая заявка также относится к иммуногенной композиции, содержащей вариант белка A или его иммуногенный фрагмент. В некоторых аспектах иммуногенный фрагмент является сегментом домена D белка A. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам и композициям, которые можно использовать для лечения (например, ограничения образования и/или персистирования стафилококковых абсцессов у индивидуума) или профилактике бактериальной инфекции. В некоторых случаях способы стимуляции иммунного ответа включают введение индивидууму эффективного количества композиции, включающей или кодирующей весь или часть полипептида или антигена варианта белка A и, в некоторых аспектах, другие бактериальные белки. Другие бактериальные белки включают, в качестве неограничивающих примеров, (i) секретируемый фактор вирулентности и/или белок или пептид поверхности клетки или (ii) рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую секретируемый фактор вирулентности и/или белок или пептид поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам, включающим вариант SpA. Способы включают способы лечения стафилококковой инфекции у индивидуума, индуцирования иммунного ответа против бактерий Staphylococcus у индивидуума, профилактики стафилококковой инфекции у индивидуума, профилактики колонизации или реколонизации бактерий Staphylococcus у индивидуума, снижения колонизации или реколонизации бактерий Staphylococcus у индивидуума, лечения стафилококковой инфекции у индивидуума без значительной токсичности и/или индуцирования уничтожения стафилококковых бактерий у индивидуума. Стадии могут включать введение эффективного количества варианта SpA или композиции, содержащей вариант SpA, индивидууму. Индивидуум мо-

жет нуждаться в лечении или профилактике из-за существующей инфекции или риска инфекции.

В некоторых вариантах осуществления индивидуум не демонстрирует какие-либо признаки токсичности по причине выделенного полипептида или композиции. В дополнительных вариантах осуществления индивидуум не демонстрирует какие-либо признаки анафилактического шока по причине выделенного полипептида или композиции. В некоторых вариантах осуществления индивидуума оценивают на признаки токсичности, которые могут включать признаки анафилактического шока.

Полипептид можно составлять в фармацевтически приемлемой композиции. Композиция может дополнительно содержать один или более из по меньшей мере или по большей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 дополнительных стафилококковых антигенов или их иммуногенных фрагментов (например, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla (например, мутанты H35), IsdC, SasF, vWbp или vWh). Дополнительные стафилококковые антигены, которые можно использовать в комбинации с вариантом белка A, включают, в качестве неограничивающих примеров, витронектин-связывающий белок 52кДа (WO 01/60852), Aaa (GenBank CAC80837), Aap (регистрационный номер GenBank AJ 249487), Ant (регистрационный номер GenBank NP_372518), аутолизин-глюкозаминидазу, аутолизин-амидазу, Cna, коллаген-связывающий белок (US 6288214), EFB (FIB), эластин-связывающий белок (EbpS), EPB, FbpA, фибриноген-связывающий белок (US 6008341), фибронектин-связывающий белок (US 5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, иммунодоминантный транспортер ABC, IsaA/PisA, рецептор ламинина, липазу GehD, MAP, транспортер Mg^{2+}, аналог MHC II (US5648240), MRPII, Npase, РНК III-активирующий белок (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF(WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), экзотоксины SEA (WO 00/02523), экзотоксины SEB (WO 00/02523), транспортер SitC и Ni ABC, SitC/MntC/связывающий белок слюны (US 5801234), SsaA, SSP-1, SSP-2 и/или витронектин-связывающий белок (см. публикации PCT №№ WO 2007/113222, WO 2007/113223, WO 2006/032472, WO 2006/032475, WO 2006/032500, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Стафилококковый антиген или иммуногенный фрагмент можно вводить одновременно с вариантом белка A. Стафилококковый антиген или иммуногенный фрагмент и вариант белка A можно вводить в одной композиции. Вариант белка A также может являться рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант белка A. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты может кодировать вариант белка A и по меньшей мере один стафилококковый антиген или его иммуногенный фрагмент. В рамках изобретения термин "модулировать" или "модуляция" включает значения терминов "усиливать" или "ингибировать". "Модуляция" активности может представлять собой повышение или снижение активности. В рамках изобретения термин "модулятор" относится к соединениям, влияющим на функцию вещества, включая положительную регуляцию, индуцирование, стимуляцию, потенциирование, ингибирование, отрицательную регуляцию или супрессию белка, нуклеиновой кислоты, гена, организма или т.п.

В некоторых вариантах осуществления в способах и композициях используют, или они включают или кодируют весь вариант белка A или антиген или его часть. В других аспектах вариант белка A можно использовать в комбинации с секретируемыми факторами или антигенами поверхности, включая, в качестве неограничивающих примеров, один или более из выделенного полипептида Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp или vWh или его иммуногенного сегмента. Дополнительные стафилококковый антигены, которые можно использовать в комбинации с вариантом белка A, включают, в качестве неограничивающих примеров, витронектин-связывающий белок 52кДа (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, аутолизин-глюкозаминидазу, аутолизин-амидазу, Cna, коллаген-связывающий белок (US 6288214), EFB (FIB), эластин-связывающий белок (EbpS), EPB, FbpA, фибриноген-связывающий белок (US 6008341), фибронектин-связывающий белок (US 5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, иммунодоминантный транспортер ABC, IsaA/PisA, рецептор ламинина, липазу GehD, MAP, транспортер Mg^{2+}, аналог MHC II (US5648240), MRPII, Npase, РНК III-активирующий белок (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), экзотоксины SEA (WO 00/02523), экзотоксины SEB (WO 00/02523), транспортер SitC и Ni ABC, SitC/MntC/связывающий белок слюны (US 5801234), SsaA, SSP-1, SSP-2 и/или витронектин-связывающий белок. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более из Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, витронектин-связывающего белка 52кДа (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, аутолизин-глюкозаминидазы, аутолизин-амидазы, Cna, коллаген-связывающего белка (US 6288214), EFB (FIB), эластин-связывающего белка (EbpS), EPB, FbpA, фибриноген-связывающего белка (US6008341), фибронектин-связывающего белка (US 5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, иммунодоминантного транспортера ABC, IsaA/PisA, рецептора ламинина, липазы GehD, MAP, транспортера Mg^{2+}, аналога MHC II (US 5648240), MRPII, Npase, РНК III-активирующего белка (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), экзотоксинов SEA (WO 00/02523), экзотоксинов SEB (WO 00/02523), транспортера SitC и Ni ABC, SitC/MntC/связывающего белка слюны (US 5801234), SsaA, SSP-1, SSP-2 и/или витронектин-связывающего белка можно конкретно исключать из состава.

В дополнительных аспектах выделенный вариант белка А является мультимеризованным, например, димеризованным или линейным слитым белком из двух или более полипептидов или пептидных сегментов. В некоторых аспектах изобретения композиция содержит мультимеры или конкатемеры из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более выделенных белков поверхности клетки или его сегментов. Конкатемеры являются линейными полипептидами, имеющими одну или более повторяющихся пептидных единиц. Полипептиды SpA или фрагменты могут являться последовательными или разделенными спейсером или другими пептидными последовательностями, например, одним или более дополнительными бактериальными пептидами. В дополнительном аспекте другие полипептиды или пептиды, содержащиеся в мультимере или конкатемере, могут включать, в качестве неограничивающих примеров 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 из Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh или их иммуногенных фрагментов. Дополнительные стафилококковый антигены, которые можно использовать в комбинации с вариантом белка А, включают, в качестве неограничивающих примеров, витронектин-связывающий белок 52кДа (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, аутолизин-глюкозаминидазу, аутолизин-амидазу, Cna, коллаген-связывающий белок (US 6288214), EFB (FIB), эластин-связывающий белок (EbpS), EPB, FbpA, фибриноген-связывающий белок (US 6008341), фибронектин-связывающий белок (US 5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, иммунодоминантный транспортер ABC, IsaA/PisA, рецептор ламинина, липазу GehD, MAP, транспортер Mg^{2+}, аналог MHC II (US 5648240), MRPII, Npase, РНК III-активирующий белок (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), экзотоксины SEA (WO 00/02523), экзотоксины SEB (WO 00/02523), транспортер SitC и Ni ABC, SitC/MntC/связывающий белок слюны (US 5801234), SsaA, SSP-1, SSP-2 и/или витронектин-связывающий белок.

Термин "вариант белка А" или "вариант SpA" относится к полипептидам, включающим домен SpA IgG, имеющий две или более замены аминокислот, нарушающие связывание с Fc и V_H3. В определенном аспекте вариант SpA включает вариант пептида домена D, а также варианты полипептидов SpA и их сегментов, являющихся нетоксикогенными и стимулирующих иммунный ответ против белка А бактерий Staphylococcus и/или бактерий, экспрессирующих его.

Варианты осуществления также включают способы индуцирования иммунного ответа против бактерий Staphylococcus или стафилококков у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества варианта белка А или его сегмента. В некоторых аспектах способы индуцирования иммунного ответа против бактерий Staphylococcus или стафилококков у индивидуума включают введение индивидууму эффективного количества 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или более секретируемых белков и/или белков поверхности клетки или их сегментов/фрагментов. Секретируемый белок или белок поверхности клетки включает, в качестве неограничивающих примеров, белки Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp и/или vWh и их иммуногенные фрагменты. Дополнительные стафилококковые антигены, которые можно использовать в комбинации с вариантом белка А, включают, в качестве неограничивающих примеров, витронектин-связывающий белок 52кДа (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, аутолизин-глюкозаминидазу, аутолизин-амидазу, Cna, коллаген-связывающий белок (US 6288214), EFB (FIB), эластин-связывающий белок (EbpS), EPB, FbpA, фибриноген-связывающий белок (US 6008341), фибронектин-связывающий белок (US 5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, иммунодоминантный транспортер ABC, IsaA/PisA, рецептор ламинина, липазу GehD, MAP, транспортер Mg^{2+}, аналог MHC II (US 5648240), MRPII, Npase, РНК III-активирующий белок (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), экзотоксины SEA (WO 00/02523), экзотоксины SEB (WO 00/02523), транспортер SitC и Ni ABC, SitC/MntC/связывающий белок слюны (US 5801234), SsaA, SSP-1, SSP-2 и/или витронектин-связывающий белок.

Варианты осуществления, включающие варианты осуществления способа, композиции и полипептида, включают конкретные варианты осуществления, в которых бактерии Staphylococcus включают штамм WU1 или JSNZ Staphylococcus aureus. В некоторых вариантах осуществления бактерии Staphylococcus включают изолят типа ST88.

В некоторых вариантах осуществления индивидуум или пациент, представленный в настоящем описании, такой как пациент-человек является педиатрическим пациентом. Педиатрический пациент является пациентом, определенным как имеющий возраст менее 18 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет по меньшей мере или по большей мере 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 (включая любой диапазон, получаемый из этих значений). В некоторых вариантах осуществления педиатрический пациент имеет возраст 2 года или менее. В некоторых вариантах осуществления педиатрический пациент имеет возраст менее 1 года. В некоторых вариантах осуществления педиатрический пациент имеет возраст менее 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления педиатрический пациент имеет возраст 2 месяца или менее. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек имеет возраст 65 лет или более. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек является работником системы здравоохранения. В некоторых вариантах осуществ-

ления пациент является пациентом, которого будут подвергать хирургическому вмешательству.

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

Варианты осуществления включают композиции, включающие полипептид, пептид или белок, являющийся по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичным или схожим белку A, или второй белок или пептид, являющийся секретируемым бактериальным белком или бактериальным белком поверхности клетки. В дополнительном варианте осуществления композиция может включать полипептид, пептид или белок, являющийся по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичным или схожим с полипептидом домена D (SEQ ID NO: 2), домена E (SEQ ID NO: 3), домена A (SEQ ID NO: 4), домена C (SEQ ID NO: 5), домена B (SEQ ID NO: 6) белка A, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид домена D, домена E, домена A, домена C или домена B белка A. В некоторых аспектах сегмент полипептида белка A будет иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Сходство или идентичность, при этом идентичность является предпочтительной, являются известными в этой области, и можно использовать ряд различных программ для определения того, имеет ли белок (или нуклеиновая кислота) идентичность или сходство последовательности в отношении известной последовательности. Идентичность и/или сходство последовательности определяют с стандартными способами, известными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, алгоритм локальной идентичности последовательности Smith & Waterman (1981), алгоритм выравнивания последовательностей для определения идентичности Needleman & Wunsch (1970), поиск способом определения сходства Pearson & Lipman (1988), с помощью компьютеризированных воплощений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), программа для анализа последовательности Best Fit, описанная Devereux et al. (1984), предпочтительно, с использованием параметров по умолчанию или посредством наблюдения. Предпочтительно, процент идентичности вычисляют с использованием инструментов выравнивания, известных специалистам в этой области. Процент идентичности, по существу, представляет собой, количество идентичных аминокислот, разделенное на общее количество сравниваемых аминокислоты, умноженное на сотню.

Дополнительные варианты осуществления включают способы стимуляции у индивидуума протективного или терапевтического иммунного ответа против бактерий Staphylococcus, включающие введение индивидууму эффективного количества композиции, включающей (i) вариант SpA, например, полипептид доменов A-E варианта SpA или его пептид; или (ii) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую такой полипептид варианта SpA или его пептид, или (iii) введение полипептида домена D варианта SpA с любой комбинацией или пермутацией бактериальных белков, представленных в настоящем описании. В предпочтительном варианте осуществления композиция не представляет собой бактерию Staphylococcus. В некоторых аспектах индивидуум является человеком, или коровой, или свиньей, или овцой, или козой, или любым другим животным, выращенным для потребления человеком, и которое может страдать стафилококковыми инфекциями, такими как мастит. В дополнительном аспекте композицию составляют в фармацевтически приемлемом составе. Стафилококки могут представлять собой Staphylococcus aureus.

Дополнительные варианты осуществления включают вакцины, содержащие фармацевтически приемлемую композицию, содержащую выделенный полипептид варианта SpA или любую другую комбинацию или пермутацию белков или пептидов, представленных в настоящем описании, где композиция может стимулировать иммунный ответ против бактерий Staphylococcus. Вакцина может содержать выделенный полипептид варианта SpA или любую другую комбинацию или пермутацию описанных белков или пептидов. В некоторых аспектах изобретения выделенный полипептид варианта SpA или любая другая комбинация или пермутация описанных белков или пептидов являются мультимеризованными, например, димеризованными или конкатемеризованными. В дополнительном аспекте вакцинная композиция загрязнена на менее чем приблизительно 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,05% (включая любой диапазон, получаемый из этих значений) другими стафилококковыми белками. Композиция может дополнительно содержать выделенный не-SpA полипептид. Как правило, вакцина содержит адъювант. В некоторых аспектах белок или пептид по изобретению связан (ковалентно или нековалентно) с адъювантом, предпочтительно, адъювант химически конъюгирован с белком. В некоторых вариантах осуществления адъювант содержит алюмокалиевые квасцы. В некоторых вариантах осуществления адъювант содержит адъювант, представленный в настоящем описании.

В дополнительных вариантах осуществления вакцинная композиция является фармацевтически приемлемой композицией, содержащей рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую весь полипептид варианта SpA или его часть, или любую другую комбинацию или пермутацию белков или пептидов, представленных в настоящем описании, где композиция может стимулировать иммунный ответ против бактерий Staphylococcus. Вакцинная композиция может содержать рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую весь полипептид варианта SpA или его часть, или любую другую комбинацию или пермутацию белков или пептидов, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит гетерологичный промотор. Предпочтительно, рекомбинантная нуклеиновая кислота является вектором. Более предпочтительно, вектор является плазмидой или вирусным вектором. В некоторых аспектах вакцина включает рекомбинантный, нестафилококковую бактерию, содержащую нуклеиновую кислоту. Рекомбинантные не-стафилококки могут представлять собой Salmonella или другие грамположительные бактерии. Вакцина может содержать фармацевтически приемлемый эксципиент, более предпочтительно - адъювант. В некоторых вариантах осуществления адъювант содержит алюмокалиевые квасцы или адъювант, представленный в настоящем описании.

Дополнительные варианты осуществления включают способы стимуляции у индивидуума протективного или терапевтического иммунного ответа против бактерий Staphylococcus, включающие введение индивидууму эффективного количества композиции полипептида варианта SpA или его сегмента/фрагмента, дополнительно содержащей один или более из белка Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp или vWh или его пептида. В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит нестафилококковую бактерию. В дополнительном аспекте композицию составляют в фармацевтически приемлемом составе. Стафилококки, по причине которых индивидуума лечат, могут представлять собой Staphylococcus aureus. Способы по изобретению также включают композиции варианта SpA, содержащие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или более секретируемых факторов вирулентности и/или белков поверхности клетки, таких как Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp или vWh, в различных комбинациях. В некоторых аспектах состав вакцины включает Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp и vWh. В некоторых аспектах комбинация антигенов может включать (1) вариант SpA и IsdA; (2) вариант SpA и ClfB; (3) вариант SpA и SdrD; (4) вариант SpA и Hla или вариант Hla; (5) вариант SpA и ClfB, SdrD и Hla или вариант Hla; (6) вариант SpA, IsdA, SdrD и Hla или вариант Hla; (7) вариант SpA, IsdA, ClfB и Hla или вариант Hla; (8) вариант SpA, IsdA, ClfB и SdrD; (9) вариант SpA, IsdA, ClfB, SdrD и Hla или вариант Hla; (10) вариант SpA, IsdA, ClfB и SdrD; (11) вариант SpA, IsdA, SdrD и Hla или вариант Hla; (12) вариант SpA, IsdA и Hla или вариант Hla; (13) вариант SpA, IsdA, ClfB и Hla или вариант Hla; (14) вариант SpA, ClfB и SdrD; (15) вариант SpA, ClfB и Hla или вариант Hla; или (16) вариант SpA, SdrD и Hla или вариант Hla.

В некоторых аспектах бактерия, с помощью которой доставляют композицию по изобретению, будет ограничена или аттенуирована в отношении пролонгированного или персистирующего роста или образования абсцесса. В еще одном дополнительном аспекте варианты SpA могут быть гиперэкспрессированы в аттенуированной бактерии для дополнительного усиления или дополнения иммунного ответа или состава вакцины.

Термин "белок EsxA" относится к белку, включающему выделенные полипептиды EsxA дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков EsxA бактерий Staphylococcus.

Термин "белок EsxB" относится к белку, включающему выделенные полипептиды EsxB дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков EsxB бактерий Staphylococcus.

Термин "белок SdrD" относится к белку, включающему выделенный полипептиды SdrD дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков SdrD бактерий Staphylococcus.

Термин "белок SdrE" относится к белку, включающему выделенные полипептиды SdrE дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков SdrE бактерий Staphylococcus.

Термин "белок IsdA" относится к белку, включающему выделенные полипептиды IsdA дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков IsdA бактерий Staphylococcus.

Термин "белок IsdB" относится к белку, включающему выделенные полипептиды IsdB дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков IsdB бактерий Staphylococcus.

Термин "белок Eap" относится к белку, включающему выделенные полипептиды Eap дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков Eap бактерий Staphylococcus.

Термин "белок Ebh" относится к белку, включающему выделенные полипептиды Ebh дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков Ebh бактерий Staphylococcus.

Термин "белок Emp" относится к белку, включающему выделенные полипептиды Emp дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков Emp бактерий Staphylococcus.

Термин "белок EsaB" относится к белку, включающему выделенные полипептиды EsaB дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков EsaB бактерий Staphylococcus.

Термин "белок EsaC" относится к белку, включающему выделенные полипептиды EsaC дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков EsaC бактерий Staphylococcus.

Термин "белок SdrC" относится к белку, включающему выделенные полипептиды SdrC дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков SdrC бактерий Staphylococcus.

Термин "белок ClfA" относится к белку, включающему выделенные полипептиды ClfA дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков ClfA бактерий Staphylococcus.

Термин "белок ClfB" относится к белку, включающему выделенные полипептиды ClfB дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков ClfB бактерий Staphylococcus.

Термин "белок Coa" относится к белку, включающему выделенные полипептиды Coa дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков Coa бактерий Staphylococcus.

Термин "белок Hla" относится к белку, включающему выделенные полипептиды Hla дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков Hla бактерий Staphylococcus.

Термин "белок IsdC" относится к белку, включающему выделенные полипептиды IsdC дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков IsdC бактерий Staphylococcus.

Термин "белок SasF" относится к белку, включающему выделенные полипептиды SasF дикого типа из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков SasF бактерий Staphylococcus.

Термин "белок vWbp" относится к белку, включающему выделенные полипептиды vWbp дикого типа (белка, связывающего фактор фон Виллебранда) из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков vWbp бактерий Staphylococcus.

Термин "белок vWh" относится к белку, включающему выделенные полипептиды vWh дикого типа (гомолога белка, связывающего фактор фон Виллебранда) из бактерий Staphylococcus и их сегменты, а также варианты, стимулирующие иммунный ответ против белков vWh бактерий Staphylococcus.

Термин "иммунный ответ" относится к гуморальному ответу, клеточному ответу или и гуморальному, и клеточному ответу в организме. Иммунный ответ можно измерять с помощью анализов, включающих, в качестве неограничивающих примеров, анализы, в которых измеряют наличие или количество антител, специфически распознающих белок или белок поверхности клетки, анализы, в которых измеряют активацию или пролиферацию Т-клеток, и/или анализы, в которых измеряют модуляцию в терминах активности или экспрессии одного или более цитокинов.

В некоторых аспектах полипептид или сегмент/фрагмент может иметь последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере 99% или более идентичной аминокислотной последовательности референсного полипептида. Термин "сходство" относится к полипептиду, имеющему последовательность, имеющую некоторый процент аминокислот, являющихся идентичными референсному полипептиду или представляющих собой консервативные замены относительно референсных полипептидов.

Полипептиды, представленные в настоящем описании, могут включать или исключать аминокислоты в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 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, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245,

246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1000 или более смежных аминокислот, включая любой диапазон, получаемый из этих значений, SEQ ID NO: 1-6.

Полипептидный сегмент, как представлено в настоящем описании, может включать 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 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, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1000 или более смежных аминокислот, включая любой диапазон, получаемый из этих значений, SEQ ID NO: 1-6.

Композиции можно составлять в фармацевтически приемлемой композиции. В некоторых аспектах изобретения бактерия Staphylococcus является бактерией S. aureus.

В дополнительных аспектах композицию можно вводить индивидууму более одного раза и ее можно вводить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более раз. Введение композиций включают, в качестве неограничивающих примеров, пероральное, парентеральное, подкожное, внутримышечное, внутривенное введение или различные их комбинации, включая ингаляцию или аспирацию.

В дополнительных вариантах осуществления композиция содержит рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, представленный в настоящем описании, или его сегменты/фрагменты. Как правило, рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, представленный в настоящем описании, содержит гетерологичный промотор. В некоторых аспектах рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по изобретению является вектором, в других аспектах вектор является плазмидой. В некоторых вариантах осуществления вектор является вирусным вектором. В некоторых аспектах композиция включает рекомбинантную, нестафилококковую бактерию, содержащую или экспрессирующую полипептид, представленный в настоящем описании. В конкретных аспектах рекомбинантные нестафилококковые бактерии представляют собой Salmonella или другие грамположительные бактерии. Композицию, как правило, вводят млекопитающим, таким как люди, но предусмотрено и введение другим животным, способное вызывать иммунный ответ. В дополнительных аспектах бактерия Staphylococcus, содержащие или экспрессирующие полипептид, является Staphylococcus aureus. В дополнительных вариантах осуществления иммунный ответ является протективным иммунным ответом.

В дополнительных вариантах осуществления композиция содержит рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую весь или часть одного или более из белков Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, SpA, vWbp или vWh или их пептида или варианта. Дополнительные стафилококковые антигены, которые можно использовать в комбинации с полипептидами, представленными в настоящем описании, включают, в качестве неограничивающих примеров, витронектин-связывающий белок 52кДа (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, аутолизин-глюкозаминидазу, аутолизин-амидазу, Cna, коллаген-связывающий белок (US 6288214), EFB (FIB), эластин-связывающий белок (EbpS), EPB, FbpA, фибриноген-связывающий белок (US 6008341), фибронектин-связывающий белок (US 5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, иммунодоминантный транспортер ABC, IsaA/PisA, рецептор ламинина, липазу GehD, MAP, транспортер Mg^{2+}, аналог MHC II (US 5648240), MRPII, Npase, РНК III-активирующий белок (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), экзотоксины SEA (WO 00/02523), экзотоксины SEB (WO 00/02523), транспортер SitC и Ni ABC, SitC/MntC/связывающий белок слюны (US 5801234), SsaA, SSP-1, SSP-2 и/или витронектин-связывающий белок. В конкретных аспектах бактерии являются рекомбинантными нестафилококковыми бактериями, такими как Salmonella или другие грамположительные бактерии.

Композиции по изобретению, как правило, вводят людям, но предусмотрено и введение другим животным, способное вызывать иммунный ответ на бактерии Staphylococcus, в частности, крупному рогатому скоту, лошадями, козам, овцам и другим домашним животным, т.е. млекопитающим.

В некоторых аспектах бактерия Staphylococcus является Staphylococcus aureus. В дополнительных вариантах осуществления иммунный ответ является протективным иммунным ответом. В дополнительных аспектах способы и композиции по изобретению можно использовать для профилактики, улучшения, уменьшения или лечения инфекции тканей или желез, например, молочных желез, в частности, мастита, и других инфекций. Другие способы включают, в качестве неограничивающих примеров, профилактическое снижение бактериального бремени у индивидуума, не демонстрирующего признаки инфекции, в частности, индивидуумов, как предполагают, колонизированных или имеющих риск колонизации целевыми бактериями, например, пациентов, имеющих, или имеющих риск, или склонных к инфекции во

время пребывания в стационаре, лечения и/или восстановления.

Любой вариант осуществления, описанный в отношении одного аспекта изобретения, также применим к другим аспектам изобретения. В частности, любой вариант осуществления, описанный в отношении полипептида варианта SpA, или пептида, или нуклеиновой кислоты, можно реализовать в отношении других антигенов, таких как Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, витронектин-связывающий белок 52кДа (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, аутолизин-глюкозаминидазы, аутолизин-амидазы, Cna, коллаген-связывающий белок (US 6288214), EFB (FIB), эластин-связывающий белок (EbpS), EPB, FbpA, фибриноген-связывающий белок (US 6008341), фибронектин-связывающий белок (US 5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, иммунодоминантный транспортер ABC, IsaA/PisA, рецептор ламинина, липазу GehD, MAP, транспортер Mg^{2+}, аналог MHC II (US 5648240), MRPII, Npase, РНК III-активирующий белок (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), экзотоксины SEA (WO 00/02523), экзотоксины SEB (WO 00/02523), транспортер SitC и Ni ABC, SitC/MntC/связывающий белок слюны (US 5801234), SsaA, SSP-1, SSP-2 и/или витронектин-связывающий белок (или нуклеиновые кислоты), и наоборот. Также следует понимать, что любой из одного или более из Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, витронектин-связывающего белка 52кДа (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, аутолизин-глюкозаминидазы, аутолизин-амидазы, Cna, коллаген-связывающего белка (US 6288214), EFB (FIB), эластин-связывающего белка (EbpS), EPB, FbpA, фибриноген-связывающего белка (US 6008341), фибронектин-связывающего белка (US 5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, иммунодоминантного транспортера ABC, IsaA/PisA, рецептора ламинина, липазы GehD, MAP, транспортера Mg^{2+}, аналога MHC II (US5648240), MRPII, Npase, РНК III-активирующего белка (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), экзотоксинов SEA (WO 00/02523), экзотоксинов SEB (WO 00/02523), транспортера SitC и Ni ABC, SitC/MntC/связывающего белка слюны (US 5801234), SsaA, SSP-1, SSP-2 и/или витронектин-связывающего белка можно конкретно исключать из композиции по изобретению.

Варианты осуществления изобретения включают композиции, содержащие или несодержащие бактерию. Композиция может включать или не включать аттенуированную, или живую, или интактную стафилококковую бактерию. В некоторых аспектах композиция содержит бактерию, неявляющуюся стафилококковой бактерией, или не содержит стафилококковые бактерии. В некоторых вариантах осуществления бактериальная композиция содержит выделенный или рекомбинантно экспрессируемый вариант стафилококкового белка A или кодирующий его нуклеотид. Композиция может являться или включать рекомбинантно сконструированную бактерию Staphylococcus, измененную таким образом, что она содержит бактерию, специфически измененную в отношении секретируемого фактора вирулентности или белка поверхности клетки. Например, бактерии могут быть рекомбинантно модифицированы для экспрессии большего количества фактора вирулентности или белка поверхности клетки, чем экспрессировалось бы без модификации.

Термин "выделенный" может относиться к нуклеиновой кислоте или полипептиду, по существу, несодержащему клеточный материал, бактериальный материал, вирусный материал или среду для культивирования (при получении способами рекомбинантной ДНК) из их источника происхождения, или химические предшественники или другие химические вещества (при химическом синтезе). Кроме того, термин "выделенное соединение" относится к соединению, которое можно вводить индивидууму в качестве выделенного соединения; другими словами, соединение просто можно не считать "выделенным", если оно присоединено к колонке или заключено в агарозный гель. Кроме того, "выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты" или "выделенный пептид" является фрагментом нуклеиновой кислоты или белка, не являющимся природным в качестве фрагмента, и/или, как правило, не находится в функциональном состоянии.

Вещества по изобретению, такие как полипептиды, пептиды, антигены или иммуногены, можно конъюгировать или связывать ковалентно или нековалентно с другими веществами, такими как адъюванты, белки, пептиды, подложки, флуоресцентные вещества или метки. Термин "конъюгат" или "иммуноконъюгат" широко используют для определения функциональной связи одного вещества с другим средством, и он не предназначен для обозначения исключительно какого-либо типа функциональной связи и конкретно не ограничен химической "конъюгации". Конкретно предусмотрены рекомбинантные слитые белки. Композиции по изобретению могут дополнительно содержать адъювант или фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления адъювант содержит алюмокалиевые квасцы или адъювант, представленный в настоящем описании. Адъювант можно ковалентно или нековалентно соединять с полипептидом или пептидом по изобретению. В некоторых аспектах адъювант химически конъюгирован с белком, полипептидом или пептидом.

Термин "предоставление" используют в его общепринятом значении для указания "дополнения или снабжения для использования". В некоторых вариантах осуществления белок предоставляют непосредственно посредством введения белка, в то время как в других вариантах осуществления белок эффективно предоставляют посредством введения нуклеиновой кислоты, кодирующей белок. В некоторых аспек-

тах изобретение относится к композициям, содержащим различные комбинации нуклеиновой кислоты, антигенов, пептидов и/или эпитопов.

Индивидуум будет иметь (например, иметь диагноз стафилококковой инфекции), предположительно, будет иметь или будет иметь риск развития стафилококковой инфекции. Композиции по настоящему изобретению включают иммуногенные композиции, где антигены или эпитопы содержатся в количестве, эффективном для достижения предполагаемой цели. Более конкретно, термин "эффективное количество" означает количество активных ингредиентов, необходимое для стимуляции или вызывания иммунного ответа или обеспечения резистентности, улучшения или ослабления инфекции. В более конкретных аспектах эффективное количество приводит к профилактике, облегчению или улучшению симптомов заболевания или инфекции или пролонгированию выживания индивидуума, подвергаемого лечению. Определение эффективного количества входит в объем навыков специалистов в этой области, особенно в свете представленного подробного описания. В случае любого препарата, используемого в способах по изобретению, эффективное количество или дозу будут оценивать сначала с помощью исследований in vitro, культивирования клеток и/или анализов моделей на животных. Например, дозу можно составлять с помощью моделей на животных для достижения желаемого иммунного ответа или концентрации или титра циркулирующих антител. Такую информацию можно использовать для более точного определения полезных доз для людей.

В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению (вариант SpA) обеспечивает высвобождение гистамина, равное или меньшее, чем 20, 19,5, 19, 18,5, 18, 17,5, 17, 16,5, 16, 15,5, 15, 14,5, 14, 13,5, 13, 12,5, 12, 11,5, 11, 10,5, 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 или 0% (или любой диапазон, полученный из них) в анализе высвобождения гистамина базофилами.

Варианты осуществления в разделе примеров следует понимать как варианты осуществления изобретения, которые можно использовать в отношении всех аспектов изобретения.

Использование термина "или" в формуле изобретения предназначено для обозначения "и/или", если четко не указано, что он относится к единственным альтернативам, или альтернативы являются взаимоисключающими, хотя настоящее описание поддерживает определение, относится к единственным альтернативам и "и/или". Также предполагают, что что-либо, указанное с использованием термин "или", также можно конкретно исключать.

На всем протяжении настоящей заявки термин "приблизительно" используют для указания того, что значение включает стандартное отклонение ошибки для устройства или способа, используемого для определения значения.

Следуя устоявшемуся патентному праву, термины в единственном числе при использовании в комбинации с термином "содержащий" в формуле изобретения или описании означают один или более, если конкретно не указано иначе.

Другие цели, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя в них и указаны конкретные варианты осуществления изобретения, приведены исключительно в иллюстративных целях, т.к. различные изменения и модификации в рамках сущности и объема изобретения будут очевидны специалистам в этой области из этой подробного описания.

Краткое описание чертежей

Для того, чтобы перечисленные выше признаки, преимущества и цели по изобретению и пр., которые станут очевидными, были достигнуты и стали более понятными, более конкретное описание и некоторые варианты осуществления изобретения, в кратком изложении обобщенные выше, проиллюстрированы на сопутствующих чертежах. Эти чертежи образуют часть настоящего описания. Однако следует отметить, что на сопутствующих чертежах проиллюстрированы некоторые варианты осуществления изобретения, и, таким образом, не следует истолковывать их как ограничение объема изобретения.

Фиг. 1A-E. Изолят WU1 Staphylococcus aureus ST88, патоген мыши. (A) Доменная структура и гомология последовательности продуктов генов vwb из S. aureus WU1 и S. aureus Newman, клинического изолята человека. Показан процент идентичности аминокислот (а/к) vWbp в его сигнальном пептиде (S), доменах D1 и D2 (отвечающих за связывание и активацию протромбина организма-хозяина), линкере (белый прямоугольник) и С-концевом фибриноген-связывающим домене (C). (B) Иммуноблоттинг образцов цельной культуры штаммов S. aureus Newman (WT, дикого типа), а также его вариантов Δcoa, Δvwb, Δcoa-vwb и ΔclfA, штаммы WU1, JSNZ, USA300 LAC и его вариант Δvwb анализировали на продукцию vWbp (αvWbp), Coa (αCoa), Hla (αHla) и ClfA (αClfA) с использованием поликлональных антител кролика. (C) С помощью поликлональных антител против домена vWbp-C идентифицируют аллельный вариант vWbp из штаммов JSNZ и WU1, а также vWbp из штамма USA300 LAC. (D-E) Агглютинацию окрашенных Syto-9 штаммов S. aureus в плазме человека (D) или мыши (E) измеряли в виде среднего размера и стандартной ошибки среднего агглютинировавших бактерий в 12 полях при микроскопическом увеличении и оценивали статистическую значимость при попарном сравнении с WT с использованием двухстороннего ANOVA с поправкой Шидака на множественность сравнений. ****$p<0,0001$.

Фиг. 2A, B. S. aureus WU1 персистентно колонизирует носоглотку мышей C57BL/6. Когорты мышей C57BL/6 (n=10) интраназально инокулировали с использованием 1×10^8 КОЕ указанных S. aureus WU1 или контрольного PBS и получали мазок из горла еженедельно для подсчета бактериальной нагрузки. Каждой точкой указано количество КОЕ на мышь. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных в указанный день указаны горизонтальной линией и планкой погрешностей.

Фиг. 3A, B. Экспрессия стафилококкового белка A (SpA) в S. aureus WU1 необходима для персистентной колонизации мышей C57BL/6. (A) Иммуноблоттинг лизатов S. aureus, полученных из штаммов USA300 LAC, Newman, WU1, варианта Δspa WU1 без плазмиды для экспрессии spa (pspa) и с ней, анализировали с помощью SpA- (αSpA) и сортаза A-специфических антитела (αSrtA). (B) Когорты мышей C57BL/6 (n=10) интраназально инокулировали с использованием 1×10^8 КОЕ S. aureus WU1 или его варианта Δspa и получали мазок ротоглотки животных с недельными интервалами для подсчета бактериальной нагрузки. Каждой точкой указано количество КОЕ на мышь. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных в указанный день указаны горизонтальной линией и планкой погрешностей. Наборы данных о бактериальной колонизации анализировали с использованием двухстороннего ANOVA с поправкой Шидака на множественность сравнений; статистически значимые различия (***p=0,0003; ****p<0,0001) между двумя группами животных указаны звездочками.

Фиг. 4. Иммунизация мышей C57BL/6 с помощью SpA_{KKAA} способствует деколонизации S. aureus WU1. Мышей C57BL/6 иммунизировали с помощью 50 мкг очищенного рекомбинантного SpA_{KKAA}, эмульгированного в CFA, или PBS-имитации в CFA и подвергали бустерной иммунизации через 11 дней с помощью 50 мкг рекомбинантного SpA_{KKAA}, эмульгированного в IFA, или PBS-имитации в IFA. В день 0 эксперимента по колонизации когорты мышей C57BL/6 (n=10) интраназально инокулировали с использованием 1×10^8 КОЕ S. aureus WU1. Из ротоглотки животных с недельными интервалами получали мазки для подсчета бактериальной нагрузки. Каждой точкой указано количество КОЕ на мышь. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных в указанный день указаны горизонтальной линией и планкой погрешностей. Наборы данных о бактериальной колонизации анализировали с использованием двухстороннего ANOVA с поправкой Шидака на множественность сравнений; статистически значимые различия (*p<0,05; **p<0,01) между двумя группами животных указаны звездочками.

Фиг. 5. Иммунизация мышей BALB/c с помощью SpA_{KKAA} способствует деколонизации S. aureus WU1. Мышей BALB/c иммунизировали с помощью 50 мкг очищенного рекомбинантного SpA_{KKAA}, эмульгированного в CFA, или PBS-имитации в CFA и подвергали бустерной иммунизации через 11 дней с помощью 50 мкг рекомбинантного SpA_{KKAA}, эмульгированного в IFA, или PBS-имитации в IFA. В день 0 эксперимента по колонизации когорты мышей BALB/c (n=10) интраназально инокулировали с использованием 1×10^8 КОЕ S. aureus WU1. Из ротоглотки животных с недельными интервалами получали мазки для подсчета бактериальной нагрузки. Каждой точкой указано количество КОЕ на мышь. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных в указанный день указаны горизонтальной линией и планкой погрешностей. Наборы данных о бактериальной колонизации анализировали с использованием двухстороннего ANOVA с поправкой Шидака на множественность сравнений; статистически значимые различия (*p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001) между группами животных указаны звездочками.

Фиг. 6. Иммунизация мышей BALB/c с помощью SpA_{KKAA} способствует клиренсу S. aureus JSNZ из носоглотки. Мышей BALB/c иммунизировали с помощью 50 мкг очищенного рекомбинантного SpA_{KKAA}, эмульгированного в CFA, или PBS-имитации в CFA и подвергали бустерной иммунизации через 11 дней с помощью 50 мкг рекомбинантного SpA_{KKAA}, эмульгированного в IFA, или PBS-имитации в IFA. В день 0 эксперимента по колонизации когорты мышей BALB/c (n=10) интраназально инокулировали с использованием 1×10^8 КОЕ S. aureus JSNZ. Из ротоглотки животных с недельными интервалами получали мазки для подсчета бактериальной нагрузки. Каждой точкой указано количество КОЕ на мышь. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных в указанный день указаны горизонтальной линией и планкой погрешностей. Наборы данных о бактериальной колонизации анализировали с использованием двухстороннего ANOVA с поправкой Шидака на множественность сравнений; статистически значимые различия (*p<0,05; **p<0,01) между двумя группами животных указаны звездочками.

Фиг. 7A-C. Улучшенная вакцина SpA. A: Изображение вариантов SpA_{KKAA}, $SpA_{KKAA/A}$ и $SpA_{KKAA/F}$. B: Аффинность связывания вариантов с IgG человека. C: Аффинность связывания вариантов с IgE человека.

Фиг. 8A, B. Анализы связывания. A: Вестерн-блоттинг вариантов SpA. B: ELISA связывания вариантов с указанными молекулами.

Фиг. 9A, B. Белок A необходим для персистентной назальной колонизации S. aureus мышей.

Фиг. 10. Выравнивание аминокислотной последовательности белка A. Темно-серый: Аминокислоты, взаимодействующие с Fcγ-фрагментом человека; светло-серый: Аминокислоты, взаимодействующие с Fab-фрагментом человека; Звездочкой указана аминокислота, взаимодействующая с фрагментами Fcγ и Fab человека; красный: аминокислоты, взаимодействующие с фрагментом Fcγ человека.

Фиг. 11. Анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR), показавший, что домен Z (G29A в домене B SpA) не может связываться с $F(ab)_2$-фрагментом.

Фиг. 12A, B. Новые варианты SpA*, нацеленные на G29.

Фиг. 13. Новые варианты SpA*, нацеленные на G29.

Фиг. 14. Новые варианты SpA*, нацеленные на G29.

Фиг. 15. Новые варианты SpA*, нацеленные на G29.

Фиг. 16. Изображение анализа высвобождения гистамина базофилами, дополнительно описанного в примере 2.

Фиг. 17A, B. Стафилококковый белок A (SpA). (A) Диаграмма, на которой показана первичная структура предшественника SpA (с N-концевым сигнальным пептидом, отщепляемым сигнальной пептидазой, пять иммуноглобулиновых связывающих доменов (IgBD - обозначенные E, D, A, B, C), проходящий через клеточную стенку домен, обозначаемый как область Xr, домен LysM для связывания пептидогликанов и C-концевой сигнал сортировки LPXTG, отщепляемый сортазой A, SpA клеточной стенки, экспонируемого на бактериальной поверхности, и высвобождаемых молекул SpA, высвобождаемых из оболочки клеточной стенки в ткани организма-хозяина. (B) Секреция и сортаза A-опосредованное заякоривание SpA в клеточной стенке и высвобождение пептидогликан-связанного SpA S. aureus.

Фиг. 18A, B. Связывание SpA с доменом Fcγ IgG человека блокирует эффекторные функции антител (вовлечение рецепторов Fc и комплемента) и опсонофагоцитоза S. aureus фагоцитами. Свойства, связанные с уклонением от иммунного надзора, стафилококкового белка A. (A) Заякоренный в клеточной стенке SpA на поверхности S. aureus связывается с Fcγ IgG человека (IgG1, IgG2 и IgG4) и блокирует эффекторные функции антител по запуску опсонофагоцитоза бактерий. (B) Диаграмма, на которой показана первичная структура IgG человека, его антигенсвязывающий паратоп (фиолетовый) эффектор (C1q, FcγRs, FcRn) и участки связывания SpA.

Фиг. 19A, B. Свойства, связанные с уклонением от иммунного надзора, стафилококкового белка A. (A) Функции уклонения от иммунного надзора SpA во время инфекции S. aureus. Заякоренный в клеточной стенке SpA на поверхности S. aureus связывается с Fcγ IgG человека и блокирует эффекторные функции антител по запуску опсонофагоцитоза бактерий. Высвобождаемый SpA перекрестно связывается с V_H3-идиотипическими вариантами тяжелых цепей IgG и IgM человека (B-клеточными рецепторами) для активации пролиферации B-клеток, переключения класса, соматической гипермутация и секреции V_H3-идиотипических антител, которые могут перекрестно сшиваться SpA, но не распознают антигены S. aureus, таким образом, блокируя развитие адаптивных иммунных ответов против S. aureus и развитие протективного иммунитета. (B) Диаграмма, на которой показано связывание SpA и перекрестная сшивка V_H3-идиотипических B-клеточных рецепторов (IgM) и активация передачи сигнала CD79AB.

Фиг. 20A, B. Иммуноглобулин-связывающие домены (IgBD) рекомбинантного SpA, SpA_{KKAA}, SpA_{AA} и SpA_{KKAA}. (A) Диаграмма, на которой показана первичная структура IgBD рекомбинантного SpA с N-концевой полигистидиновой меткой для очистки посредством аффинной хроматографии на Ni-NTA из цитоплазмы E. coli. Аминокислотная последовательность домена IgBD-E показана ниже. Указаны положения трех α-спиралей для каждого IgBD (H1, H2 и H3). SpA_{KK} и SpA_{KKAA} несут замены аминокислот a $Q^{9,10}K$ ($Gln^{9,10}Lys$). SpA_{KK} и SpA_{KKAA} несут замены аминокислот в $D^{36,37}A$ ($Asp^{36,37}Lys$). Нумерация относится к положению аминокислот в B-IgBD. (B) Выравнивание аминокислотной последовательности пяти IgBD SpA. Консервативные аминокислоты указаны точкой (.). Пропуски в выравнивании указаны тире (-). Неконсервативные аминокислоты указаны с помощью однобуквенного кода. Как указано в Graille et al. (138), остатки SpA, участвующие в связывании Fcγ IgG, выделены красным цветом. Остатки SpA, отвечающие за связывание V_H3-тяжелой цепи, выделены зеленым цветом. Остаток, выделенный розовым цветом (Q^{32}), участвует в связывании Fcγ и V_H3.

Фиг. 21A, B. SpA-ассоциированная активность перекрестной сшивки V_H3 и анафилаксия. (A) Диаграмма, на которой показана структура активирующих рецепторов Fcγ и Fcε человека, а также их лиганды V_H3-идиотипических IgG и IgE. (B) Перекрестная сшивка SpA V_H3-идиотипических IgG или IgE, вовлекающая рецепторы FcγR и FcεR, соответственно, на базофилах или тучных клетках запускает высвобождение гистамина, воспалительных медиаторов и цитокинов, способствующее анафилактическим реакциям, вазодилатации и шоку. Хотя это и не показано на (B), и тучные клетки, и базофилы экспрессируют рецепторы FcγR и FcεR и отвечают на перекрестную сшивку SpA V_H3-идиотипических IgG, связанных с FcγR, или перекрестную сшивку SpA V_H3-идиотипических IgE, связанных с рецепторами FcεR, с высвобождением гистамина, провоспалительных медиаторов и цитокинов.

Фиг. 22. Анафилактическая активность вакцин-кандидатов SpA у мышей. Мышей μMT (n=5) сенсибилизировали с помощью VH3 IgG посредством интрадермальной инъекции в ухо. Антигены вакцины-кандидата или контрольный PBS инъецировали внутривенно через 24 ч с последующей инъекцией красителя синего Эванса. Экстравазацию красителя количественно анализировали после экстракции из тканей уха через 30 минут посредством спектрофотометрического измерения при 620 нм. Получали данные для трех независимых экспериментов. Для статистического анализа данных осуществляли односторонний ANOVA с поправкой Бонферрони на множественность сравнений. Обозначения: ns, не значимо; *, $P<0,05$; **, $P<0,01$; ***, $P<0,001$; ****, $P<0,0001$.

Фиг. 23A, B. Дегрануляция тучных клеток. Культивируемые тучные клетки человека (LAD2) сенсибилизировали в течение ночи с помощью VH3 IgE, промывали и оставляли необработанными (PBS) или

в течение 1 ч подвергали воздействию SpA в качестве положительного контроля или тестируемых препаратов SpA_{KKAA}, $SpA_{Q9,10K/S33E}$, $SpA_{Q9,10K/S33T}$ или SpA-KR. Уровни β-гексозаминидазы и гистамина измеряли в клеточных осадках, а также супернатантах. Показаны процент β-гексозаминидазы (A) и степень высвобождения гистамина (B). Для статистического анализа данных осуществляли односторонний ANOVA с поправкой Бонферрони на множественность сравнений. Обозначения: ns, не значимо; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; ****, P<0,0001.

Фиг. 24A-E. Иммунизация с помощью SpA_{KKAA} или $SpA_{Q9,10K/S33E}$ или $SpA_{Q9,10K/S33T}$ способствует прогрессирующей деколонизации. Когорты мышей C57BL/6 (n=10) интраназально инокулировали с использованием 1×10^8 КОЕ S. aureus WU1. (A, B, D) У мышей получали мазок из глотки еженедельно для подсчета бактериальной нагрузки. (C, E) Образцы кала получали еженедельно после инокуляции для подсчета бактериальной нагрузки. На панели (A) животных иммунизировали с помощью адъювант-PBS или -SpA_{KKAA}. На панелях (B-C) животных иммунизировали с помощью адъювант-SpA_{KKAA} или -$SpA_{Q9,10K/S33E}$; те же когорты животных подвергали мониторингу бактериальной нагрузки в глотке (B) и образцах кала (C). На панелях (D-E) животных иммунизировали с помощью адъювант-PBS, или -SpA_{KKAA}, или -$SpA_{Q9,10K/S33E}$, или -$SpA_{Q9,10K/S33T}$; те же когорты животных подвергали мониторингу бактериальной нагрузки в глотке (D) и образцах кала (E). Каждым квадратом указано количество КОЕ на миллилитр на мазок горла или на грамм кала. Медиана и стандартное отклонение для каждой группы животных в указанный день указаны горизонтальными линиями и планками погрешностей. Данные анализировали с использованием двухстороннего дисперсионного анализа с поправкой Шидака на множественность сравнений (*, P<0,05). На панелях (D-E) каждая группа данных (каждая из 1-8) представляет собой данные для имитации, SpA_{KKAA}, $SpA_{Q9,10K/S33E}$ или $SpA_{Q9,10K/S33T}$, соответственно. Не наблюдали статистически значимых различий между двумя группами в панелях B и C.

Фиг. 25A-C. Протективная активность вакцин-кандидатов SpA в модели инфекции кровотока на мышах. Мышей BALB/c возрастом три недели (n=15) иммунизировали с помощью SpA_{KKAA}, или $SpA_{Q9,10K/S33E}$, или $SpA_{Q9,10K/S33T}$, или контроля PBS. Имитационную или бустерную иммунизацию проводили в день 11. В день 20 мышам пускали кровь для оценки полумаксимальных титров антител в сыворотке на вакцины-кандидаты, обозначенные как SpA* на оси y. Каждая группа из трех столбцов соответствует, слева направо, SpA_{KKAA}, $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $Spa_{AQ9,10K/S33T}$. (A). В день 21 мышам проводили провокационную пробу с помощью 5×10^6 КОЕ S. aureus USA300 (LAC) в периорбитальный венозный синус правого глаза. Через пятнадцать дней после провокационной пробы животных умерщвляли для подсчета стафилококковой нагрузки в почках (B) и подсчета очагов абсцесса (C). Для статистического анализа данных осуществляли односторонний ANOVA с поправкой Бонферрони на множественность сравнений. Обозначения: ns, не значимо; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; ****, P<0,0001.

Фиг. 26A-C. Взаимодействие между вакцинами-кандидатами SpA и SpA-нейтрализующим моноклональным антителом 3F6. Антитела 3F6, рекомбинантный rMAb 3F6 из клеток HEK293 F (A, rMAb 3F6) или гибридомное моноклональное антитело мыши (B, hMAb 3F6) серийно разводили на планшетах для твердофазного иммуноферментного анализа, покрытых SpA_{KKAA}, или $SpA_{Q9,10K/S33E}$, или $SpA_{Q9,10K/S33T}$, или контрольным PBS. (C) Константы ассоциации, вычисленные с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Подробное описание

Staphylococcus aureus является комменсалом кожи и ноздрей человека и основной причиной инфекций кровотока, кожи и мягких тканей (Klevens et al., 2007). Недавнее значительное повышение смертности от стафилококковых заболеваний приписывают распространению метициллин-резистентных штаммов S. aureus (MRSA), зачастую невосприимчивых к антибиотикам (Kennedy et al., 2008). В крупном ретроспективном исследовании частота инфекций MRSA составляла 4,6% всех поступлений в лечебные учреждения в США (Klevens et al., 2007). Годовые расходы на здравоохранение для 94300 инфицированных MRSA индивидуумов в США превысили $2,4 миллиардов (Klevens et al., 2007). Текущая эпидемия MRSA вызвала кризис здравоохранения, приведший к необходимости разработки профилактической вакцины (Boucher and Corey, 2008). К настоящему времени, недоступна лицензированная FDA вакцина, предотвращающая заболевание S. aureus.

Авторы настоящего изобретения описывают использование белка A, заякоренного в клеточной стенке белка поверхности стафилококков, для получения вариантов, которые могут служить в качестве субъединичных вакцин. Патогенез стафилококковых инфекций начинается с инвазии бактерий в кожу или кровоток через очаг травмы, хирургические раны или медицинские устройства (Lowy, 1998). Хотя инвазивный патоген может подвергаться фагоцитозу и уничтожаться, стафилококки также могут избегать врожденной иммунной защиты и приводить к инфекциям тканей органа, что индуцирует воспалительные ответы, привлекающие макрофаги, нейтрофилы и другие фагоциты (Lowy, 1998). Ответной инвазии иммунных клеток в очаг инфекции сопутствует колликвационный некроз, т.к. организм-хозяин пытается предотвратить распространение стафилококков и сделать возможным удаление дебриса некротизированных тканей (Lam et al., 1963). Такие очаги можно наблюдать посредством микроскопии в виде гиперклеточных областей, содержащих некротизированную ткань, лейкоциты и центральный очаг ин-

фекции (Lam et al., 1963). Если стафилококковые абсцессы не подвергают хирургическому дренированию и лечению антибиотиками, диссеминированная инфекция и септицемия приводят к летальному исходу (Sheagren, 1984).

I. Стафилококковые антигены.

A. Стафилококковый белок A (SpA).

Стафилококковый белок A (SpA) связывается с иммуноглобулином, таким образом, делая возможной уклонение S. aureus от иммунного ответа организма-хозяина. Связывание SpA с Fcγ блокирует эффекторные функции антител IgG и опсонофагоцитоз стафилококков иммунными клетками. Перекрестная сшивка SpA вариантов тяжелых цепей V_H3-идиотипического IgM запускает пролиферацию B-клеток и секрецию V_H3-клональных антител, которые не могут связываться с антигенными детерминантами S. aureus. Кроме того, перекрестная сшивка SpA V_H3-идиотипических IgG и IgE на тучных клетках и базофилах способствует высвобождению гистамина и анафилаксии. Ранее был разработан SpA_{KKAA} с дефектами связывания Fcγ и варианта тяжелой цепи. При тестировании в качестве вакцины в доклинических исследованиях SpA_{KKAA} вызывает образование SpA-нейтрализующих антител и защищает животных от колонизации S. aureus и инвазивного заболевания. В примерах ниже показано, что SpA_{KKAA} сохраняет перекрестно-сшивающую активность для V_H3-идиотипических IgG и IgE и запускает анафилаксию, что позволяет предполагать, что он не безопасен для использования на людях. Авторы настоящего изобретения показали, что варианты SpA, у которых отсутствует перекрестная сшивка V_H3-тяжелой цепи и анафилактическая активность, приводят к образованию SpA-нейтрализующих антител и защищают животных от колонизации S. aureus и инфекции кровотока. Таким образом, варианты SpA, неспособные перекрестно сшивать V_H3-идиотипический иммуноглобулин, можно использовать для профилактики колонизации S. aureus и инвазивного заболевания у людей.

B. Колонизация и заболевание, вызванное Staphylococcus aureus.

Staphylococcus aureus колонизирует носоглотку и желудочно-кишечный тракт человека, и его считают персистентным колонизирующим организмом у приблизительно трети человеческой популяции (14). Оставшаяся часть человеческой популяции колонизируется S. aureus периодически (14). Практически у всех людей возникают антитела против некоторых из молекулярных детерминант S. aureus в детском возрасте (99). Однако эти иммунные ответы не влияют на колонизацию S. aureus или не защищают от инвазивного заболевания (99). Колонизация является ключевым фактором риска внебольничного или госпитального заболевания S. aureus, включая инфекции мягких тканей, раневые инфекции, инфекции легких, скелета, кровотока и инфекции послеоперационной раны (14, 100, 58, 6). В США 3,4 миллионов случаев внебольничных инфекций S. aureus (CAI) и 340000 случаев госпитальных инфекций (HAI) требуют терапии антибиотиками и/или хирургического вмешательства (49-51). Инфекции антибиотик-резистентными штаммами S. aureus, обозначаемыми как MRSA (метициллин-резистентные S. aureus), возникают у 7% CAI и 22% HAI и ассоциированы с неуспешностью лечения и плохими исходами заболевания, включая смерть (85). Признаками всех заболеваний S. aureus являются их рецидивирование, т.е. в 4 из 5 случаев рецидивирующую инфекцию вызывает один и тот же штамм, и неспособность инфицированного организма-хозяина развить протективный иммунитет (16). Разработка стафилококковой вакцины, которая может блокировать колонизацию и предотвращать инвазивное заболевание, представляет собой неотложную, неудовлетворенную клиническую потребность. Хотя несколько вакцин-кандидатов подвергали тестированию клинической эффективности, продукты не смогли достичь своих клинических конечных точек (59-60, 101).

C. Стафилококковый белок A (SpA) является ключевой детерминантой уклонения от иммунного надзора.

Стафилококковый белок A (SpA), сортаза A-заякоренный поверхностный белок, служит в качестве ключевой детерминанты уклонения от иммунного надзора, предотвращающей развитие протективного иммунитета во время колонизации и инфекции S. aureus (75, 33, 102, 48). Все клинические изоляты S. aureus несут ген стафилококкового белка A (spa), образующий продукт-предшественник, состоящий из N-концевого сигнального пептида YSIRK/GxxS с последующими 4-5 иммуноглобулиновыми связывающими доменами, повторов области X (Xr), домена LysM и сигнала сортировки LPXTG (29, 32, 103) (фигура 17A). Предшественник SpA находится в бактериальной цитоплазме и поступает на секреторный путь в септальные мембраны посредством своего N-концевого сигнального пептида YSIRK/GxxS (68, 104). После транслокации через септальные мембраны C-концевой сигнал сортировки LPXTG отщепляется сортазой A, образующей тиоэфирное промежуточное соединение между остатком цистеина активного центра и карбоксильной группы треонина (T) в мотиве LPXTG (105-108) (фиг. 17B). Тиоэфирное промежуточное соединение разрешается посредством нуклеофильной атаки аминогруппы (NH_2-) в липиде II [C55-$(PO_4)_2$-MurNAc(L-Ala-D-iGlu-L-Lys(NH_2-Gly5)-D-Ala-D-Ala)-GlcNAc], приводящей к образованию амидной связи между C-концевым треонином и пентаглициновым поперечным мостиком (107, 109). Затем промежуточное соединение SpA-липид II встраивается в пептидогликан поперечной стенки и экспонируется на поверхности бактерии (108, 70).

Заякоренный в клеточной стенке SpA на поверхности бактерии связывается с Fcγ-доменом IgG и

блокирует эффекторные функции антител, таким образом, защищая стафилококки от опсонофагоцитоза (OPK) иммунными клетками организма-хозяина (48, 76) (фиг. 18). Во время репликации стафилококки высвобождают часть своих пептидогликанов и пептидогликан-связанных SpA (здесь обозначаемых как высвобождаемый белок A или высвобождаемый SpA) в среду организма-хозяина вследствие муралитической ферментативной активности, приводящей к деградации поперечной стенки вблизи септальных мембран (110, 111) (фиг. 17B). Высвобождаемый SpA связан с пептидом стенки со структурой L-Ala-D-iGln-L-Lys(SpA-LPET-Gly5)-D-Ala-Gly4 (46). Высвобождаемый SpA активирует B-клеточные рецепторы VH3-идиотипа (BCR или IgM), таким образом, способствуя пролиферации B-клеток, а также секреции VH3-идиотипических IgG, IgA, IgD, IgE и IgM посредством образования активированных плазмобластов (75, 33) (фиг. 19).

D. Связывание иммуноглобулинов и свойства токсичности SpA.

Каждый из N-концевых иммуноглобулин-связывающих доменов (IgBD) SpA (134-137, тройные спиральные складки из 72 аминокислотных остатков, обозначаемые как E, D, A, B и C) связывается с Fcγ-доменами IgG1, IgG2 и IgG4 человека (112-116, 71) (фиг. 20). SpA не связывается с Fcγ-доменом IgG3 человека, единственным подклассом IgG с коротким периодом полувыведения из плазмы (113, 117). Каждый из пяти IgBD также связывается с вариантами тяжелых цепей VH3-клонального иммуноглобулина человека, включая IgM (BCR), IgG, IgE, IgD и IgA (75, 48, 76, 118-135, 43) (фиг. 19). Участки связывания IgBD не перекрываются, что позволяет каждому модулю SpA одновременно связываться с Fcγ и VH3-тяжелыми цепями антител (48) (фиг. 20). Ключевым признаком SpA является его способность противодействовать эффекторным функциям (Fcγ) антител, включая участки связывания для рецепторов Fcγ (FcγR) и C1q, необходимым для OPK иммунными клетками (71, 72, 136, 137) (фиг. 18B). В иммунной системе человека 54% IgM (у которых отсутствует Fcγ) и B-клетки периферической крови взаимодействуют с SpA (75, 73, 74). Связывание SpA ограничено продуктами вариантов тяжелой цепи семейства генов VH3, содержащего 22 гена, по сравнению с другими основными и минорными генами VH с меньшим количеством генов: VH1 [11 генов], VH2 [2 гена], VH4 [11 генов], VH5 [2 гена], VH6 [1 ген] и VH7 [1 ген] (138). Во время колонизации и инвазивного заболевания высвобождаемый SpA перекрестно сшивает VH3-клональные B-клеточные рецепторы и запускает секрецию антител (IgG, IgA, IgD и IgE), которые, хотя и адаптированы посредством соматической гипермутации для улучшенного связывания вариантов тяжелых цепей с SpA, неспособны распознавать стафилококковые детерминанты в качестве антигенов (15) (фиг. 19). Эта B-клеточная суперантигенная активность (BCSA, т.е. активность связывания VH3 высвобождаемого SpA) отвечает за предотвращение развития протективного иммунитета против S. aureus во время колонизации или инвазивного заболевания (102, 48, 139) (фиг. 19).

Иммуноглобулин-связывающие свойства SpA также ассоциированы с токсичностью, когда очищенный белок инъецируют людям или животным. Например, 20-30% IgM морских свинок взаимодействует с SpA с помощью их вариантов тяжелых цепей (VH3-идиотип) (76); инъекция очищенного SpA (500 мкг) в кровоток морских свинок приводит к анафилактическому шоку, включающему возбужденное состояние, респираторный дистресс и гибель (140). Даже в дозе 0,01 мкг SpA вызывает транссудацию у морских свинок (140). У мышей только 5-10% IgM взаимодействует с SpA с помощью их вариантов тяжелых цепей (VH3-идиотип) (76). Мыши являются резистентными к SpA-индуцированной анафилаксии, однако эти животные при внутривенной инъекции IgG человека могут преобразовываться и становиться восприимчивыми к инъекции SpA с высвобождением гистамина из активированных базофилов и тучных клеток (141, 142) (фиг. 21). SpA-индуцированный анафилактический шок предотвращают посредством предварительного введения животным мепирамина, антагониста H1-рецептора гистамина (140). Внутривенная инъекция очищенного SpA людям (0,3-0,45 мкг/кг) ассоциирована с серьезными нежелательными явлениями, такими как головная боль, тошнота, миалгия, боль в груди, пирексия, острая лимфопения и лейкопения (143). Таким образом, очищенный SpA представляет собой бактериальный токсин, и его не считают безопасным для использования на людях (143, 144). Токсическая активность SpA связана с его VH3-перекрестно-сшивающей активностью в отношении IgG и IgE человека, связанных с его когнатными рецепторами на базофилах и тучных клетках, таким образом, запуская высвобождение гистамина и цитокина, вазодилатацию, транссудацию и шок (140, 142, 144, 145) (фиг. 21).

E. SpA_{KKAA}.

При дополнении гидроксидом алюминия или адъювантом Фрейнда и инъекции мышам или морским свинкам очищенный SpA не вызывает гуморальные ответы у животных, направленные против его пяти IgBD (76, 43). Аналогично, колонизация S. aureus или инвазивное заболевание не ассоциированы с возникновением IgBD SpA-специфических антител у мышей, морских свинок или людей (75, 102, 48, 43). В более ранних исследованиях разрабатывали рекомбинантные варианты SpA, сначала анализируя иммуноглобулин D-связывающего домена SpA. Kim с соавт. заменяли глутамин (Q или Gln) 9 и 10 лизином (K или Lys), а также аспартат (D или Asp) 36 и 37 аланином (A или Ala) для нарушения ассоциации SpA-D с иммуноглобулином (43). Замены Q9K, Q10K, D36A и D37A встраивали в рекомбинантный полигистидин-меченый SpA-D для получения $SpA\text{-}D_{KKAA}$. Способность SpA-D или $SpA\text{-}D_{KKAA}$, очищенных и удерживаемых на никель-нитрилотриуксусная кислота-агарозе (Ni-NTA), связываться, а затем подвер-

гаться совместной элюции с IgG или IgM человека, в конечном итоге, анализировали посредством ELISA. Как и ожидали, SpA-D удерживал IgG человека и IgM человека на Ni-NTA. По сравнению с SpA-D, SpA-D_{KKAA} захватывал 5,6 (±0,6)% (P<0,0001) IgG человека и 75,6 (±4,6)% (P=0,008) IgM человека (числа в скобках представляют собой стандартную ошибку среднего; статистически значимые различия вычисляли с помощью непарного t-критерия Стьюдента) (43). Встраивание Q9K, Q10K, D36A и D37A в каждый из пяти IgBD рекомбинантного, меченого полигистидином SpA (в котором отсутствует сигнальный пептид, Xr, LysM и сигнал сортировки LPXTG полноразмерного предшественника SpA) приводило к получению SpA_{KKAA} (фиг. 19) (42). При анализе в сравнении с меченым полигистидином, рекомбинантным SpA, SpA_{KKAA} захватывал 2,3 (±0,1)% IgG человека (P=0,0001), 2,2 (±0,1)% Fcγ-фрагмента IgG человека (активность связывания Fcγ, P<0,0001), 4,4 (±1,0)% F(ab)-фрагмента IgG человека (активность связывания VH3, P<0,0001), и 4,2 (±0,1)% IgM человека (активность связывания VH3, P<0,0001) на колонке Ni-NTA (43). Таким образом, SpA_{KKAA} демонстрирует дефекты двух связывающих активностей SpA в отношении иммуноглобулина человека, т.е. его связывания с Fcγ-доменом IgG (IgG1, IgG2 и IgG4) и вариантами тяжелых цепей VH3-идиотипического иммуноглобулина.

F. SpA_{KKAA} в качестве вакцинного антигена.

Меченый полигистидином, рекомбинантный SpA и SpA_{KKAA} очищали посредством аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (IMAC) на Ni-NTA (43). Элюат подвергали диализу с помощью PBS, Triton X-114, экстрагировали для удаления эндотоксина, подвергали диализу, определяли концентрацию белка (анализ BCA) и проверяли чистоту (>90%) с помощью электрофореза в ПААГ с SDS с окрашиванием кумасси и ВЭЖХ (43). SpA, а также SpA_{KKAA} можно адсорбировать на гидроксиде алюминия [SpA_{KKAA} $Al(OH)_3$] или эмульгировать с помощью адъюванта Фрейнда, полного [SpA_{KKAA} CFA] или неполного [SpA_{KKAA} IFA](43). Иммунизация с примированием и бустерным введением (11-дневный интервал) мышей C57BL/6 и BALB/c с использованием 50 мкг SpA_{KKAA} CFA/IFA приводит к высоким титрам антител IgG в сыворотке [9,2 мкг/мл (±1,1); полумаксимальный титр при ELISA 1:6000] против антигена SpA_{KKAA} (43). Иммунизация с примированием и бустерным введением мышей C57BL/6 и BALB/c с использованием 50 мкг SpA_{KKAA} $Al(OH)_3$ приводит к низким титрам антител [полумаксимальный титр 1:500]; IgG с более высоким титром наблюдают у мышей CD1, иммунизированных Sp_{AKKAA} $Al(OH)_3$ [полумаксимальный титр 1:4000] (76). Иммунизация морских свинок с использованием схемы примирование-2 бустерных введения (14-дневные интервалы) и 100 мкг SpA_{KKAA} $Al(OH)_3$ приводит к высоким титрам IgG в сыворотке против SpA_{KKAA} [полумаксимальный титр 1:50000] (76). SpA_{KKAA}-специфические IgG мыши и морской свинки связываются с каждым из пяти IgBD SpA и нейтрализуют их способность связываться с IgG мыши, морской свинки или человека с помощью Fcγ или VH3-идиотипических тяжелых цепей (76). Кроме того, SpA_{KKAA}-специфические IgG мыши и морской свинки нейтрализуют связывание SpA с иммуноглобулином на бактериальной поверхности и способствуют OPK S. aureus Newman и MRSA USA300 LAC в крови мыши, морской свинки и человека с антикоагулянтом (48, 76, 43). Иммунизация мышей и морских свинок с помощью SpA_{KKAA} защищает животных от инфекции кровотока S. aureus (76, 43). Защита основана на SpA-нейтрализующих антителах, т.к. интраперитонеального или внутривенного введения очищенных поликлональных или моноклональных антител (моноклональное антитело мыши 3F6) против IgBD SpA достаточно для защиты против инфекции кровотока S. aureus (повышенная выживаемость, сниженная бактериальная нагрузка в тканях органа и сниженное образование абсцессов) (76, 84, 146, 147). Кроме того, нейтрализуя BCSA SpA (VH3-перекрестносшивающую активность), SpA-IgBD-специфические антитела усиливают IgG-ответы мыши и морской свинки на секретируемые антигены во время инфекции кровотока S. aureus, что позволяет SpA_{KKAA}-иммунизированным животным достичь клиренса бактериальных возбудителей и протективного иммунитета против рецидивирующего заболевания (48, 76, 43, 147). В отличие от этого, наивные или SpA-иммунизированные животные не могут достичь протективного иммунитета против S. aureus (48, 43).

G. Роль SpA во время колонизации S. aureus.

В более ранней работе, измеряя бактериальную адгезию к слущенным назальным эпителиальным клеткам человека и колонизацию in vivo мышей, пытались идентифицировать факторы S. aureus, вносящие вклад в колонизацию (17, 18, 20). Они включают модификации D-Ala и GlcNAc тейхоевой кислоты клеточной стенки (WTA), связывающихся со скавенджер-рецептором типа F (SREC-I) назального эпителия (18, 27, 28). Кроме того, фактор агглютинации B (ClfB) способствует адгезии стафилококков к лорикрину и цитокератину-10 в назальном эпителии (21). По сравнению с S. aureus дикого типа, изогенный мутант clfB демонстрирует сниженную адгезию к назальному эпителию людей-добровольцев (7). Регулируемая железом поверхностная детерминанта A (IsdA) вносит вклад в захват железа из гемопротеинов организма-хозяина и связывается с лактоферрином, ингибируя противостафилококковую активность лактоферрина в назальных секретах (23, 24). Белок G (SasG) поверхности S. aureus опосредует цинк-зависимую адгезию между бактериальными клетками во время образования биопленки на назальных тканях (25, 26). Таким образом, необходимо несколько факторов для адгезии стафилококков к тканям носоглотки, образованию биопленки и колонизации (78). Важно, что для назальной колонизации мышей клиническими изолятами человека необходимо предшествующее лечение животных антибиотиков для

истощения резидентной микробиоты и обеспечения селекции в пользу резистентного к антибиотиками S. aureus (19). Таким образом, мыши не колонизированы персистентно клиническими изолятами S. aureus человека (20). Роль стафилококкового белка A (SpA) во время назальной колонизации S. aureus остается неясной (29). При анализе 6110 индивидуумов в Oxfordshire (UK), все колонизирующие штаммы S. aureus экспрессируют spa (32, 31). Хотя структура тандемного повтора гена spa способствует высокой частоте рекомбинации, колонизация человека способствует селекции в пользу аллелей spa, продукты которых сохраняют 5 IgBD, что обеспечивает стафилококков мощной BCSA (33, 32). При анализе людей-добровольцев, подвергнутых клиренсу назального носительства посредством лечения мупироцином, экспрессия spa S. aureus не требовалась для бактериальной адгезии к назальным тканям человека (34).

S. aureus WU1, члена клады с мультилокусным типом последовательности ST88, выделяли при массовом заражении абсцессов препуциальных желез среди самцов мышей C57BL/6 (102). В отличие от клинических изолятов человека, S. aureus WU1 персистентно колонизирует носоглотку мышей C57BL/6 и BALB/c без селекции антибиотиками и передается от самок, персистентно колонизируя их потомство (102). По сравнению с S. aureus WU1 дикого типа, мутант ΔsrtA, который не может заякоривать какой-либо белок поверхности на оболочке бактерий, не может колонизировать носоглотку мышей C57BL/6 (102) (неопубликованные данные). В отличие от этого, мутант Δspa не проявляет дефект при начальной колонизации мышей (102). Несмотря на это, мутант Δspa не может персистировать и подвергается клиренсу из носоглотки мышей, начиная через три недели после начальной колонизации (102). Деколонизация ассоциирована с повышенными IgG сыворотки против ClfB, IsdA, SasG и других стафилококковый белков поверхности (102). Иммунизация мышей с помощью очищенного SpA_{KKAA} приводит к образованию SpA-нейтрализующих антител, повышающих патоген-специфические IgG (включая антитела против ClfB, IsdA, SasG, FnbA, FnbB, Coa), таким образом, способствуя деколонизации S. aureus WU1 (102). Аналогично, интраперитонеальное введение SpA-IgBD-нейтрализующего моноклонального антитела мыши 3F6 способствует патоген-специфическому повышению IgG и секреторного IgA, а также клиренсу S. aureus из носоглотки и желудочно-кишечного тракта (146). В совокупности, эти данные позволяют предполагать, что колонизация S. aureus ассоциирована с высвобождением SpA в тканях организма-хозяина и нарушением B-клеточных ответов, таким образом, делая возможным персистирование патогена на поверхностях слизистых оболочек (102). Индуцируемые SpA_{KKAA}-вакциной антитела против SpA противодействуют этому механизму, способствуя IgG-ответам против множества разных секретируемых стафилококковых антигенов, совместно уменьшающих колонизации S. aureus (102).

H. Конструирование SpA для аффинной хроматографии иммуноглобулинов и моноклональных антител (MAb).

Рекомбинантный SpA, полноразмерный или отдельные домены (E, D, A, B, C), широко используют в качестве лиганда для очистки моноклональных антител (MAb) посредством аффинной хроматографии (147, 148). Многие MAb человека, разработанные для клинического использования, принадлежат к классу V_H3-идиотипических IgG1. Рекомбинантный SpA может связываться с такими антителами через вариант каркаса V_H3 и Fcγ (фиг. 18 и 19), таким образом, требуется более низкий pH (pH 3,1) для элюции MAb из SpA-аффинной смолы (например, MabSelect™, включающей все пять IgBD E, D, A, B, C). Использование более низкого pH для элюции MAb ассоциировано с разворачиванием и агрегацией антител (149). Кроме того, рекомбинантный SpA дикого типа является чувствительным к щелочному расщеплению по остаткам Asn-Gly, что ограничивает пригодность SpA-аффинных колонок во время безразборной очистки щелочью (≥0,1 M NaOH), при которой удаляют контаминирующие белки и липиды и уничтожают контаминирующие микроорганизмы (147, 149). Z-домен является синтетическим, сконструированным (идеализированная последовательность, полученная из всех пяти IgBD SpA) B-доменом, несущим две замены аминокислот, $Ala^{1}Val$ и $Gly^{29}Ala$ (148, 150, 151). Последняя замена аминокислоты приводит к удалению чувствительной к щелочи пептидной связи Asn^{28}-Gly^{29} (151, 152). Показано, что тандемные повторы двух (ZZ), пяти (ZV) и десяти (ZX) Z-доменов связываются с антителами, и их используют для очистки MAb (130, 150). Замена $Gly^{29}Ala$ также снижает связывание Z, ZZ и ZZZZ (MabSelectSure™) с каркасом V_H3 антител IgG1 и, таким образом, снижает pH, необходимый для элюции IgG1 (pH 3,7) (148, 151, 152). Чувствительная к щелочи связь Asn^{28}-Gly^{29} отсутствует в домене IgBD-C (Thr^{28}-Gly^{29}), от природы резистентному к щелочи (151). Вычислительный анализ изменений свободной энергии (ΔG) свернутых, нативных вариантов IgBD-C и несвернутых вариантов IgBD-C (с одной из восьми замен аминокислот в положении Ser33 или Asp36) использовали для определения корреляции с изменениями термостабильности, однако это предположение не было подтверждено экспериментально (149). In silico сниженное ΔG дополнительно анализировали для идентификации сниженного связывания с вариантами тяжелых цепей VH3; это предположение также не было подтверждено экспериментально (149). Кроме того, предположение о том, что с помощью прогнозирования in silico можно идентифицировать замены аминокислот с самым слабым связыванием и наибольшей стабильностью, также не смогли валидировать (149). Несмотря на это, каждого мутанта $Ser^{33}Glu$ и $Asp^{36}Arg$ с промежуточными изменениями ΔG выбирали для экспериментального исследования посредством получения тандемных повторов пяти доменов IgBD-C, каждый из которых содержит одну замену аминокислоты Gly29Ala, $Ser^{33}Glu$ и $Asp^{36}Arg$, таким

образом, получая C-G29A.5d, C-S33A.5d и C-D36A.5d (149). Все три белка C-G29A.5d, C-S33E.5d и C-D36A.5d связываются с IgG человека с константами ассоциации K_a 3-5×10^8 M^{-1} (149). Константа ассоциации белка A дикого типа для IgG человека составляет K_a 1,4×10^8 M^{-1} (153). Для измерения связывания с VH3-идиотипическими IgG Yoshida et al. использовали обработку папаином для получения Fab-фрагментов из трастузумаба, VH3-идиотипического MAb IgG1, продуцируемого в клетках яичника китайского хомяка (CHO), связывающихся с Her2 на некоторых клетках рака молочной железы (149). Аффинность C-G29A.5d для Fab трастузумаба измеряли как K_a 4,4×10^5 M^{-1}; C-S33E.5d и C-D36A.5d демонстрировали приблизительно 100-кратное снижение аффинности (K_a 5×10^3 M^{-1}), эти значения соответствуют неспецифическому связыванию (149).

Авторы настоящего изобретения пытались улучшить безопасность вакцины SpA_{KKAA} для дальнейшего клинического тестирования, в частности, посредством устранения его VH3-перекрестносшивающей активности. Остатки Gly29, Ser33 и Asp36 IgBD SpA локализуются вдоль края спирали 2, контактирующей с каркасными остатками VH3 на тяжелых цепях иммуноглобулинов человека, и образуют ключевые связи, таким образом, перекрестно сшивая VH3-идиотипические B-клеточные рецепторы (138, 154). В более ранней работе уже исследовали замены аминокислот $Asp^{36,37}Ala$, разрабатывая вакцинного антигена SpA_{KKAA} (43, 154). Таким образом, авторы настоящего изобретения фокусировались на системном анализе аминокислот в положениях Gly^{29} и Ser^{33} в каждом из пяти IgBD SpA и исследовали их вклад в связывание иммуноглобулина человека в контексте Gln^9Lys и $Gln^{10}Lys$, замен аминокислот, как известно, снижающих связывание SpA с Fcγ (48, 43). Исследовали способность таких вакцинных конструкций SpA вызывать образование SpA-специфических антител и защиту против колонизации S. aureus и инвазивного заболевания. Для оценки безопасности авторы настоящего изобретения анализировали вакцины-кандидаты SpA in vitro и с использованием доклинической модели in vivo на их активность в отношении индуцирования анафилаксии в присутствии V_H3-идиотипического IgG человека.

II. Стафилококковые коагулазы.

Коагулазы являются ферментами, продуцируемыми бактериями Staphylococcus, превращающими фибриноген в фибрин. Coa и vW_h активируют протромбин без протеолиза (Friedrich et al., 2003). Коагулаза-протромбиновый·комплекс распознает фибриноген в качестве специфического субстрата, превращая его непосредственно в фибрин. С помощью кристаллической структуры активного комплекса выявили связывание доменов D1 и D2 с протромбином и инсерцию его $Ile1\text{-}Val^2$ N-конца в карман Ile^{16}, индуцирующую функциональный активный центр в зимогене посредством конформационного изменения (Friedrich et al., 2003). Экзоучасток I α-тромбина, участок распознавания фибриногена и проэкзоучасток I на протромбине блокированы D2 Coa (Friedrich et al., 2003). Несмотря на это, ассоциация тетрамерного $(Coa\text{-протромбин})_2$ комплекса связывает фибриноген в новом участке с высокой аффинностью (Panizzi et al., 2006). Эта модель объясняет свойства коагулянта и эффективное превращение фибриногена под действием коагулазы (Panizzi et al., 2006).

Фибриноген является крупным гликопротеином (Mr ~340000), образованным тремя парами Aα-, Bβ- и γ-цепей, ковалентно связанными с образованием "димера тримеров", где A и B означают фибринопептиды, высвобождаемые при расщеплении тромбина (Panizzi et al., 2006). Удлиненная молекула сворачивается в три отдельных домена, центральный фрагмент E, содержащий N-концы всех шести цепей, и два фланкирующих фрагмента D, образованных, в основном, C-концами Bβ- и γ-цепей. Эти глобулярные домены соединены длинными тройными спиральными структурами. Коагулаза-протромбиновые комплексы, превращающие фибриноген человека в самополимеризующийся фибрин, не подвергаются таргетингу циркулирующими ингибиторами тромбина (Panizzi et al., 2006). Таким образом, стафилококковые коагулазы обходят физиологический путь свертывания крови.

Все штаммы S. aureus секретируют коагулазу и vWbp (Bjerketorp et al., 2004; Field and Smith, 1945). Хотя в ранней работе показан важный вклад коагулазы в патогенез стафилококковых инфекций (Ekstedt and Yotis, 1960; Smith et al., 1947), более поздние исследования с использованием способов молекулярной генетики позволяют оспорить эту точку зрения, т.к. не наблюдали вирулентных фенотипов при использовании моделей эндокардита, абсцессов кожи и мастита на мышах (Moreillon et al., 1995; Phonimdaeng et al., 1990). Благодаря получению изогенных вариантов S. aureus Newman, полностью вирулентного клинического изолята (Duthie et al., 1952), в настоящем описании показано, что мутанты coa фактически демонстрируют дефекты вирулентности в моделях летальной бактериемии и абсцесса почки на мышах. По опыту авторов настоящего изобретения, S. aureus 8325-4 не является полностью вирулентным, и предполагают, что с помощью очагов мутаций в этом штамме можно и не выявить дефекты вирулентности in vivo. Кроме того, антитела, индуцированные против Coa или vWbp, нарушают патогенез инфекций S. aureus Newman до степени, отражающей влияние делеций генов. Coa и vWbp участвуют в образовании стафилококковых абсцессов и летальной бактериемии, а также могут функционировать в качестве протективных антигенов в субъединичных вакцинах.

Биохимические исследования подтверждают биологическое значение антител против Coa и vWbp. Связываясь с антигеном и блокируя его связывание с факторами свертывания, антитела предотвращают образование комплексов Coa-протромбин и vWbp-протромбин. В исследованиях пассивного переноса

выявлена защита экспериментальных животных от образования стафилококковых абсцессов и летальной инфекции благодаря антителам против Coa и vWbp. Таким образом, Coa- и vWbp-нейтрализующие антитела приводят к иммунитету против стафилококкового заболевания.

В более ранних исследованиях показана необходимость коагулазы для сопротивления фагоцитозу в крови (Smith et al., 1947), и авторы настоящего изобретения наблюдали схожий фенотип в случае мутантов Δcoa в обработанной лепирудином крови мыши (см. пример 3 ниже). Т.к. vWbp демонстрирует более высокую аффинность к протромбину человека, чем протромбину мыши, предполагают, что то же может быть верным и для вариантов ΔvWbp в крови человека. Кроме того, экспрессия Coa и vWbp в очагах абсцессов, а также их выраженное распределение в эозинофильном псевдокапсульном окружении (стафилококковое сообщество абсцесса (SAC)) или периферической фибриновой стенке позволяют предполагать, что секретируемые коагулазы участвуют в развитии этих очагов. Эту гипотезу тестировали, и, фактически, мутанты Δcoa являлись дефектными в отношении развития абсцессов. Соответствующий тест, блокирование функции Coa специфическими антителами, приводил к тому же эффекту. Таким образом, предполагают, что свертывание фибрина является критическим событием в развитии стафилококковых абсцессов, которое можно делать мишенью для разработки защитных вакцин. Из-за их перекрывающейся функции в отношении протромбина человека, и Coa, и vWbp считают исключительными кандидатами для разработки вакцины.

J. Другие стафилококковые антигены.

Исследования последних нескольких десятилетий позволили идентифицировать экзотоксины S. aureus, белки поверхности и регуляторные молекулы в качестве важных факторов вирулентности (Foster, 2005; Mazmanian et al., 2001; Novick, 2003). Достигнут значительный прогресс в отношении регуляции этих генов. Например, стафилококки осуществляют регуляцию численности бактерий посредством секреции аутоиндуцирующих пептидов, связывающихся с когнатным рецептором при пороговой концентрации, таким образом, активируя реакции фосфореле и транскрипционную активацию многих генов экзотоксинов (Novick, 2003). Патогенез стафилококковых инфекций основан на этих факторах вирулентности (секретируемые экзотоксины, экзополисахариды и адгезины поверхности). Разработка стафилококковых вакцин затруднена многогранной природой механизмов стафилококковой инвазии. Хорошо известно, что живые аттенуированные микроорганизмы являются высокоэффективными вакцинами; иммунные ответы, вызванные такими вакцинами, зачастую имеют большую величину и большую длительность, чем получаемые с помощью нереплицирующихся иммуногенов. Одним из объяснений этого может являться то, что живые аттенуированные штаммы вызывают ограниченные инфекции в организме-хозяине и имитируют ранние стадии природной инфекции. Варианты осуществления изобретения относятся к композициям и способам, включающим варианты полипептидов и пептидов SpA, а также другие иммуногенные внеклеточные белки, полипептиды и пептиды (включая секретируемые белки и белки поверхности клетки или пептиды) грамположительных бактерий для использования в уменьшении инфекции или иммунизации против нее. В конкретных вариантах осуществления бактерии являются бактериями Staphylococcus. Внеклеточные белки, полипептиды или пептиды включают, в качестве неограничивающих примеров, секретируемые белки и белки поверхности клетки целевых бактерий.

Патоген человека S. aureus секретирует EsxA и EsxB, два ESAT-6-подобных белка, через бактериальную оболочку (Burts et al., 2005, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Стафилококковые esxA и esxB кластеризуются с шестью другими генами в порядке транскрипции: esxA esaA essA esaB essB essC esaC esxB. Сокращения esa, ess и esx означают секрецию ESAT-6 вспомогательную, системную и внеклеточную, соответственно, в зависимости от того играют ли кодируемые белки вспомогательную (esa) или прямую (ess) роль в секреции или секретируется (esx) во внеклеточную среду. Весь кластер из восьми генов в настоящем описании обозначают как кластер Ess. Все из esxA, esxB, essA, essB и essC необходимы для синтеза или секреции EsxA и EsxB. Мутанты, неспособные продуцировать EsxA, EsxB и EssC, демонстрируют дефекты в патогенезе абсцессов S. aureus у мышей, что позволяет предполагать, что эта специализированная система секреции может представлять собой общую стратегию бактериального патогенеза у человека. Описана секреция не-WXG100 субстратов с помощью пути ESX-1 для нескольких антигенов, включая EspA, EspB, Rv3483c и Rv3615c (Fortune et al., 2005; MacGurn et al., 2005; McLaughlin et al., 2007; Xu et al., 2007). Также показано, что альтернативный путь ESX-5 приводит к секреции WXG100 и не-WXG100 белков в патогенных микобактериях (Abdallah et al., 2007; Abdallah et al., 2006).

Путь Ess Staphylococcus aureus можно рассматривать в качестве модуля секреции, снабженного специализированными транспортными компонентами (Ess), вспомогательными факторами (Esa) и когнатными субстратами секреции (Esx). EssA, EssB и EssC необходимы для секреции EsxA и EsxB. Т.к., как прогнозируют, EssA, EssB и EssC являются трансмембранными белками, предполагают, что эти белки образуют секреторный аппарат. Некоторые из белков в кластере генов ess могут активно транспортировать секретируемые субстраты (действуя в качестве мотора), в то время как другие могут регулировать транспорт (регулятор). Можно достигать регуляции, в качестве неограничивающих примеров, посредством транскрипционных или посттрансляционных механизмов для секретируемых полипептидов, сорти-

ровки специфических субстратов в определенные локации (например, внеклеточную среду или клетки-хозяева) или временного режима событий секреции во время инфекции. К настоящему времени неясно, все ли секретируемые белки Esx функционируют в качестве токсинов или косвенно участвуют в патогенезе.

Стафилококки используют опосредованную белками поверхности адгезию к клеткам-хозяевам или инвазию тканей в качестве стратегии избегания иммунного ответа. Кроме того, S. aureus использует белки поверхность для секвестрации железа из организма-хозяина во время инфекции. Большинство белков поверхности, участвующих в стафилококковом патогенезе, несут С-концевые сигналы сортировки, т.е., они ковалентно связаны с оболочкой клеточной стенки с помощью сортазы. Кроме того, стафилококковые штаммы, в которых отсутствуют гены, необходимые для заякоривания белков поверхности, т.е. сортаза А и В, демонстрируют значительный дефект вирулентности в нескольких разных моделях заболеваний на мышей. Таким образом, антигены белков поверхности представляют собой валидированные цели для вакцины, т.к. соответствующие гены необходимы для развития стафилококкового заболевания, и их можно использовать в различных вариантах осуществления изобретения. Суперсемейство ферментов сортаз представляет собой грамположительные транспептидазы, отвечающие за заякоривание белков поверхности- факторов вирулентности в пептидогликановом слое клеточной стенки. Идентифицированы две изоформы сортазы Staphylococcus aureus, SrtA и SrtB. Показано, что эти ферменты распознают мотив LPXTG в белках-субстратах. Изоформа SrtB, по-видимому, важна для присоединения гемового железа и гомеостаза железа, в то время как изоформа SrtA играет критическую роль в патогенезе грамположительных бактерий посредством модуляции способности бактерии к адгезии к тканям организма-хозяина посредством ковалентного заякоривания адгезинов и других белков в пептидогликанах клеточной стенки. В некоторых вариантах осуществления варианты SpA, представленные в настоящем описании. можно использовать в комбинации с другими стафилококковыми белками, такими как белки Coa, Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsaB, EsxA, EsxB, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC, SasF, vWbp и/или vWh.

Некоторые аспекты изобретения включают способы и композиции, относящиеся к белковоподобным композициям, включающим полипептиды, пептиды или нуклеиновую кислоту, кодирующую варианты SpA и другие стафилококковые антигены, такие как другие белки, транспортируемые путем Ess, или субстраты сортазы. Эти белки можно модифицировать посредством делеции, инсерции и/или замены.

Полипептиды Esx включают аминокислотную последовательность белков Esx из бактерий рода Staphylococcus. Последовательность Esx может быть из конкретных видов стафилококков, таких как Staphylococcus aureus, и из конкретного штамма, такого как Newman. В некоторых вариантах осуществления последовательность EsxA представляет собой SAV0282 из штамма Mu50 (являющегося той же аминокислотной последовательностью для Newman) и может соответствовать регистрационному номеру Genbank Q99WU4 (gi|68565539), таким образом, включенному в качестве ссылки. В других вариантах осуществления последовательность EsxB представляет собой SAV0290 из штамма Mu50 (являющегося той же аминокислотной последовательностью для Newman) и может соответствовать регистрационному номеру Genbank Q99WT7 (gi|68565532), таким образом, включенному в качестве ссылки. В дополнительных вариантах осуществления можно использовать другие полипептиды, транспортируемые путем Ess, последовательности которых может идентифицировать специалист в этой области с использованием баз данных и ресурсов, доступных в сети интернет.

Полипептиды-субстраты сортазы включают, в качестве неограничивающих примеров, аминокислотную последовательность белков SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC или SasF из бактерий рода Staphylococcus. Последовательность полипептида-субстрата сортазы может быть из конкретных видов стафилококков, таких как Staphylococcus aureus, и из конкретного штамма, такого как Newman. В некоторых вариантах осуществления последовательность SdrD происходит из штамма N315 и может соответствовать регистрационному номеру Genbank NP_373773.1 (gi|15926240), включенному в качестве ссылки. В других вариантах осуществления последовательность SdrE происходит из штамма N315 и может соответствовать регистрационному номеру Genbank NP_373774.1 (gi|15926241), включенному в качестве ссылки. В других вариантах осуществления последовательность IsdA является SAV1130 из штамма Mu50 (являющегося той же аминокислотной последовательностью для Newman) и может соответствовать регистрационному номеру Genbank NP_371654.1 (gi|15924120), включенному в качестве ссылки. В других вариантах осуществления последовательность IsdB является SAV1129 из штамма Mu50 (являющегося той же аминокислотной последовательностью для Newman) и может соответствовать регистрационному номеру Genbank NP_371653.1 (gi|15924119), включенному в качестве ссылки. В дополнительных вариантах осуществления можно использовать другие полипептиды, транспортируемые путем Ess или процессируемые сортазой, последовательности которых может идентифицировать специалист в этой области с использованием баз данных и ресурсов, доступных в сети интернет.

Примеры различных белков, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, можно идентифицировать посредством анализа записей о бактериальных геномах в базах данных, включая, в качестве неограничивающих примеров, регистрационные номера NC_002951 (GI:57650036 и GenBank CP000046), NC_002758 (GI:57634611 и GenBank BA000017), NC_002745 (GI:29165615 и GenBank BA000018), NC_003923 (GI:21281729 и GenBank BA000033), NC_002952 (GI:49482253 и GenBank BX571856), NC_002953 (GI:49484912 и GenBank BX571857), NC_007793 (GI:87125858 и

GenBank CP000255), NC_007795 (GI:87201381 и GenBank CP000253), каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки.

В рамках изобретения термин "белок" или "полипептид" относится к молекуле, содержащей по меньшей мере десять аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления используют версию белка или полипептида дикого типа, однако, во многих вариантах осуществления изобретения для достижения иммунного ответа используют модифицированный белок или полипептид. Описанные выше термины можно использованы взаимозаменяемо. Термин "модифицированный белок", или "модифицированный полипептид", или "вариант" относится к белку или полипептиду, химическая структура которого, в частности, его аминокислотная последовательность, изменена относительно белка или полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления модифицированный/вариант белка или полипептида имеет по меньшей мере одну модифицированную активность или функцию (с учетом того, что белки или полипептиды может иметь множество активностей или функций). В частности, предполагают, что модифицированный/вариант белка или полипептида может быть изменен в отношении одной активности или функции при сохранении, в остальном, активности или функции дикого типа, такой как иммуногенность.

В некоторых вариантах осуществления размер белка или полипептида (дикого типа или модифицированного) может содержать, в качестве неограничивающих примеров, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 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, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 или более аминокислот, включая любой диапазон, получаемый из них, или производное соответствующей аминокислотной последовательности, описанной или упомянутой в настоящем описании. Предполагают, что полипептиды могут быть мутантными в результате укорочения, что делает их более короткими, чем соответствующая форма дикого типа, но также их можно изменять посредством слияния или конъюгации последовательности гетерологичного белка с конкретной функцией (например, для таргетинга или локализации, для повышенной иммуногенности, для очистки и т.д.).

В рамках изобретения термин "амино-молекула" относится к любой аминокислоте, производному аминокислоты или миметику аминокислоты, известному в этой области. В некоторых вариантах осуществления остатки белковоподобной молекулы являются последовательными, при этом какая-либо не-амино-молекула не прерывает последовательность остатков амино-молекул. В других вариантах осуществления последовательность может содержать одну или более не-амино-молекул. В конкретных вариантах осуществления последовательность остатков белковоподобной молекулы может прерываться одной или более не-амино-молекулами.

Таким образом, термин "белковоподобная композиция" включает последовательности амино-молекул, содержащие по меньшей мере одну из 20 распространенных аминокислот в природно синтезирующихся белках или по меньшей мере одну модифицированную или необычную аминокислоту.

Белковоподобные композиции можно получать любым способом, известным специалистам в этой области, включая (i) экспрессию белков, полипептидов или пептидов стандартными способами молекулярной биологии, (ii) выделение белковоподобных соединений из природных источников или (iii) химический синтез белковоподобных материалов. Нуклеотидные, а также белковые, полипептидные и пептидные последовательности для различных генов описаны ранее, и их можно найти в известных компьютеризованных базах данных. Такими базами данных являются базы данных Genbank и GenPept от National Center for Biotechnology Information (в сети интернет по адресу ncbi.nlm.nih.gov/). Кодирующие области для этих генов можно амплифицировать и/или экспрессировать способами, представленными в настоящем описании или известными специалистам в этой области.

Варианты аминокислотной последовательности SpA, коагулаз и других полипептидов по изобретению могут представлять собой варианты с заменами, инсерциями или делециями. Вариация в полипептиде по изобретению может затрагивать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или более несмежных или смежных аминокислот полипептида по сравнению с диким типом. Вариант может содержать аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80% или 90%, включая все значения и диапазоны между ними, идентичную любой последовательности, представленной или упомянутой в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 2-8 или SEQ ID NO: 11-30. Вариант может включать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более замен аминокислот. Полипептид, процессированный или секретируемый путем Ess, или другие белки поверхности (см. табл. 1), или субстраты сортазы любых видов и штаммов стафилококков предусмотрены для использования в композициях и способах, представленных в настоящем описании.

В делетационных вариантах, как правило, отсутствует один или более остатков нативного белка или белка дикого типа. Делеции можно подвергать отдельные остатки или ряд смежных аминокислот.

Можно встраивать стоп-кодон (посредством замены или инсерции) в кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты для получения укороченного белка. Инсерционные мутанты, как правило, включают добавление материала в неконцевую точку полипептида. Это может включать инсерцию одного или более остатков. Также можно получать концевые присоединения, обозначаемые как слитые белки. Эти слитые белки включают мультимеры или конкатемеры одного или более пептидов или полипептидов, описанных или упомянутых в настоящем описании.

Варианты с заменами, как правило, содержат замену одной аминокислоты другой в одном или более участках в белке, и их можно конструировать для модуляции одного или более свойств полипептида с потерей других функций или свойств или без нее. Замены могут являться консервативными, т.е. одну аминокислоту заменяют аминокислотой со схожей формой и зарядом. Консервативные замены хорошо известны в этой области и включают, например, замены: аланина серином; аргинина лизином; аспарагина глутамином или гистидином; аспартата глутаматом; цистеина серином; глутамина аспарагином; глутамата аспартатом; глицина пролином; гистидина аспарагином или глутамином; изолейцина лейцином или валином; лейцина валином или изолейцином; лизина аргинином; метионина лейцином или изолейцином; фенилаланина тирозином, лейцином или метионином; серина треонином; треонина серином; триптофана тирозином; тирозина триптофаном или фенилаланином; и валина изолейцином или лейцином. Альтернативно, замены могут являться неконсервативными таким образом, что это влияет на функцию или активность полипептида. Неконсервативные замены, как правило, включают замену остатка остатком, являющимся химически несхожим, такую как замена полярной или заряженной аминокислоты неполярной или незаряженной аминокислотой, и наоборот.

Таблица 10

Примеры белков поверхности штаммов S. aureus.

SAV #	SA#	Белок поверхности	MW2	Mu50	N315	Newman	MRSA252*	MSSA476*
SAV0111	SA0107	Spa	492	450	450	520	516	492
SAV2503	SA2291	FnBPA	1015	1038	1038	741	-	1015
SAV2502	SA2290	FnBPB	943	961	961	677	965	957
SAV0811	SA0742	ClfA	946	935	989	933	1029	928
SAV2630	SA2423	ClfB	907	877	877	913	873	905
Np	Np	Cna	1183	-	-	-	1183	1183
SAV0561	SA0519	SdrC	955	953	953	947	906	957
SAV0562	SA0520	SdrD	1347	1385	1385	1315	-	1365
SAV0563	SA0521	SdrE	1141	1141	1141	1166	1137	1141
Np	Np	Pls	-	-	-	-	-	-
SAV2654	SA2447	SasA	2275	2271	2271	2271	1351	2275
SAV2160	SA1964	SasB	686	2481	2481	2481	2222	685
	SA1577	SasC	2186	213	2186	2186	2189	2186
SAV0134	SA0129	SasD	241	241	241	241	221	241
SAV1130	SA0977	SasE/IsdA	350	350	350	350	354	350
SAV2646	SA2439	SasF	635	635	635	635	627	635
SAV2496		SasG	1371	525	927	-	-	1371
SAV0023	SA0022	SasH	772	-	772	772	786	786

SAV1731	SA1552	SasI	895	891	891	891	534	895
SAV1129	SA0976	SasJ/IsdB	645	645	645	645	652	645
	SA2381	SasK	198	211	211	-	-	197
	Np	SasL	-	232	-	-	-	-
SAV1131	SA0978	IsdC	227	227	227	227	227	227

Белки по изобретению могут являться рекомбинантными или синтезированными in vitro. Альтернативно, нерекомбинантный или рекомбинантный белок может быть выделен из бактерий. Также предполагают, что бактерии, содержащие такой вариант, можно использовать в композициях и способах по изобретению. Таким образом, белок может не являться выделенным.

Термин "функционально эквивалентный кодон" используют в настоящем описании для обозначения кодонов, кодирующих ту же аминокислоту, таких как шесть кодонов для аргинина или серина, а также относится к кодонам, кодирующим биологически эквивалентные аминокислоты (см. табл. 11, ниже).

Таблица 11

Таблица кодонов

Аминокислоты			Codons
Аланин	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Цистеин	Cys	C	UGC UGU
Аспарагиновая кислота	Asp	D	GAC GAU
Глутаминовая кислота	Glu	E	GAA GAG
Фенилаланин	Phe	F	UUC UUU
Глицин	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Гистидин	His	H	CAC CAU
Изолейцин	Ile	I	AUA AUC AUU
Лизин	Lys	K	AAA AAG
Лейцин	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Метионин	Met	M	AUG
Аспарагин	Asn	N	AAC AAU
Пролин	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Глутамин	Gln	Q	CAA CAG
Аргинин	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Серин	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Треонин	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Валин	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Триптофан	Trp	W	UGG
Тирозин	Tyr	Y	UAC UAU

Также следует понимать, что аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты могут включать дополнительные остатки, такие как дополнительные N- или C-концевые аминокислоты, или 5'- или 3'-последовательности, соответственно, и все равно, по существу, являться такими, как приведенные в одной из последовательностей, представленных в настоящем описании, при условии, что последовательность соответствует указанным выше критериям, включая поддержание биологической активности белка (например, иммуногенности), если речь идет об экспрессии белка. Добавление концевых последовательностей, в частности, используют в отношении последовательностей нуклеиновой кислоты, которые, например, могут включать различные некодирующие последовательности, фланкирующие 5'- или 3'-части кодирующей области.

Далее приведено обсуждение с учетом изменения аминокислот белка для получения варианта полипептида или пептида. Например, некоторые аминокислоты можно заменять другими аминокислотами в структуре белка со значительной потерей интерактивной способности к связыванию со структурами, такими как, например, антигенсвязывающие области антител или участки связывания на молекулах субстрата, или без нее. Т.к. она является интерактивной способностью и природой белка, определяющей функциональную активность этого белка, некоторые замены аминокислот можно осуществлять в последовательности белка и его основополагающей кодирующей последовательности ДНК и, несмотря на это, получать белок с желаемыми свойствами. Таким образом, авторы настоящего изобретения предполагают, что в последовательностях ДНК генов можно осуществлять различные изменения.

Предполагают, что композициях по изобретению есть от приблизительно 0,001 мг до приблизительно 10 мг общего полипептида, пептида и/или белка на мл. Концентрация белка в композиции может составлять приблизительно, по меньшей мере приблизительно или по большей мере приблизительно 0,001, 0,010, 0,050, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 мг/мл или более (включая любой диапазон, получаемый из этих значений). Из них, приблизительно, по меньшей мере, приблизительно или по большей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 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, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% может представлять собой вариант SpA или коагулазу, и их можно использовать в комбинации с другими пептидами или полипептидами, такими как другие бактериальные пептиды и/или антигены.

Настоящее изобретение включает введение вариантов полипептидов или пептидов SpA для осуществления профилактической терапии или достижения терапевтического эффекта против развития заболевания или состояния, ассоциированного с инфекцией стафилококкового патогена.

В некоторых аспектах комбинации стафилококковых антигенов используют в получении иммуногенной композиции, являющейся эффективной в лечении или профилактике стафилококковой инфекции. Стафилококковые инфекции прогрессируют через несколько разных стадий. Например, стафилококковый жизненный цикл включает комменсальную колонизацию, инициацию инфекции посредством достижения смежных тканей или кровотока, и/или анаэробного размножения в крови. Взаимодействие между детерминантами вирулентности S. aureus и механизмами защиты организма-хозяина может вызывать осложнения, такие как эндокардит, образование метастатических абсцессов и септический синдром. Различные молекулы на поверхности бактерии включаются на разных стадиях инфекционного цикла. Комбинации некоторых антигенов могут вызывать иммунный ответ, защищающий против множества стадий стафилококковой инфекции. Эффективность иммунного ответа можно измерять в анализах на моделях на животных и/или с использованием анализа опсонофагоцитоза.

K. Полипептиды и получение полипептидов.

Настоящее изобретение относится к полипептидам, пептидам и белкам и их иммуногенным фрагментам для использования в различных вариантах осуществления настоящего изобретения. Например, конкретные полипептиды анализируют на иммунный ответ или используют для вызывания иммунного ответа. В конкретных вариантах осуществления все белки по изобретению их часть также можно синтезировать в растворе или на твердой подложке общепринятыми способами. Различные автоматические синтезаторы коммерчески доступны, и их можно использовать известными способами. См., например, Stewart and Young, (1984); Tam et al., (1983); Merrifield, (1986); и Barany and Merrifield (1979), каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки.

Альтернативно, можно использовать технологию рекомбинантных ДНК, где нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид по изобретению, встраивают в экспрессирующий вектор, трансформируют или трансфицируют в соответствующую клетку-хозяина и культивируют в условиях, подходящих для экспрессии.

Один из вариантов осуществления изобретения включает использование переноса генов в клетки, включая микроорганизмы, для продукции и/или презентации полипептидов или пептидов. Ген для интересующего полипептида или пептида можно переносить в подходящие клетки-хозяева с последующим культивированием клеток в подходящих условиях. Получение рекомбинантных экспрессирующих векторов и включенных в них элементов хорошо известно в этой области и в кратком изложении приведено в настоящем описании. Альтернативно, получаемый белок может являться эндогенным белком, в норме синтезируемым клеткой, который выделяют и очищают.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения используют аутологичные линии B-лимфоцитов, трансфицируемых с использованием вирусного вектора, экспрессирующего иммуногенный продукт, и более конкретно, белок, имеющий иммуногенную активность. Другие неограничивающие примеры линий клеток-хозяев млекопитающих включают клетки Vero и HeLa, другие линии B- и T-клеток, такие как CEM, 721.221, H9, Jurkat, Raji, а также линии клеток яичника китайского хомяка, клетки W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN и MDCK. Кроме того, можно выбирать штамм клетки-хозяина, модулирующий экспрессию встроенных последовательностей или модифицирующий и процес-

сирующий продукт гена желаемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важны для функции белка. Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков. Соответствующие линии клеток или системы хозяев можно выбирать для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого чужеродного белка.

Можно использовать ряд систем селекции, включая, в качестве неограничивающих примеров, гены тимидинкиназы HSV, гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы и аденин-фосфорибозилтрансферазы в tk^-, $hgprt^-$ или $aprt^-$ клетках, соответственно. Кроме того, в качестве основы селекции можно использовать резистентность к антиметаболитам: для dhfr, придающего резистентность к триметоприму и метотрексату; gpt, придающего резистентность к микофеноловой кислоте; neo, придающего резистентность к аминогликозиду G418; и hygro, придающего резистентность к гигромицину.

Клетки животных можно выращивать in vitro в двух режимах: в виде независящих от заякоривания клеток, растущих в суспензии по всему объему культуры, или в виде зависящих от заякоривания клеток, которым требуется прикрепление к твердому субстрату для их размножения (т.е. тип роста клеток в монослое).

Независящих от заякоривания или суспензионные культуры из непрерывных устойчивых линий клеток являются наиболее широко используемыми средствами крупномасштабного производства клеток и клеточных продуктов. Однако, культивируемые в суспензии клетки имеют ограничения, такие как канцерогенный потенциал и более низкая продукция белков, чем адгезивные клетки.

Если белок конкретно упомянут в настоящем описании, предпочтительно, это представляет собой ссылку на нативный или рекомбинантный белок или, необязательно, белок, в котором удалена какая-либо сигнальная последовательность. Белок можно выделять непосредственно из штамма стафилококка или получать способами рекомбинантной ДНК. Иммуногенные фрагменты белка можно включать в иммуногенную композицию по изобретению. Они являются фрагментами, содержащими по меньшей мере 10 аминокислот, 20 аминокислот, 30 аминокислот, 40 аминокислот, 50 аминокислот или 100 аминокислот, включая все значения и диапазоны между ними, взятых последовательно из аминокислотной последовательности белка. Кроме того, такие иммуногенные фрагменты являются иммунологически реактивными в отношении антител, образовавшихся против стафилококковых белков, или антител, образовавшихся в результате инфекции млекопитающего-хозяина стафилококками. Иммуногенные фрагменты также включают фрагменты, которые при введении в эффективной дозе (в отдельности или в виде гаптена, связанного с носителем) вызывают протективный или терапевтический иммунный ответ против стафилококковой инфекции, в некоторых аспектах он защищает от инфекции S. aureus и/или S. epidermidis. Такой иммуногенный фрагмент может включать, например, белок, в котором отсутствует N-концевая лидерная последовательность, и/или трансмембранный домен, и/или С-концевой якорный домен. В предпочтительном аспекте иммуногенный фрагмент по изобретению содержит, по существу, весь внеклеточный домен белка, имеющий по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности или по меньшей мере 97-99% идентичности, включая все значения и диапазоны между ними, в отношении выбранного сегмента последовательности полипептида, представленного или упомянутого в настоящем описании.

В иммуногенный композиции по изобретению также включают слитые белки, состоящие из одного или более стафилококковых белков или иммуногенных фрагментов стафилококковых белков. Такие слитые белки можно получать рекомбинантно, и они могут содержать одну часть по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 стафилококковых белков или сегментов. Альтернативно, слитый белок может содержать множество частей по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 стафилококковых белков. В них можно комбинировать разные стафилококковые белки и/или повторять тот же белок, или фрагмент белка, или иммуногенные фрагменты в одном белке (образующие мультимер или конкатемер). Альтернативно, настоящее изобретение также включает отдельные слитые белки из стафилококковых белков или их иммуногенных фрагментов, в виде слитого белка с гетерологичными последовательностями, такими как источник Т-клеточных эпитопов или меток для очистки, например: β-галактозидаза, глутатион-S-трансфераза, зеленый флуоресцентный белок (GFP), эпитопные метки, такие как FLAG, myc-метка, полигистидин или белки вирусной поверхности, такие как гемагглютинин вируса гриппа, или бактериальные белки, такие как столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин или CRM197.

III. Нуклеиновые кислоты.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантным полинуклеотидам, кодирующим белки, полипептиды, пептиды по изобретению. Включены последовательности нуклеиновой кислоты для SpA, коагулаз и других бактериальных белков, все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки, и их можно использовать для получения пептидов или полипептидов.

В рамках изобретения термин "полинуклеотид" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, являющейся рекомбинантной или выделенной из тотальной геномной нуклеиновой кислоты. Термин "полинуклеотид" включает олигонуклеотиды (нуклеиновые кислоты длиной 100 остатков или менее), рекомбинантные векторы, включая, например, плазмиды, космиды, фаги, вирусы и т.п. В некоторых аспектах полинуклеотиды включают регуляторные последовательности, выделенные, по существу, из природных генов, или белок-кодирующие последовательности. Полинуклеотиды могут являться одноцепочеч-

ными (кодирующими или антисмысловыми) или двухцепочечными и могут представлять собой РНК, ДНК (геномную, кДНК или синтетическую), их аналоги или их комбинацию. В полинуклеотиде могут присутствовать, необязательно, дополнительные кодирующие или некодирующие последовательности.

В связи с этим, термин "ген", "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" используют для обозначения нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, полипептид или пептид (включая любые последовательности, необходимые для правильной транскрипции, посттрансляционной модификации или локализации). Как будет понятно специалистам в этой области, этот термин включает геномные последовательности, экспрессирующие кассеты, последовательности кДНК и меньшие сконструированные сегменты нуклеиновой кислоты, или их можно адаптировать для экспрессии белков, полипептидов, доменов, пептидов, слитых белков и мутантов. Нуклеиновая кислота, кодирующая весь полипептид или его часть, может содержать смежную последовательность нуклеиновой кислоты из: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000 или более нуклеотидов, нуклеозидов или пар оснований, включая все значения и диапазоны между ними, полинуклеотида, кодирующего одну или более аминокислотных последовательностей, представленных или упомянутых в настоящем описании. Также предполагают, что конкретный полипептид может кодироваться нуклеиновыми кислотами, содержащими варианты, имеющие немного разные последовательности нуклеиновой кислоты, но, несмотря на это, кодирующие тот же или, по существу, схожий белок (см. табл. 11 выше).

В конкретных вариантах осуществления изобретение относится к выделенным сегментам нуклеиновой кислоты и рекомбинантным векторам, включающим последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вариант SpA или коагулазу. Термин "рекомбинантный" можно использовать в комбинации с полинуклеотидом или полипептидом, и, как правило, он относится к полипептиду или полинуклеотиду, получаемому и/или подвергаемому манипуляции in vitro или являющемуся продуктом репликации такой молекулы.

В других вариантах осуществления изобретение относится к выделенным сегментам нуклеиновой кислоты и рекомбинантным векторам, включающим последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вариант полипептида или пептида SpA или коагулазы, для достижения иммунного ответп у индивидуума. В различных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по изобретению можно использовать в генетических вакцинах.

Сегменты нуклеиновой кислоты, используемые в настоящем изобретении, можно комбинировать с другими последовательностями нуклеиновой кислоты, такими как промоторы, сигналы полиаденилирования, дополнительные участки распознавания ферментов рестрикции, участки множественного клонирования, другие кодирующие сегменты и т.п., таким образом, что их общая длина может значительно варьироваться. Таким образом, предполагают, что можно использовать фрагмент нуклеиновой кислоты практически любой длины, при этом общая длина, предпочтительно, ограничена простотой получения и использованием предполагаемого способа рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать полипептидную последовательность с дополнительными гетерологичными кодирующими последовательностями, например, чтобы сделать возможной очистку полипептида, транспорт, секрецию, посттрансляционную модификацию или для терапевтической пользы, такой как таргетинг или эффективность. Как указано выше, в кодирующую модифицированный полипептид последовательность можно добавлять метку или другой гетерологичный полипептид, где термин "гетерологичный" относится к полипептиду, не являющемуся тем же, что и модифицированный полипептид.

В некоторых других вариантах осуществления изобретение относится к выделенным сегментам нуклеиновой кислоты и рекомбинантным векторам, включающим в своей последовательности смежную последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 2 (домен D SpA) или SEQ ID NO: 4 (SpA) или любые другие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие коагулазы или другие секретируемые факторы вирулентности и/или белки поверхности, включая белки, транспортируемые путем Ess, процессируемые сортазой, или белки, включенные в настоящее описание в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вариантам полинуклеотидов, по существу, идентичным последовательностям, представленным в настоящем описании; вариантам полинуклеотидов, имеющим по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности, включая все значения и диапазоны между ними, по сравнению с полинуклеотидной последовательностью по настоящему изобретению при использовании способов, представленных в настоящем описании (например, анализа BLAST с использованием стандартных параметров).

Настоящее изобретение также предусматривает использование полинуклеотидов, комплементарных всем из описанных выше полинуклеотидов.

А. Векторы.

Полипептиды по изобретению могут кодироваться молекулой нуклеиновой кислоты, содержащейся в векторе. Термин "вектор" используют для обозначения молекулы-носителя нуклеиновой кислоты, в которую можно встраивать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты для встраивания в клетку, где она может реплицироваться и экспрессироваться. Последовательность нуклеиновой кислоты может являться "гетерологичной", что означает, что в этом контексте она является чужеродной для клетки, в которую вектор встраивают, или для нуклеиновой кислоты, в которую ее встраивают, включающей последовательность, гомологичную последовательности в клетке или нуклеиновой кислоте, но в положении в клетке-хозяине или нуклеиновой кислоте, где ее, как правило, не обнаруживают. Векторы включают ДНК, РНК, плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаг, вирусы животных и растительные вирусы) и искусственные хромосомы (например, YAC). Специалист в этой области может конструировать вектор стандартными рекомбинантными способами (например, Sambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1996, включенные в настоящее описание в качестве ссылки). В дополнение к кодированию варианта полипептида SpA, вектор может кодировать другие полипептидные последовательности, такие как один или более других бактериальных пептидов, метка или усиливающий иммуногенность пептид. Полезные векторы, кодирующие такие слитые белки, включают векторы pIN (Inouye et al., 1985), векторы, кодирующие фрагмент из гистидинов, и векторы pGEX, для использования в получении растворимых слитых белков глутатион-S-трансферазы (GST) для последующей очистки и разделения или расщепления.

Термин "экспрессирующий вектор" относится к вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере часть продукта гена, способную подвергаться транскрипции. В некоторых случаях молекулы РНК затем транслируют в белок, полипептид или пептид. Экспрессирующие векторы могут содержать различные "контрольные последовательности", относящиеся к последовательностям нуклеиновой кислоты, необходимым для транскрипции и, возможно, трансляции функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. В дополнение к контрольным последовательностям, регулирующим транскрипцию и трансляцию, векторы и экспрессирующие векторы могут содержать последовательности нуклеиновой кислоты, также выполняющие другие функции и представленные в настоящем описании.

1. Промоторы и энхансеры.

"Промотор" является контрольной последовательностью. Промотор, как правило, является областью последовательности нуклеиновой кислоты, в которой осуществляется контроль инициации и скорости транскрипции. Он может содержать генетические элементы, в которых могут связываться регуляторные белки и молекулы, такие как РНК-полимераза и другие факторы транскрипции. Фразы "функционально связанный", "под контролем" и "под транскрипционным контролем" означают, что промотор находится в правильной функциональной локации и/или ориентации относительно последовательности нуклеиновой кислоты для контроля инициации транскрипции и экспрессии последовательности. Промотор можно использовать или не использовать в комбинации с "энхансером", обозначающим цисдействующую регуляторную последовательность, участвующую в транскрипционной активации последовательности нуклеиновой кислоты.

Разумеется, важным может быть использование промотора и/или энхансера, эффективно регулирующего экспрессию сегмента ДНК в типе клеток или организме, выбранном для экспрессии. Специалистам в области молекулярной биологии, как правило, известно использование промоторов, энхансеров и комбинаций типов клеток для экспрессии белка (см. Sambrook et al., 2001, включенную в настоящее описание в качестве ссылки). Используемые промоторы могут являться конститутивными, тканеспецифическими или индуцибельными, и в некоторых вариантах осуществления они могут регулировать высокий уровень экспрессии встроенного сегмента ДНК в определенных условиях, таких как крупномасштабное получение рекомбинантных белков или пептидов.

Различные элементы/промоторы можно использовать в контексте настоящего изобретения для регуляции экспрессии гена. Примеры таких индуцибельных элементов, являющихся областями последовательности нуклеиновой кислоты, которые могут активироваться в ответ на конкретный стимул, включают, в качестве неограничивающих примеров, тяжелую цепь иммуноглобулина (Banerji et al., 1983; Gilles et al., 1983; Grosschedl et al., 1985; Atchinson et al., 1986, 1987; Imler et al., 1987; Weinberger et al., 1984; Kiledjian et al., 1988; Porton et al.; 1990), легкую цепь иммуноглобулина (Queen et al., 1983; Picard et al., 1984), Т-клеточный рецептор (Luria et al., 1987; Winoto et al., 1989; Redondo et al.; 1990), HLA DQ α и/или DQ β (Sullivan et al., 1987), β-интерферон (Goodbourn et al., 1986; Fujita et al., 1987; Goodbourn et al., 1988), интерлейкин-2 (Greene et al., 1989), рецептор интерлейкина-2 (Greene et al., 1989; Lin et al., 1990), MHC класса II 5 (Koch et al., 1989), MHC класса II HLA-DRα (Sherman et al., 1989), β-актин (Kawamoto et al., 1988; Ng et al.; 1989), мышечную креатинкиназу (MCK) (Jaynes et al., 1988; Horlick et al., 1989; Johnson et al., 1989), преальбумин (транстиретин) (Costa et al., 1988), эластазу I (Ornitz et al., 1987), металлотионеин (MTII) (Karin et al., 1987; Culotta et al., 1989), коллагеназу (Pinkert et al., 1987; Angel et al., 1987), альбумин (Pinkert et al., 1987; Tronche et al., 1989, 1990), α-фетопротеин (Godbout et al., 1988; Campere et al., 1989), γ-глобин (Bodine et al., 1987; Perez-Stable et al., 1990), β-глобин (Trudel et al., 1987), c-fos (Cohen et

al., 1987), c-Ha-Ras (Triesman, 1986; Deschamps et al., 1985), инсулин (Edlund et al., 1985), молекулу клеточной адгезии нейронов (NCAM) (Hirsh et al., 1990), α1-антитрипсин (Latimer et al., 1990), гистон H2B (TH2B) (Hwang et al., 1990), коллаген типа I мыши и/или (Ripe et al., 1989), глюкоза-регулируемые белки (GRP94 и GRP78) (Chang et al., 1989), гормон роста крысы (Larsen et al., 1986), сывороточный амилоид A человека (SAA) (Edbrooke et al., 1989), тропонин I (TN I) (Yutzey et al., 1989), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) (Pech et al., 1989), миодистрофию Дюшенна (Klamut et al., 1990), SV40 (Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981; Sleigh et al., 1985; Firak et al., 1986; Herr et al., 1986; Imbra et al., 1986; Kadesch et al., 1986; Wang et al., 1986; Ondek et al., 1987; Kuhl et al., 1987; Schaffner et al., 1988), полиому (Swartzendruber et al., 1975; Vasseur et al., 1980; Katinka et al., 1980, 1981; Tyndell et al., 1981; Dandolo et al., 1983; de Villiers et al., 1984; Hen et al., 1986; Satake et al., 1988; Campbell et al., 1988), ретровирусы (Kriegler et al., 1982, 1983; Levinson et al., 1982; Kriegler et al., 1983, 1984a, b, 1988; Bosze et al., 1986; Miksicek et al., 1986; Celander et al., 1987; Thiesen et al., 1988; Celander et al., 1988; Choiet al., 1988; Reisman et al., 1989), вирус папилломы (Campo et al., 1983; Lusky et al., 1983; Spandidos and Wilkie, 1983; Spalholz et al., 1985; Lusky et al., 1986; Cripe et al., 1987; Gloss et al., 1987; Hirochika et al., 1987; Stephens et al., 1987), вирус гепатита B (Bulla et al., 1986; Jameel et al., 1986; Shaul et al., 1987; Spandau et al., 1988; Vannice et al., 1988), вирус иммунодефицита человека (Muesing et al., 1987; Hauber et al., 1988; Jakobovits et al., 1988; Feng et al., 1988; Takebe et al., 1988; Rosen et al., 1988; Berkhout et al., 1989; Laspia et al., 1989; Sharp et al., 1989; Braddock et al., 1989), IE цитомегаловирус (CMV) (Weber et al., 1984; Boshart et al., 1985; Foecking et al., 1986), вирус лейкоза гиббонов (Holbrook et al., 1987; Quinn et al., 1989).

Индуцибельные элементы включают, в качестве неограничивающих примеров, MT II - форболовый эфир (TFA)/тяжелые металлы (Palmiter et al., 1982; Haslinger et al., 1985; Searle et al., 1985; Stuart et al., 1985; Imagawa et al., 1987, Karin et al., 1987; Angel et al., 1987b; McNeall et al., 1989); MMTV (вирус опухоли молочной железы мышей) - глюкокортикоиды (Huang et al., 1981; Lee et al., 1981; Majors et al., 1983; Chandler et al., 1983; Lee et al., 1984; Ponta et al., 1985; Sakai et al., 1988); β-интерферон - поли(rI)x/поли(rc) (Tavernier et al., 1983); аденовирус 5 E2 - E1A (Imperiale et al., 1984); коллагеназа - форболовый эфир (TPA) (Angel et al., 1987a); стромелизин - форболовый эфир (TPA) (Angel et al., 1987b); SV40 - форболовый эфир (TPA) (Angel et al., 1987b); ген MX мышей - интерферон, вирус псевдочумы птиц (Hug et al., 1988); ген GRP78 - A23187 (Resendez et al., 1988); α-2-макроглобулин - ИЛ-6 (Kunz et al., 1989); виментин - сыворотка (Rittling et al., 1989); ген H-2κb MHC класса I- интерферон (Blanar et al., 1989); HSP70 - E1A/большой T-антиген SV40 (Taylor et al., 1989, 1990a, 1990b); пролиферин - форболовый эфир/TPA (Mordacq et al., 1989); фактор некроза опухоли - PMA (Hensel et al., 1989); и ген α тиреотропного гормона - тиреоидный гормон (Chatterjee et al., 1989).

Конкретный промотор, используемый для контроля экспрессии кодирующего пептид или белок полинуклеотида по изобретению, не считают критическим, при условии, что он может экспрессировать полинуклеотид в целевой клетке, предпочтительно - бактериальной клетке. Если целевой является клетка человека, предпочтительно располагать кодирующую область полинуклеотида смежно и под контролем промотора, способного экспрессироваться в клетке человека. Как правило, такой промотор может включать бактериальный, человеческий или вирусный промотор.

В вариантах осуществления, в которых вектор вводят индивидууму для экспрессии белка, предполагают, что желаемый промотор для использования с вектором является промотором, не подвергаемым отрицательной регуляции цитокинами, или промотором, достаточно сильным, чтобы даже при отрицательной регуляции он приводил к продукции эффективного количества варианта SpA для вызывания иммунного ответа. Их неограничивающими примерами являются IE CMV и LTR RSV. Можно использовать тканеспецифические промоторы, в частности, если экспрессия происходит в клетках, в которых экспрессия антигена является желательной, таких как дендритные клетки или макрофаги. Промоторы MHC I и MHC II млекопитающих являются примерами таких тканеспецифических промоторов.

2. Сигналы инициации и внутренние участки связывания рибосомы (IRES).

Для эффективной трансляции кодирующих последовательностей также может потребоваться специфический сигнал инициации. Эти сигналы включают инициаторный кодон ATG или смежные последовательности. Могут потребоваться экзогенные сигналы контроля трансляции, включая инициаторный кодон ATG. Специалист в этой области легко может определять их и получать необходимые сигналы.

В некоторых вариантах осуществления использование элементов внутренних участков связывания рибосом (IRES) используют для получения мультигена или полицистронных транскриптов. Элементы IRES могут обходить модель сканирования рибосомы при зависящей от 5'-метилированного кэпа трансляции и начинают трансляцию во внутренних участках (Pelletier and Sonenberg, 1988; Macejak and Sarnow, 1991). Элементы IRES можно связывать с гетерологичными открытыми рамками считывания. Множественные открытые рамки считывания могут транскрибироваться совместно, каждая из которых отделена IRES, что создает полицистронные транскрипты. Множественные гены можно эффективно экспрессировать с использованием одного промотора/энхансера для транскрипции одного транскрипта (см. патенты США №№ 5925565 и 5935819, включенные в настоящее описание в качестве ссылки).

3. Подвергаемые селекции и скринингу маркеры.

В некоторых вариантах осуществления клетки, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, можно идентифицировать in vitro или in vivo по кодированию подвергаемого скринингу или селективного маркера в экспрессирующем векторе. При транскрипции и трансляции маркер придает идентифицируемое изменение клетке, делающее возможной простую идентификацию клеток, содержащих экспрессирующий вектор. Как правило, селективный маркер придает свойство, делающее возможной селекцию. Положительный селективный маркер является селективным маркером, в случае которого наличие маркера делает возможной его селекцию, в то время как отрицательный селективный маркер является селективным маркером, в случае которого его наличие предотвращает его селекцию. Примером положительного селективного маркера является маркер резистентности к лекарственному средству.

B. Клетки-хозяева.

В рамках изобретения термины "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" можно использовать взаимозаменяемо. Все эти термины также включают их потомство, представляющее собой любое и все из последующих поколений. Следует понимать, что все потомство может не являться идентичным в силу умышленных или неумышленных мутаций. В контексте экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты термин "клетка-хозяин" относится к прокариотической или эукариотической клетке, и он включает любой трансформируемый организм, способный реплицировать вектор или экспрессировать гетерологичный ген, кодируемый вектором. Клетку-хозяина можно использовать и используют в качестве реципиента для векторов или вирусов. Клетку-хозяина можно "трансфицировать" или "трансформировать", что обозначает способ, которым экзогенную нуклеиновую кислоту, такую как кодирующая рекомбинантный белок последовательность, переносят или встраивают в клетку-хозяина. Трансформированная клетка включает первичную клетку индивидуума и ее потомство.

Клетки-хозяева можно получать из прокариот или эукариот, включая бактерии, дрожжевые клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих для репликации вектора или экспрессии части или всех последовательностей нуклеиновой кислоты. Доступны многочисленные линии и культуры клеток для использования в качестве клетки-хозяина, и их можно получать в American Type Culture Collection (ATCC), представляющей собой организацию, служащую архивом живых культур и генетических материалов (www.atcc.org).

C. Системы экспрессии.

Существуют многочисленные системы экспрессии, содержащие по меньшей мере часть или все из композиций, описанных выше. Системы на основе прокариот и/или эукариот можно использовать с настоящим изобретением для получения последовательностей нуклеиновой кислоты или их когнатных полипептидов, белков и пептидов. Многие такие системы являются коммерчески широкодоступными.

Система клеток насекомых/бакуловируса могут приводить к высокому уровню экспрессии белка гетерологичным сегментом нуклеиновой кислоты, как описано в патентах США №№ 5871986, 4879236, включенных в настоящее описание в качестве ссылки, и ее можно приобретать, например, под названием MAXBAC® 2.0 от INVITROGEN® и система бакуловирусной экспрессии BACPACK™ от CLONTECH®.

В дополнение к описанным системам экспрессии по изобретению, другие примеры систем экспрессии включают индуцибельную систему экспрессии млекопитающих COMPLETE CONTROL™ от STRATAGENE®, включающую синтетический экдизон-индуцибельный рецептор, или систему экспрессии pET, систему экспрессии E. coli. Другой пример индуцируемой системы экспрессии доступен в INVITROGEN®, представляющий собой систему T-REX™ (тетрациклин-регулируемой экспрессии), индуцибельную систему экспрессии млекопитающих, в которой используют полноразмерный промотор CMV. INVITROGEN® также предоставляет дрожжевую систему экспрессии, названную системой экспрессии Pichia methanolica, созданную для высокоуровневой продукции рекомбинантных белков в метилотрофных дрожжах Pichia methanolica. Специалисту в этой области будет известно, как экспрессировать вектор, такой как экспрессирующая конструкция, для получения последовательности нуклеиновой кислоты или ее когнатного полипептида, белка или пептида.

IV. Полисахариды.

Иммуногенные композиции по изобретению могут дополнительно содержать капсульные полисахариды, включая один или более из PIA (также известного как PNAG), и/или капсульного полисахарида типа V и/или типа VIII S. aureus, и/или капсульного полисахарида типа I, и/или типа II, и/или типа III S. epidermidis.

A. PIA (PNAG).

В настоящее время очевидно, что различные формы стафилококковых поверхностных полисахаридов, идентифицированные как PS/A, PIA и SAA, являются одним и тем же химическим веществом - PNAG (Maira-Litran et al., 2004). Таким образом, термин PIA или PNAG включает все эти полисахариды или олигосахариды, полученные из них.

PIA является полисахаридным межклеточным адгезином и состоит из полимера β-(1→6)-

связанного глюкозамина, замещенного N-ацетиловым и O-сукциниловым заместителями. Этот полисахарид присутствует и у S. aureus, и S. epidermidis, и его можно выделять из любого источника (Joyce et al., 2003; Maira-Litran et al., 2002). Например, PNAG можно выделять из штамма S. aureus MN8m (WO04/43407). PIA, выделенный из S. epidermidis, является интегральной частью биопленки. Он отвечает за опосредование межклеточной адгезии и, возможно, также функционирует, защищая растущую колонию от иммунного ответа организма-хозяина. Недавно показано, что полисахарид, ранее известный как поли-N-сукцинил-β-(1→6)-глюкозамин (PNSG), не имеет ожидаемой структуры, т.к. идентификация N-сукцинилирования являлась неправильной (Maira-Litran et al., 2002). Таким образом, полисахарид, ранее известный как PNSG и теперь известный как PNAG, также входит в термин PIA.

PIA (или PNAG) может иметь разные размеры, варьирующиеся от более 400 кДа до 75-400 кДа до 10-75кДа до олигосахаридов, состоящих из 30 повторяющихся единиц (β-(1→6)-связанного глюкозамина, замещенного N-ацетиловым и O-сукиниловым заместителями). В иммуногенной композиции по изобретению можно использовать любой размер полисахарида или олигосахарида PIA, в одном из аспектов полисахарид составляет более 40 кДа. Размера можно достигать любым известным в этой области способом, например, микрофлюидизацию, обработку ультразвуком или химическое расщепление (WO 03/53462, EP497524, EP497525). В некоторых аспектах PIA (PNAG) составляет по меньшей мере или по большей мере 40-400кДа, 40-300кДа, 50-350кДа, 60-300кДа, 50-250кДа и 60-200кДа.

PIA (PNAG) может иметь разную степень ацетилирования из-за замены ацетатом по аминогруппам. PIA, полученные in vitro, почти полностью замещен по аминогруппам (95-100%). Альтернативно, можно использовать деацетилированный PIA (PNAG), имеющий менее 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% ацетилирования. Использование деацетилированного PIA (PNAG) является предпочтительным, т.к. неацетилированные эпитопы PNAG являются эффективными в опосредовании опсонофагоцитоза грамположительных бактерий, предпочтительно - S. aureus и/или S. epidermidis. В некоторых аспектах PIA (PNAG) имеет размер от 40 кДа до 300 кДа и деацетилирован таким образом, что ацетилировано менее 60%, 50%, 40%, 30% или 20% аминогрупп.

Термин "деацетилированный PNAG (dPNAG)" относится к полисахариду или олигосахариду PNAG, в котором ацетилировано менее 60%, 50%, 40%, 30%, 20% или 10% аминогрупп. В некоторых аспектах PNAG деацетилируют с образованием dPNAG посредством химической обработки нативного полисахарида. Например, нативный PNAG обрабатывают основным раствором таким образом, что pH повышается до более 10. Например, PNAG обрабатывают 0,1-5 M, 0,2-4 M, 0,3-3 M, 0,5-2 M, 0,75-1,5 M или 1 M NaOH, KOH или NH_4OH. Обработку осуществляют в течение по меньшей мере от 10 до 30 минут, или 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20 ч при температуре 20-100, 25-80, 30-60, или 30-50, или 35-45°C. dPNAG можно получать, как описано в WO 04/43405.

Полисахариды можно конъюгировать или не конъюгировать с белком-носителем.

B. Полисахариды типа 5 и типа 8 из S. aureus.

Большинство штаммов S. aureus, вызывающих инфекцию у человека, содержат полисахариды типа 5 или типа 8. Приблизительно 60% штаммов человек представляют собой тип 8, и приблизительно 30% - тип 5. Структуры антигенов капсульных полисахаридов типа 5 и типа 8 описаны в Moreau et al., (1990) и Fournier et al., (1984). Оба содержат FucNAcp в своей повторяющейся единиц, а также ManNAcA, который можно использовать для включения сульфгидрильной группы.

Структуры представляют собой:

Тип 5

→4)-β-D-ManNAcA(3OAc)-(1→4)-α-L-FucNAc(1→3)-β-D-FucNAc-(1→

Тип 8

→3)-β-D-ManNAcA(4OAc)-(1→3)-α-L-FucNAc(1→3)-β-D-FucNAc-(1→

Недавно (Jones, 2005) с помощью ЯМР-спектроскопии структуры были уточнены:

Тип 5

→4)-β-D-ManNAcA-(1→4)-α-L-FucNAc(3OAc)-(1→3)-β-D-FucNAc-(1→

Тип 8

→3)-β-D-ManNAcA(4OAc)-(1→3)-α-L-FucNAc(1→3)-α-D-FucNAc(1→

Полисахариды можно выделять из соответствующего штамма S. aureus способом, хорошо известным специалисту в этой области, см. патент США № 6294177. Например, ATCC 12902 представляет собой штамм S. aureus типа 5, и ATCC 12605 представляет собой штамм S. aureus типа 8.

Полисахариды имеют нативный размер, или, альтернативно, им можно придавать размер, например, посредством микрофлюидизации, обработки ультразвуком или химической обработки. Настоящее изобретение также охватывает олигосахариды, полученные из полисахаридов типа 5 и 8 S. aureus. Полисахариды типа 5 и 8, включенные в иммуногенную композицию по изобретению, предпочтительно, конъюгируют с белком-носителем, как описано ниже, или, альтернативно, не конъюгируют. Иммуногенные композиции по изобретению альтернативно содержат полисахарид типа 5 или типа 8.

C. Антиген 336 S. aureus.

В варианте осуществления иммуногенная композиция по изобретению содержит антиген 336 S.

aureus, описанный в патенте США № 6294177. Антиген 336 содержит β-связанный гексозамин, он не содержит О-ацетильных групп и специфически связывается с антителами против S. aureus типа 336, депонируемого как ATCC 55804. В варианте осуществления антиген 336 является полисахаридом, имеющим нативный размер, или, альтернативно, им можно придавать размер, например, посредством микрофлюидизации, обработки ультразвуком или химической обработки. Настоящее изобретение также охватывает олигосахариды, полученные из антигена 336. Антиген 336 может являться неконъюгированным или конъюгированным с белком-носителем.

D. Полисахариды типа I, II и III из S. epidermidis.

Проблемы, ассоциированные с использованием полисахаридов в вакцинации, включают то, что полисахариды сами по себе являются плохими иммуногенами. Предпочтительно, полисахариды, используемые в изобретении, связывают с белком-носителем, обеспечивающим фоновой Т-клетке помощь в улучшении иммуногенности. Примеры таких носителей, которые можно конъюгировать с полисахаридными иммуногенами, включают дифтерийный анатоксин и столбнячный анатоксин (DT, DT CRM197 и TT, соответственно), гемоцианин лимфы улитки (KLH) и очищенное производное белка туберкулина (PPD), экзопротеин A Pseudomonas aeruginosa (rEPA), белок D из Haemophilus influenzae, пневмолизин или фрагменты любого из указанных выше. Фрагменты, пригодные для использования, включают фрагменты, включающие Т-хелперные эпитопы. В частности, фрагмент белка D из H. influenza, предпочтительно, будут содержать N-концевую 1/3 белка. Белок D является IgD-связывающим белком из Haemophilus influenzae (EP 0 594 610 B1) и мощным иммуногеном. Кроме того, стафилококковый белки можно использовать в качестве белка-носителя в конъюгатах полисахаридов по изобретению.

Белок-носитель, который будет особенно предпочтительно использовать в контексте стафилококковой вакцины, является стафилококковым альфа-анатоксином. Нативную форму можно конъюгировать с полисахаридом, т.к. конъюгация снижает токсичность. Предпочтительно, генетически детоксифицированные альфа-токсины, такие как варианты His35Leu или His35Arg, используют в качестве носителей, т.к. остаточная токсичность является более низкой. Альтернативно, альфа-токсин химически детоксифицируют посредством обработки кросс-линкером, формальдегидом или глутаральдегидом. Генетически детоксифицированный альфа-токсин, необязательно, химически детоксифицируют, предпочтительно, посредством обработки кросс-линкером, формальдегидом или глутаральдегидом для дополнительного снижения токсичности.

Полисахариды можно связывать с белками-носителями любым известным способом (например, способами, описанными в патентах США №№ 4372945, 4474757 и 4356170). Предпочтительно, осуществляют реакцию конъюгации CDAP (см. WO 95/08348). В CDAP цианилирующий реагент 1-цианодиметиламинопиридиния тетрафторборат (CDAP) предпочтительно используют для синтеза конъюгатов полисахарид-белок. Реакцию цианилирования можно проводить в относительно мягких условиях, позволяющих избегать гидролиза щелочно-чувствительных полисахаридов. Этот синтез делает возможным прямое сопряжение с белком-носителем.

Конъюгация, предпочтительно, включает получение прямой связи между белком-носителем и полисахаридом. Необязательно, спейсер (такой как дигидрид адипиновой кислоты (ADH)) можно встраивать между белком-носителем и полисахаридом.

V. Иммунный ответ и анализы.

Как указано выше, изобретение относится к вызыванию или индуцированию иммунного ответа у индивидуума против пептида варианта SpA или коагулазы. В одном из вариантов осуществления иммунный ответ может приводить к защите или лечению индивидуума, имеющего, как предполагают, имеющего или имеющего риск развития инфекции или родственного заболевания, в частности, связанного со стафилококками. Одним из способов применения иммуногенных композиций по изобретению является профилактика нозокомиальных инфекций посредством инокуляции индивидуума перед проведением процедур в клинике или другой среде, имеющей повышенный риск инфекции.

A. Иммунологические анализы.

Настоящее изобретение относится к реализации серологических анализов для оценки того, индуцируется или вызывает ли иммунный ответ композициям по изобретению и до какой степени. Существует множество типов иммунологических анализов, которые можно реализовывать. Иммунологические анализы, включенные в настоящее изобретение, включают, в качестве неограничивающих примеров, анализы, описанные в патенте США № 4367110 (двойной анализ сэндвич-типа с использованием моноклональных антител) и патенте США № 4452901 (вестерн-блоттинг). Другие анализы включают иммунопреципитацию меченых лигандов и иммуноцитохимию in vitro и in vivo.

Иммунологические анализы, как правило, являются анализами связывания. Некоторые предпочтительные иммунологические анализы представляют собой различные типы твердофазных иммуноферментных анализов (ELISA) и радиоиммунологических анализов (RIA), известных в этой области. Иммуногистохимическая детекция с использованием тканевых срезов также особенно подходит. В одном из примеров антитела или антигены иммобилизуют на выбранной поверхности, такой как лунка в полистироловом планшете для микротитрования, тест-полоска или матрикс колонки. Затем в лунки добавляют тестовую композицию, как предполагают, содержащую желаемый антиген или антитело, такую как кли-

нический образец. После связывания и промывки для удаления неспецифически связавшихся иммунных комплексов, можно определять связанный антиген или антитело. Детекции, как правило, достигают посредством добавления другого антитела, специфического для желаемого антигена или антитела, связанного с детектируемой меткой. Этот тип ELISA известен как "ELISA сэндвич-типа". Детекции также можно достигать посредством добавления второго антитела, специфического для желаемого антигена, с последующим добавлением третьего антитела, имеющего аффинность связывания со вторым антителом, при этом третье антитело связано с детектируемой меткой.

Конкурентные ELISA также являются возможными воплощениями, в которых тестовые образцы конкурируют за связывание с известными количествами меченых антигенов или антител. Количество реакционноспособных частиц в неизвестном образце определяют посредством смешивания образца с известными мечеными частицами до или во время инкубации с покрытыми лунками. Наличие реакционноспособных частиц в образце снижает количество меченых частиц, доступных для связывания, и, таким образом, снижает конечный сигнал. Независимо от используемого формата, ELISA обладают некоторыми общими признаками, такими как покрытие, инкубация или связывание, промывка для удаления неспецифически связанных частиц и детекция связанных иммунных комплексов.

Антиген или антитела также можно связывать с твердой подложкой, например, в форме планшета, бус, тест-полосок, мембраны или матрикса колонки, и образец, подлежащий анализу, наносят на иммобилизованный антиген или антитело. При покрывании планшета антигеном или антителом, как правило, будут инкубировать лунки планшета с раствором антигена или антитела в течение ночи или в течение определенного периода времени. Затем лунки планшета будут промывать для удаления не полностью адсорбированного материала. Затем любые оставшиеся доступные поверхности лунок "покрывают" неспецифическим белком, являющимся антигенно нейтральным в отношении тестовых антисывороток. Они включают бычий сывороточный альбумин (BSA), казеин и растворы порошкового молока. Покрытие делает возможным блокирование неспецифических участков адсорбции на иммобилизационной поверхности и, таким образом, снижает фоновый сигнал, вызванный неспецифическим связыванием антисывороток на поверхности.

B. Диагностика бактериальной инфекции.

В дополнение к использованию белков, полипептидов и/или пептидов, а также антител, связывающих эти полипептиды, белки и/или пептиды, для лечения или профилактики инфекции, как описано выше, настоящее изобретение относится к применению этих полипептидов, белков, пептидов и/или антител множеством способов, включая детекцию наличия стафилококков для диагностики инфекции у пациента или на медицинском оборудовании, которое также может быть инфицировано. В рамках изобретения предпочтительный способ детекции наличия инфекций включает стадии получения образца, как предполагают, инфицированного одним или более видами или штаммами стафилококковых бактерий, такого как образца, полученного из индивидуума, например, из крови, слюны, тканей, кости, мышц, хрящей или кожи индивидуума. После выделения образца можно осуществлять диагностические анализы с использованием полипептидов, белков, пептидов и/или антител по настоящему изобретению для детекции наличия стафилококков, и такие способы анализы для определения такого наличия в образце хорошо известны специалистам в этой области и включают способы, такие как радиоиммунологический анализ, анализ вестерн-блоттинга и анализы ELISA. В основном, в рамках изобретения предусмотрен способ диагностики инфекции, где образец, как предполагают, инфицированный стафилококками, содержит добавленный полипептид, белок, пептид, антитело или моноклональное антитело в соответствии с настоящим изобретением, и стафилококки определяют по связыванию антитела с полипептидами, белками и/или пептидами или связыванию полипептидов, белков и/или пептидов с антителами в образце.

Таким образом, антитела по изобретению можно использовать для профилактики инфекции стафилококковыми бактериями (т.е. пассивной иммунизации), лечения текущей инфекции или применения в качестве исследовательского инструмента. В рамках изобретения термин "антитела" включает моноклональные, поликлональные, химерные, одноцепочечные, биспецифические, симианизированные и гуманизированные или приматизированные антитела, а также Fab-фрагменты, такие как фрагменты, сохраняющие специфичность связывания антител, включая продукты экспрессионной библиотеки иммуноглобулинов Fab. Таким образом, изобретение относится к применению отдельных цепей, таких как вариабельные области тяжелых и легких цепей антител. Получение любых из этих типов антител или фрагментов антител хорошо известно специалистам в этой области. Конкретные примеры получения антитела против бактериального белка можно найти в публикации патентной заявки США № 20030153022, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Любые из указанных выше полипептидов, белков, пептидов и/или антител можно метить напрямую с помощью детектируемой метки для идентификации и количественного анализа стафилококковых бактерий. Метки для использования в иммунологических анализах, как правило, известны специалистам в этой области и включают ферменты, радиоактивные изотопы и флуоресцентные, люминесцентные и хромогенные вещества, включая окрашенные частицы, такие как коллоидное золото или латексные частицы. Подходящие иммунологические анализы включают твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA).

С. Протективный иммунитет.

В некоторых вариантах осуществления изобретения белковоподобные композиции придают индивидууму протективный иммунитет. Термин "протективный иммунитет" относится к способности организма развивать специфический иммунный ответ, защищающий индивидуума от развития конкретного заболевания или состояния, включающего возбудителя, против которого развивается иммунный ответ. Иммуногенно эффективное количество может придавать индивидууму протективный иммунитет.

В рамках изобретения в описании и формуле изобретения термин "полипептид" или "пептид" относится к фрагменту из аминокислот, ковалентно связанных пептидными связями. Разные полипептиды обладают разной функциональностью по настоящему изобретению. Хотя по одному из аспектов полипептид получают из иммуногена, предназначенного для индуцирования активного иммунного ответа у реципиента, в другом аспекте изобретения полипептид получают из антитела, возникающего после развития активного иммунного ответа у, например, животного, и которое может служить для индуцирования пассивного иммунного ответа у реципиента. Однако в обоих случаях полипептид кодируется полинуклеотидом с любым возможным использованием кодонов.

В рамках изобретения фраза "иммунный ответ" относится к развитию гуморального (опосредованного антителами), клеточного (опосредованного антиген-специфическими Т-клетками или их продуктами секреции) или и гуморального, и клеточного ответа против белка, пептида, углевода или полипептида по изобретению в пациента-реципиента. Такой ответ может являться активным ответом, индуцируемым введением иммуногена, или пассивным ответом, индуцируемым введением антитела, антителосодержащего материала или примированных Т-клеток. Клеточный иммунный ответ вызывается презентированием полипептидных эпитопов, связанных с молекулами MHC класса I или класса II, для активации антиген-специфических $CD4^+$ Т-хелперных клеток и/или $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток. Ответ также может включать активацию моноцитов, макрофагов, NK-клеток, базофилов, дендритных клеток, астроцитов, клеток микроглии, эозинофилов или других компонентов врожденного иммунитета. В рамках изобретения термин "активный иммунитет" относится к любому иммунитету, придаваемому индивидууму посредством введения антигена.

В рамках изобретения термин "пассивный иммунитет" относится к любому иммунитету, придаваемому индивидууму без введения ему антигена. Таким образом, "пассивный иммунитет" включает, в качестве неограничивающих примеров, введение активированных иммунных эффекторов, включая клеточные медиаторы или белковые медиаторы (например, моноклональные и/или поликлональные антитела) иммунного ответа. Композицию моноклональных или поликлональных антител можно использовать в пассивной иммунизации для профилактики или лечения инфекции организмами, несущими антиген, распознаваемый антителом. Композиция антител может включать антитела, связывающиеся с различными антигенами, которые, в свою очередь, могут быть ассоциированы с различными организмами. Антительный компонент может представлять собой поликлональную антисыворотку. В некоторых аспектах антитело или антитела подвергнуты аффинной очистке из животного или второго индивидуума, стимулированного антигенами. Альтернативно, можно использовать смесь антител, являющуюся смесью моноклональных и/или поликлональных антител против антигенов, присутствующих в тех же, родственных или других микроорганизмах или организмах, такие как грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии, включая, в качестве неограничивающих примеров, бактерии Staphylococcus.

Пассивным иммунитетом можно обеспечивать пациента или индивидуума посредством введения пациента иммуноглобулинов (Ig) и/или других иммунных факторов, полученных из донора или другого источника, не являющегося пациентом, имеющего известную иммунореактивность. В других аспектах антигенную композицию по настоящему изобретению можно вводить индивидууму, который затем действует в качестве источника или донора для глобулина, продуцируемого в ответ на стимуляцию антигенной композицией ("гипериммунный глобулин"), содержащей антитела против Staphylococcus или другого организма. Обработанный таким образом индивидуум будет сдавать плазму, из которой затем будут получать гипериммунный глобулин с помощью общепринятого способа фракционирования плазмы и вводить другому индивидууму для придания резистентности к стафилококковой инфекции или для ее лечения. Гипериммунные глобулины по изобретению особенно подходят для иммунокомпрометированных индивидуумов, индивидуумов, подвергаемых инвазивными процедурами, или когда время не позволяет индивидууму продуцировать свои собственные антитела в ответ на вакцинацию. См. патенты США №№ 6936258, 6770278, 6756361, 5548066, 5512282, 4338298 и 4748018, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме в качестве примеров способов и композиций, относящихся к пассивному иммунитету.

В целях по изобретению термины "эпитоп" и "антигенная детерминанта" используют взаимозаменяемо для обозначения участка на антигене, на который В- и/или Т-клетки отвечают или который распознают. В-клеточные эпитопы могут образовываться из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, располагающихся смежно в силу третичного фолдинга белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются после воздействия денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образующиеся при третичном фолдинге, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3 и, более типично, по

меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеноструктурную кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols (1996). Антитела, распознающие один и тот же эпитоп можно идентифицировать в простом иммунологическом анализе, демонстрируя способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью. Т-клетки распознают непрерывные эпитопы из приблизительно девяти аминокислот для $CD8^+$ клеток или приблизительно 13-15 аминокислот для $CD4^+$ клеток. Т-клетки, распознающие эпитоп, можно идентифицировать с помощью анализов in vitro, в которых измеряют антиген-зависимую пролиферацию, что определяют по включению ^{3}H-тимидина примированными Т-клетками в ответ на эпитоп (Burke et al., 1994), антиген-зависимого цитолиза (анализ цитотоксических Т-лимфоцитов, Tigges et al., 1996) или секреции цитокинов.

Наличие клеточно-опосредованного иммунного ответа можно определять посредством анализов пролиферации ($CD4^+$ Т-клеток) или анализов CTL (цитотоксических Т-лимфоцитов). Относительный вклад гуморальных и клеточных ответов в протективный или терапевтический эффект иммуногена можно различать посредством раздельного выделения IgG и Т-клеток из иммунизированного сингенного животного и измерения протективного или терапевтического эффекта у второго индивидуума.

В рамках изобретения термины "антитело" или "иммуноглобулин" используют взаимозаменяемо для обозначения любого из нескольких классов структурно родственных белков, функционирующих как часть иммунного ответа животного или реципиента, где белки включают IgG, IgD, IgE, IgA, IgM и родственные белки.

В нормальных физиологических условиях антитела обнаруживают в плазме и других физиологических жидкостях и в мембране некоторых клеток, и они продуцируются лимфоцитами типа В-клеток или их функциональным эквивалентом. Антитела класса IgG состоят из четырех полипептидных цепей, связанных дисульфидными связями. Четыре цепи интактных молекул IgG представляют собой две идентичные тяжелые цепи, обозначаемые как Н-цепи, и две идентичные легкие цепи, обозначаемые как L-цепи.

Для получения поликлональных антител организм-хозяина, такого как кролик или коза, иммунизируют антигеном или фрагментом антигена, как правило, с адъювантом и, при необходимости, связанным с носителем. Затем антитела против антигена собирают из сывороток организма-хозяина. Поликлональное антитело можно подвергать аффинной очистке против антигена, делая их моноспецифическими.

Моноклональные антитела можно получать посредством гипериммунизации соответствующего донора с использованием антигена или ex vivo с использованием первичных культур клеток селезенки или линий клеток, полученных из селезенки (Anavi, 1998; Huston et al., 1991; Johnson et al., 1991; Mernaugh et al., 1995).

В рамках изобретения, фраза "иммунологическая часть антитела" включает Fab-фрагмент антитела, Fv-фрагмент антитела, тяжелую цепь антитела, легкую цепь антитела, гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи и легкой цепи антитела, вариабельный фрагмент легкой цепи антитела, вариабельный фрагмент тяжелой цепи антитела и одноцепочечный вариант антитела, также известный как scFv. Кроме того, термин включает химерные иммуноглобулины, являющиеся продуктами экспрессии слитых генов, полученных из разных видов, одним из видов может являться человеком, в случае чего химерный иммуноглобулин указывают как гуманизированный. Как правило, иммунологическая часть антитела конкурирует с интактным антителом, из которого она получена, за специфическое связывание с антигеном.

Необязательно, антитело или, предпочтительно, иммунологическую часть антитела можно химически конъюгировать или экспрессировать как слитый белок с другими белками. В целях по изобретению все такие слитые белки включены в определение антител или иммунологической части антитела.

В рамках изобретения термины "иммуногенное средство", или "иммуноген", или "антиген" используют взаимозаменяемо для описания молекулы, способной индуцировать иммунный ответ против нее самой после введения реципиенту в отдельности, в комбинации с адъювантом или презентированным на носителе.

D. Способы лечения.

Способ по настоящему изобретению относится к лечению заболевания или состояния, вызванного стафилококковым патогеном. Иммуногенный полипептид по изобретению можно вводить для индуцирования иммунного ответа у индивидуума, инфицированного стафилококком или, как предполагают, подвергнутого воздействию стафилококков. Способы можно использовать в отношении индивидуумов, тест-положительных на воздействие стафилококков или которых считают имеющими риск инфекции с учетом возможного воздействия.

В частности, настоящее изобретение относится к способу лечения стафилококковой инфекции, в частности, госпитальных нозокомиальных инфекций. Иммуногенные композиции и вакцины по изобретению особенно предпочтительно использовать в случаях плановой хирургической операции. Такие пациенты будут заранее знать дату хирургического вмешательства, и их можно заранее прививать. Иммуногенные композиции и вакцины по изобретению также предпочтительно использовать для прививания работников здравоохранения.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство вводят в присутствии адъювантов,

или носителей, или других стафилококковых антигенов. Кроме того, в некоторых примерах лечение включает введение других средств, общеупотребительных против бактериальной инфекции, таких как один или более антибиотиков.

Использование пептидов для вакцинации может потребовать, необязательно, конъюгации пептида с иммуногенным белком-носителем, таким как поверхностный антиген гепатита B, гемоцианин морского блюдца или бычий сывороточный альбумин. Способы осуществления этой конъюгации хорошо известны в этой области.

VI. Вакцина и другие фармацевтические композиции и введение.

A. Вакцины.

Настоящее изобретение относится к способам профилактики или улучшения стафилококковых инфекций, в частности, госпитальных нозокомиальных инфекций. В связи с этим, изобретение относится к вакцинам для применения в вариантах осуществления активной и пассивной иммунизации. Иммуногенные композиции, как предполагают, пригодные для использования в качестве вакцины, можно получать из иммуногенных полипептидов SpA, таких как вариант домена D SpA, или иммуногенных коагулаз. В других вариантах осуществления SpA или коагулазы можно использовать в комбинации с другими секретируемыми белками вирулентности, поверхностными белками или их иммуногенными фрагментами. В некоторых аспектах антигенный материал подвергают обширному диализу для удаления нежелательных низкомолекулярных молекул и/или лиофилизируют для более легкого составления в желаемом носителе.

Другие варианты вакцины на основе белков/пептидов включают встраивание нуклеиновых кислот, кодирующих антигены, в качестве ДНК-вакцин. В связи с этим, в недавних статьях описано конструирование рекомбинантных вирусов осповакцины, экспрессирующих 10 смежных минимальных эпитопов CTL (Thomson, 1996) или комбинацию эпитопов B-клеток, цитотоксических T-лимфоцитов (CTL) и T-хелперов (Th) из нескольких микроорганизмов (An, 1997), и успешное использование таких конструкций для иммунизации мышей для примирования протективных иммунных ответов. Таким образом, в литературе имеется достаточно доказательств успешного использования пептидов, активированных пептидами антигенпрезентирующих клеток (APC) и пептид-кодирующих конструкций для эффективного in vivo примирования протективных иммунных ответов. Использование последовательностей нуклеиновой кислоты в качестве вакцин описано в патентах США №№ 5958895 и 5620896.

Получение вакцин, содержащих полипептидные или пептидные последовательности в качестве активных ингредиентов, как правило, хорошо известно в этой области, как описано в патентах США №№ 4608251; 4601903; 4599231; 4599230; 4596792 и 4578770, все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки. Как правило, такие вакцины получают в виде инъецируемых средств в качестве жидких растворов или суспензий: также можно получать твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией. Препарат также можно эмульгировать. Активный иммуногенный ингредиент зачастую смешивают с эксципиентами, являющимися фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин, этанол или т.п. и их комбинации. Кроме того, при желании, вакцина может содержать количества вспомогательных веществ, таких как увлажнители или эмульгаторы, pH-буферные средства или адъюванты, повышающие эффективность вакцин. В конкретных вариантах осуществления вакцины составляют с комбинацией веществ, как описано в патентах США №№ 6793923 и 6733754, включенных в настоящее описание в качестве ссылки.

Вакцины можно общепринятым образом вводить парентерально, посредством инъекции, например, подкожной или внутримышечной. Дополнительные составы, подходящие для других способов введения, включают суппозитории и, в некоторых случаях, пероральные составы. В случае суппозиториев общепринятые связывающие средства и носители могут включать, например, полиалкиленгликоли или триглицериды: такие суппозитории можно получать из смесей, содержащих активный ингредиент в диапазоне от приблизительно 0,5% до приблизительно 10%, предпочтительно - от приблизительно 1% до приблизительно 2%. Пероральные составы включают такие общепринято используемые эксципиенты, как, например, маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлозу, карбонат магния фармацевтической категории и т.п. Эти композиции имеют форму растворов, суспензий, таблеток, пилюлей, капсул, составов с замедленным высвобождением или порошков и содержат от приблизительно 10% до приблизительно 95% активного ингредиента, предпочтительно - от приблизительно 25% до приблизительно 70%.

Полипептиды и полипептид-кодирующие конструкции ДНК можно составлять в вакцину в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают кислые соли присоединения (образующиеся со свободными аминогруппами пептида) и соли, образованные с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорные кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п.

Как правило, вакцины вводят способом, совместимым с лекарственным составом и в таком количестве, которое будет терапевтически эффективным и иммуногенным. Вводимое количество зависит от индивидуума, подлежащего лечению, включая способность иммунной системы индивидуума синтезировать антитела и желаемую степень защиты. Точные количества необходимого активного ингредиента,

подлежащие введению, зависят от решения практикующего специалиста. Однако подходящие диапазоны доз составляют порядка нескольких сотен микрограммов активного ингредиента на вакцинацию. Подходящие режимы начального введения и бустерного введения также варьируются, но типичными являются начальное введение с последующими инокуляциями или другими введениями.

Способ использования может широко варьироваться. Можно использовать любые из общепринятых способов введения вакцины. Считают, что они включают пероральное использование в твердом физиологически приемлемом основании или физиологически приемлемой дисперсии, парентерально, посредством инъекции и т.п. Доза вакцины будет зависеть от пути введения и варьироваться в зависимости от размера и состояния здоровья индивидуума.

В некоторых случаях желательными будут многочисленные введения вакцины, например, 2, 3, 4, 5, 6 или более введений. Вакцинации можно осуществлять с интервалами от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 до 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12 недель, включая все диапазоны между ними. Периодические бустерные введения с интервалами 1-5 лет будут желательными для поддержания протективных уровней антител. После курса иммунизации могут следовать анализы на антитела против антигенов, как описано в патентах США №№ 3791932; 4174384 и 3949064.

1. Носители.

Указанная композиция может варьироваться по своей иммуногенности. Таким образом, зачастую необходимо стимулировать иммунную систему организма-хозяина, чего можно достигать посредством связывания пептида или полипептида с носителем. Примерами носителей и предпочтительными носителями являются гемоцианин морского блюдца (KLH) и бычий сывороточный альбумин (BSA). Другие альбумины, такие как овальбумин, сывороточный альбумин мыши или сывороточный альбумин кролика, также можно использовать в качестве носителей. Средства конъюгации полипептида с белком-носителем хорошо известны в этой области и включают глутаральдегид, m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир, карбодиимид и бис-биазотированный бензидин.

2. Адъюванты.

Иммуногенность полипептидных или пептидных композиций можно повышать с использованием неспецифических стимуляторов иммунного ответа, известных как адъюванты. Подходящие адъюванты включают все приемлемые иммуностимулирующие соединения, такие как цитокины, токсины или синтетические композиции. Ряд адъювантов можно использовать для повышения гуморального ответа против варианта полипептида SpA, или коагулазы, или любого другого бактериального белка, или комбинации, представленной в настоящем описании. Адъюванты могут (1) захватывать антиген в организме, чтобы вызвать медленное высвобождение; (2) привлекать клетки, участвующие в иммунном ответе, в место введения; (3) индуцировать пролиферацию или активацию клеток иммунной системы; или (4) улучшать распространение антигена по всему организму индивидуума.

Адъюванты включают, в качестве неограничивающих примеров, эмульсии "масло-в-воде", эмульсии "вода-в-масле", минеральные соли, полинуклеотиды и природные вещества. Конкретные адъюванты, которые можно использовать, включают ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-12, γ-интерферон, ГМ-КСФ, БЦЖ, соли алюминия, такие как гидроксид алюминия или другие соединения алюминия, соединения MDP, такие как thur-MDP и nor-MDP, CGP (MTP-PE), липид A, и монофосфорил-липид A (MPL). RIBI, содержащий три компонента, выделенных из бактерий, MPL, димиколят трегалозы (TDM) и скелет клеточной стенки (CWS) в эмульсии 2% сквален/Tween 80. Даже можно использовать антигены MHC. Другие адъюванты или способы описаны в патентах США №№ 6814971, 5084269, 6656462, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления адъювант содержит иммуностимулятор. Такие иммуностимуляторы могут включать, в качестве неограничивающих примеров, стимуляторы паттерн-распознающих рецепторов, таких как Толл-подобные рецепторы, RIG-1 и NOD-подобные рецепторы (NLR), минеральные соли, такие как алюмокалиевые квасцы, алюмокалиевые квасцы в комбинации с монофосфорил-липидом (MPL) A Enterobacteria, таких как Escherihia coli, Salmonella minnesota, Salmonella typhimurium или Shigella flexneri,или конкретно с MPL.RTM. (ASO4), MPL A указанных выше бактерий отдельно, сапонины, такие как QS-21, Quil-A, ISCOM, ISCOMATRIX, эмульсии, такие как MF59, монтанид, ISA 51 и ISA 720, AS02 (QS21+сквален+MPL.), липосомы и липосомальные составы, такие как AS01, синтезированные или конкретно полученные микрочастицы и микроносители, такие как полученные из бактерий везикулы внешней мембраны (OMV) N. gonorrheae, Chlamydia trachomatis и др., или частицы хитозана, депообразующие средства, такие как блок-сополимеры плюроники, конкретно модифицированные или полученные пептиды, такие как мурамилдипептид, аминоалкилглюкозаминид-4-фосфаты, такие как RC529, или белки, такие как бактериальные анатоксины или фрагменты токсинов.

Различные способы достижения адъювантного эффекта для вакцины включают использование средств, таких как гидроксид или фосфат алюминия (алюмокалиевые квасцы), общепринято используемые в виде раствора от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,1% в фосфатно-солевом буфере, смеси с синтетическими полимерами сахаров (Carbopol®), используемые в виде раствора приблизительно 0,25%, агрегацию белка в вакцине при термической обработке с использованием температур в диапазоне

от приблизительно 70° до приблизительно 101°C в течение от 30 с до 2 мин, соответственно. Для достижения адъювантного эффекта также можно использовать агрегацию посредством реактивации обработанными пепсином (Fab) антителами с альбумином; смешивание с бактериальными клетками (например, C. parvum), эндотоксинами или липополисахаридными компонентами грамотрицательных бактерий; эмульгирование в физиологически приемлемых масляных носителей (например, маннид-моноолеат (Aracel A)); или эмульгирование с 20% раствором перфторуглерода (Fluosol-DA®), используемого в качестве блок-заместитетля.

Примеры адъювантов и предпочтительные адъюванты включают полный адъювант Фрейнда (неспецифический стимулятор иммунного ответа, содержащий погибшие Mycobacterium tuberculosis), неполные адъюванты Фрейнда и гидроксид алюминия.

В некоторых аспектах предпочтительно, чтобы выбранный адъювант являлся преференциальным индуктором Th1- или Th2-типа ответа. Высокие уровни цитокинов Th1-типа имеют склонность к индуцированию клеточно-опосредованных иммунных ответов на указанный антиген, в то время как высокие уровни цитокинов Th2-типа имеют склонность к индуцированию гуморальных иммунных ответов на антиген.

Различение иммунного ответа Th1- и Th2-типа не является абсолютным. Фактически, индивидуум будет поддерживать иммунный ответ, описываемый как преимущественно Th1 или преимущественно Th2. Однако часто удобно рассматривать семейства цитокинов в терминах описываемого для клонов murine $CD4^+$ Т-клеток мыши Mosmann и Coffman (Mosmann and Coffman, 1989). Как правило, ответы Th1-типа ассоциированы с продукцией цитокинов ИФНγ и ИЛ-2 Т-лимфоцитами. Другие цитокины, зачастую напрямую ассоциированные с индуцированием иммунных ответов Th1-типа, не продуцируются Т-клетками, такие как ИЛ-12. В отличие от этого, ответы Th2-типа ассоциированы с секрецией ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10.

В дополнение к адъювантам, желательным может являться совместное введение модификаторов биологического ответа (BRM) для усиления иммунных ответов. Показано, что BRM положительно регулирует Т-клеточный иммунитет или отрицательно регулирует активность супрессорных клеток. Такие BRM включают, в качестве неограничивающих примеров, циметидин (CIM; 1200 мг/дл) (Smith/Kline, PA); или низкие дозы циклофосфамида (CYP; 300 мг/$м^2$) (Johnson/ Mead, NJ) и цитокины, такие как γ-интерферон, ИЛ-2 или ИЛ-12, или гены, кодирующие белки, участвующие в иммунные хелперные функции, такие как B-7.

B. Липидные компоненты и вещества.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, содержащим один или более липидов, ассоциированных с нуклеиновой кислотой или полипептидом/пептидом. Липид является веществом, нерастворимым в воде и экстрагируемым органическим растворителем. Соединения, иные, чем конкретно представленные в настоящем описании, известны специалисту в этой области как липиды и включены в композиции и способы по настоящему изобретению. Липидный компонент и не-липид можно присоединять друг к другу ковалентно или нековалентно.

Липид может являться природным липидом или синтетическим липидом. Однако, липид, как правило, является биологическим веществом. Биологические липиды хорошо известны в этой области и включают, например, нейтральные жиры, фосфолипиды, фосфоглицериды, стероиды, терпены, лизолипиды, гликосфинголипиды, глюколипиды, сульфатиды, липиды, связанные с жирными кислотами простоэфирной и сложноэфирной связью, и полимеризуемые липиды и их комбинации.

Молекула нуклеиновой кислоты или полипептид/пептид, ассоциированные с липидом, можно диспергировать в растворе, содержащем липид, растворять липидом, эмульгировать с липидом, смешивать с липидом, комбинировать с липидом, ковалентно связывать с липидом, получать в виде суспензии в липиде или иным образом связывать с липидом. Липид или липид-поксвирус-ассоциированная композиция по настоящему изобретению не ограничены любой конкретной структурой. Например, их также можно просто включать в раствор, возможно, получая агрегаты, являющиеся неоднородными по своему размеру или форме. В другом примере они могут присутствовать в бислойной структуре, в виде мицелл или "разрушенной" структуры. В другом неограничивающем примере также предусмотрен комплекс липофектамин(Gibco BRL)-поксвирус или Superfect (Qiagen)-поксвирус.

В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4% приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17%, приблизительно 18%, приблизительно 19%, приблизительно 20%, приблизительно 21%, приблизительно 22%, приблизительно 23%, приблизительно 24%, приблизительно 25%, приблизительно 26%, приблизительно 27%, приблизительно 28%, приблизительно 29%, приблизительно 30%, приблизительно 31%, приблизительно 32%, приблизительно 33%, приблизительно 34%, приблизительно 35%, приблизительно 36%, приблизительно 37%, приблизительно 38%, приблизительно 39%, приблизительно 40%, приблизительно 41%, приблизительно 42%, приблизительно 43%, приблизительно

44%, приблизительно 45%, приблизительно 46%, приблизительно 47%, приблизительно 48%, приблизительно 49%, приблизительно 50%, приблизительно 51%, приблизительно 52%, приблизительно 53%, приблизительно 54%, приблизительно 55%, приблизительно 56%, приблизительно 57%, приблизительно 58%, приблизительно 59%, приблизительно 60%, приблизительно 61%, приблизительно 62%, приблизительно 63%, приблизительно 64%, приблизительно 65%, приблизительно 66%, приблизительно 67%, приблизительно 68%, приблизительно 69%, приблизительно 70%, приблизительно 71%, приблизительно 72%, приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 75%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78%, приблизительно 79%, приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, или любой диапазон между ними, конкретного липида, типа липида или нелипидного компонента, такого как адъювант, антиген, пептид, полипептид, сахар, нуклеиновая кислота или другой материал, представленный в настоящем описании или известный специалисту в этой области. В неограничивающем примере композиция может содержать от приблизительно 10% до приблизительно 20% нейтральных липидов, и от приблизительно 33% до приблизительно 34% цереброзида и приблизительно 1% холестерина. В другом неограничивающем примере липосома может содержать от приблизительно 4% до приблизительно 12% терпенов, где приблизительно 1% мицеллы конкретно представляет собой ликопин, оставляя от приблизительно 3% до приблизительно 11% липосомы как содержащую другие терпены; и от приблизительно 10% до приблизительно 35% фосфатидилхолина, и приблизительно 1% нелипидного компонента. Таким образом, предполагают, что композиции по настоящему изобретению могут содержать любые из липидов, типов липидов или других компонентов в любой комбинации или процентном диапазоне.

C. Комбинированное лечение.

Композиции и связанные способы по настоящему изобретению, в частности, введение секретируемого фактора вирулентности или белка поверхности, включая вариант полипептида или пептида SpA, и/или других бактериальных пептидов или белков пациенту/индивидууму, также можно использовать в комбинации с использованием общепринятых способов терапии. Они включают, в качестве неограничивающих примеров, введение антибиотиков, таких как стрептомицин, ципрофлоксацин, доксициклин, гентамицин, хлорамфеникол, триметоприм, сульфаметоксазол, ампициллин, тетрациклин или различные комбинации антибиотиков.

В одном из аспектов предполагают, что полипептидную вакцину и/или терапию используют в комбинации с антибактериальным лечением. Альтернативно, терапия может предшествовать или следовать после лечения другими средствами с интервалами в диапазоне от минут до недель. В вариантах осуществления, в которых другие средства и/или белки или полинуклеотиды вводят раздельно, как правило, можно обеспечивать, чтобы не проходил значительный период времени между каждым введением, таким образом, что средство и антигенная композиция все равно смогут вызывать предпочтительный комбинированный эффект в отношении индивидуума. В таких случаях предполагают, что можно вводить оба средства в пределах приблизительно 12-24 ч друг от друга или приблизительно 6-12 ч друг от друга. В некоторых случаях желательным может быть значительное продление периода времени введения от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) между соответствующими ведениями.

Можно использовать различные комбинации, например терапия антибиотиками представляет собой "A", и иммуногенный молекула, вводимая как часть режима иммунотерапии, такая как антиген, представляет собой "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

При введении иммуногенных композиций по настоящему изобретению пациенту/индивидууму будут следовать общим способам введения таких соединений, учитывая токсичность, если она есть, композиции SpA или других композиций, представленных в настоящем описании. Ожидают, что циклы лечения будут повторять, по мере необходимости. Также предполагают, что различные стандартные способы терапии, такие как гидратация, можно использовать в комбинации с описанной терапией.

D. Общие фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции вводят индивидууму. Различные аспекты настоящего изобретения включают введение эффективного количества композиции индивидууму. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стафилококковые антигены, члены пути Ess, включая полипептиды или пептиды класса Esa или Esx, и/или члены субстратов сортазы можно вводить пациенту для защиты от инфекции одним или более стафилококковыми патогенами. Альтернативно, экспрессирующий вектор, кодирующий один или более таких полипептидов или пептидов, можно вводить пациенту в качестве профилактического лечения. Кроме того, такие соединения можно вводить в комбинации с антибиотиком или антибактериальным средством. Такие композиции, как правило,

будут растворять или диспергировать в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

В дополнение к соединениям, составленным для парентерального введения, такого как внутривенная или внутримышечная инъекция, другие фармацевтически приемлемые формы включают, например, таблетки или другие твердые формы для перорального введения; капсулы с медленным высвобождением; и любые другие формы, используемые в настоящее время, включая кремы, лосьоны, жидкости для полоскания рта, ингалянты и т.п.

Активные соединения по настоящему изобретению можно составлять для парентерального введения, например, составлять для инъекции внутривенным, внутримышечным, подкожным или даже интраперитонеальным путем. Получение водной композиции, содержащей соединение или соединения, повышающие экспрессию молекулы MHC класса I, будет известно специалистам в этой области с учетом настоящего изобретения. Как правило, такие композиции можно получать в виде инъецируемых средств, жидких растворов или суспензий; также можно получать твердые формы, подходящие для использования для получения растворов или суспензий после добавления жидкости перед инъекцией; и, препараты также можно эмульгировать.

Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей можно получать в воде, соответствующим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Также можно получать дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и маслах. В общепринятых условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного использования, включают стерильные водные растворы или дисперсии; составы, включающие сезамовое масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для экстемпорального получения стерильных инъецируемых растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и текучей до такой степени, чтобы ее легко можно было инъецировать. Она также должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и необходимо предотвращать ее контаминацию микроорганизмами, такими как бактерии и грибы.

Белковоподобные композиции можно составлять в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают кислые соли присоединения (образованные со свободными аминогруппами белка), образованные с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорные кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также можно получать из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п.

Носитель также может являться растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Можно поддерживать правильную текучесть, например, с использованием покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии, и с использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно достигать с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тиомерсала и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированной абсорбции инъецируемых композиций можно достигать с использованием в композициях средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъецируемые растворы получают посредством включения активных соединений в необходимом количество в подходящем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии получают посредством включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъецируемых растворов, предпочтительными способами получения являются способы вакуумной сушки и лиофилизации, приводящие к получению порошка активного ингредиента с любым дополнительным желаемым ингредиентом из ранее стерилизованного фильтрацией раствора.

Введение композиций по настоящему изобретению, как правило, будут осуществлять любым общепринятым путем. Оно включает, в качестве неограничивающих примеров, пероральное, назальное или буккальное введение. Альтернативно, введение можно осуществлять посредством ортотопической, интрадермальной, подкожной, внутримышечной, интраперитонеальной, интраназальной или внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция может являться ингаляционной (например, патент США № 6651655, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Такие композиции, как правило, будут вводить в виде фармацевтически приемлемых композиций, включающих физиологически приемлемые носители, буферы или другие эксципиенты. В рамках изобретения термин "фармацевтически приемлемый" относится к соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые с медицинской точки зрения подходят для контакта с тканями людей и животных без избыточной токсичности, раздражения, аллергического ответа или других осложнений в соответст-

вии с разумным соотношение польза/риск. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, дилюент, эксципиент, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспорте химического вещества.

В случае парентерального введения в водном растворе, например, раствор необходимо соответствующим образом забуферивать, при необходимости, и жидкий дилюент сначала необходимо делать изотоническим с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и интраперитонеального введения. В связи с этим, стерильные водные среды, которые можно использовать, будут известны специалистам в этой области с учетом настоящего описания. Например, одну дозу можно растворять в изотоническом растворе NaCl и добавлять в жидкость для гиподермоклизиса или инъецировать в предполагаемый участок инфузии (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990). Некоторые колебания дозировки обязательно будут происходить в зависимости от состояния индивидуума. Специалист, отвечающий за введение, в любом случае будет определять подходящую дозу для отдельного индивидуума.

Эффективное количество терапевтической или профилактической композиции определяют в зависимости от предполагаемой цели. Термин "однократная доза" или "доза" относится к физически дискретным единицам, подходящим для использования у индивидуума, при этом каждая единица содержит заранее определенное количество композиции, вычисленное для получения желаемых ответов, описанное выше в отношении ее введения, т.е. подходящего пути и схемы лечения. Количество, подлежащее введению, в соответствии с количеством введений и однократной дозой зависит от желаемой защиты.

Точные количества композиции также зависят от решения практикующего специалиста и характерны для каждого индивидуума. Факторы, влияющие на дозу, включают физическое и клиническое состояние индивидуума, путь введения, предполагаемую цель лечения (облегчение симптомов или излечение), и мощность, стабильность и токсичность конкретной композиции.

После составления растворы будут вводить способом, совместимым с лекарственным составом, и в таком количестве, которое будет терапевтически или профилактически эффективным. Составы легко вводят в различных лекарственных формах, таких как тип инъецируемых растворов, описанных выше.

E. Введение in vitro, ex vivo или in vivo.

В рамках изобретения термин "введение in vitro" относится к манипуляциям, осуществляемым в отношении клеток, удаленных или находящихся вне индивидуума, включая, в качестве неограничивающих примеров, клетки в культуре. Термин "введение ex vivo" относится к клеткам, подвергнутым манипуляции in vitro, а затем вводимым индивидууму. Термин "введение in vivo" включает все манипуляции, осуществляемые с индивидуумом.

В некоторых аспектах настоящего изобретения композиции можно вводить in vitro, ex vivo или in vivo. В некоторых вариантах осуществления in vitro линию аутологичных B-лимфоцитов инкубируют с вирусным вектором по настоящему изобретению в течение от 24 до 48 ч, или с вариантом SpA, и/или коагулазой, и/или любой другой композицией, представленной в настоящем описании, в течение двух часов. Затем трансдуцированные клетки можно использовать для анализа in vitro или, альтернативно, введения ex vivo. В патентах США №№ 4690915 и 5199942, включенных в настоящее описание в качестве ссылки, описаны способы манипуляции ex vivo с мононуклеарными клетками крови и клетками костного мозга для терапевтического применения.

F. Антитела и пассивная иммунизация.

Другой аспект изобретения представляет собой способ получения иммуноглобулина для применения в профилактике или лечении стафилококковой инфекции, включающий стадии иммунизации реципиента или донора вакциной по изобретению и выделения иммуноглобулина из реципиента или донора. Иммуноглобулин, полученный этим способом, представляет собой дополнительный аспект изобретения. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноглобулин по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, представляет собой дополнительный аспект изобретения, который можно использовать в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики стафилококковой заболевании. Способ лечения или профилактики стафилококковой инфекции, включающий стадию введения пациенту эффективного количества фармацевтического препарата по изобретению, представляет собой дополнительный аспект изобретения.

Прививочный материал для продукции поликлональных антител, как правило, получают посредством диспергирования антигенной композиции в физиологически приемлемом дилюенте, таком как физиологический раствор, или других адъювантах, подходящих для использования на людях, для получения водной композиции. Иммуностимулирующее количество прививочного материала вводят млекопитающему, а затем привитое млекопитающее поддерживают в течение времени, достаточного для того, чтобы антигенная композиция индуцировала протективные антитела.

Антитела можно выделять до желаемой степени хорошо известными способами, такими как аффинная хроматография (Harlow and Lane, 1988). Антитела могут включать препараты антисыворотки из различных общеупотребительных животных, например, коз, приматов, ослов, свиней, лошадей, морских

свинок, крыс или человека.

Иммуноглобулин, полученный в соответствии с настоящим изобретением, может включать целые антитела, фрагменты антител или субфрагменты. Антитела могут являться целыми иммуноглобулинами любого класса (например, IgG, IgM, IgA, IgD или IgE), химерными антителами или гибридными антителами с двойной специфичностью для двух или более антигенов по изобретению. Они также могут являться фрагментами (например, $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv и т.п.), включая гибридные фрагменты. Иммуноглобулин также включает природные, синтетические или генетически сконструированные белки, действующие подобно антителу посредством связывания со специфическими антигенами с образованием комплекса.

Вакцину по настоящему изобретению можно вводить реципиенту, который затем действует в качестве источника иммуноглобулина, продуцируемого в ответ на стимуляцию специфической вакциной. Подвергнутый такому воздействию индивидуум будет сдавать плазму, из которой будут получать гипериммунный глобулин общепринятым способом фракционирования плазмы. Гипериммунный глобулин будут вводить другому индивидууму для придания резистентности к стафилококковой инфекции или ее лечению. Гипериммунные глобулины по изобретению особенно подходят для лечения или профилактики стафилококкового заболевания у новорожденных, иммунокомпрометированных индивидуумов, или если лечение необходимо и нет времени для продукции антител индивидуумом в ответ на вакцинацию.

Дополнительный аспект изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей два или более моноклональных антитела (или их фрагменты; предпочтительно, человеческие или гуманизированные), реагирующие против по меньшей мере двух компонентов иммуногенной композиции по изобретению, которую можно использовать для лечения или профилактики грамположительных бактерий, предпочтительно - стафилококков, более предпочтительно - S. aureus или S. epidermidis. Такие фармацевтические композиции содержат моноклональные антитела, которые могут являться целыми иммуноглобулинами любого класса, химерными антителами или гибридными антителами со специфичностью к двум или более антигенам по изобретению. Они также могут являться фрагментами (например, $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv и т.п.), включая гибридные фрагменты.

Способы получения моноклональных антител хорошо известны в этой области и могут включать слияние спленоцитов с миеломными клетками (Kohler and Milstein, 1975; Harlow and Lane, 1988). Альтернативно, моноклональные Fv-фрагменты можно получать посредством скрининга подходящей библиотеки фагового дисплея (Vaughan et al., 1998). Моноклональные антитела можно гуманизировать или частично гуманизировать известными способами.

Примеры

Следующие примеры приведены с целью иллюстрирования различных вариантов осуществления изобретения, а не для ограничения настоящего изобретения каким-либо образом. Специалисту в этой области будет понятно, что настоящее изобретение хорошо адаптировано для выполнения задач и достижения упомянутых целей и преимуществ, а также целей, задач и преимуществ, свойственных настоящему изобретению. Настоящие примеры вместе со способами, представленными в настоящем описании, типичны для предпочтительных вариантов осуществления, являются примерами, а не предназначены для ограничения объема изобретения. Изменения в нем и другое применение, входящее в сущность изобретения, определяемую объемом формулы изобретения, будут очевидны специалистам в этой области.

Пример 1. Стафилококковый белок А участвует в персистентной колонизации мышей staphylococcus aureus.

Staphylococcus aureus персистентно колонизирует носоглотку приблизительно трети человеческой популяции, таким образом, способствуя внебольничным и госпитальным инфекциям. Антибиотики в настоящее время используют для деколонизации индивидуумов с повышенным риском инфекции. Однако эффективность антибиотиков ограничена реколонизацией и селекцией в направлении резистентных к лекарственным средствам штаммов. Назальная колонизация запускает IgG-ответы против стафилококковых поверхностных антигенов, однако эти антитела не могут предотвращать последующую колонизацию или заболевание. В этом примере описывают S. aureus WU1, изолят ST88 с мультилокусным типом последовательности, персистентно колонизирующий носоглотку мышей. Описано, что стафилококковый белок А (SpA) необходим для персистирования S. aureus WU1 в носоглотке. По сравнению с животными, колонизированными S. aureus дикого типа, у мышей, колонизированных вариантом Δspa развиваются повышенные IgG-ответы против стафилококковых детерминант колонизации. Иммунизация мышей нетоксигенным вариантом SpA, который не может перекрестно сшивать В-клеточные рецепторы и вызывать гуморальные ответы, приводит к образованию белок А-нейтрализующих антител, способствующих IgG-ответам против колонизации S. aureus и снижающих персистирование патогена.

А. Результаты.

1. Staphylococcus aureus WU1.

В колонии для разведения животных наблюдали вспышку инфекций препуциальной железы у самцов мышей C57BL/6. Образцы собирали из очага аденита препуциальных желез (PGA) и носоглотки самцов и самок мышей C75BL/6J и анализировали по росту на маннитно-солевом агаре (MSA) и агаре Берда-Паркера (BPA). Типирование мультилокусной последовательности и генотипирование spa показало, что животные колонизированы S. aureus ST88 с генотипом spa t186, также отвечающим за PGA у

самцов мышей. S. aureus CC88 с генотипом spa t186 ранее описывали как стабильно колонизирующие изоляты из лабораторных мышей в США (37). Другие генотипы spa включают t325, t448, t690, t755, t786, t2085, t2815, t5562, t11285 и t12341 (37). Новозеландский изолят JSNZ несет другой генотип spa t729 (37). Несмотря на это, S. aureus JSNZ и WU1 обладают общими генами капсульных полисахаридов типа 8, и у них отсутствует ген mecA, а также кодируемые мобильными генетическими элементами (MGE) Т-клеточные суперантигены (37). Кроме того, hlb-конвертирующий фаг, экспрессирующий специфические для человека гены уклонения от иммунного надзора кластера 1 (IEC1) sak (стафилокиназу), chp (CHIPS, хемотаксис-ингибирующий белок S. aureus) и scn (SCIN-A, стафилококковый ингибитор комплемента A), отсутствует в геноме WU1, что приводит к наличию интактного кодирующего α-гемолизин гена (hlb)(38). Необходимо отметить, что кодируемый WU1 IEC2 несет гомолог scn scb/scc (SCIN-B/-C) вместе с hla (α-гемолизином) и ssl12-14 (стафилококковый суперантиген-подобный белок 12-14) (39). В отличие от других изолятов CC88, стабильно колонизирующих мышей (37), геном WU1 несет ген blaZ. При анализе на гены, кодирующие сортаза-заякоренные белки поверхности, наблюдали, что S. aureus WU1 несет гены детерминант, ранее ассоциированных с назальной колонизацией, включая ClfB, IsdA, SdrC, SdrD и SasG (табл. 1).

Таблица 1

Консервативность белковых продуктов избранных открытых рамок считывания в геномах S. aureus WU1, JSNZ и Newman

Белок	**Идентичность аминокислот (%) продукта гена в WU1**	
	JSNZ	**Newman**
SpA	99	98
ClfA	100	93
ClfB	100	96
FnBPA	100	82
FnBPB	87	87
IsdA	100	100
IsdB	99	98
SdrC	100	100
SdrD	95	95
SdrE	100	98
EsxA	100	100
EsxB	100	100
SasA	100	99
SasD	100	99
SasF	100	98
SasI	99	100
SasG	100	69
SasK	100	93[a]
Coa	98	98
vWbp	100	71

Hla	78	99
SCIN	100	45 [b]
Eap	100	99
Efb	100	99
Ebh	99	98
TarS	100	98
a. По сравнению со штаммом S. aureus 04-02981 b. По сравнению со штаммом S. aureus USA300		

Образование абсцесса S. aureus связано с детерминантами бактериальной агглютинации с фибрином (40, 41). Для агглютинации необходимо два секретируемых продукта S. aureus, активирующих протромбин организма-хозяина, для превращения фибриногена в фибрин: коагулаза (Coa) и белок, связывающий фактор фон Виллебранда (vWbp) (40). Фактор агглютинации A (ClfA) связывается с фибриногеном и покрывает стафилококки генерируемыми коагулазой фибриллами фибрина, таким образом, мешая захвату S. aureus и уничтожению фагоцитами организма-хозяина (41, 42). Ген clfA является идентичным в S. aureus WU1 и JSNZ, хотя и демонстрирует аллель-специфические различия относительно clfA из S. aureus Newman (таблица 1), клинического изолята человека CC8, общепринято используемого для лабораторных экспериментов с провокационными пробами с использованием мышей (43). Однако наблюдаемые различия в clfA являются кладо-специфическими, т.к. их можно найти в штаммах CC88, выделенных из человека или мышей (данные не представлены). Продукты генов coa S. aureus WU1, JSNZ и Newman являются, по существу, идентичными (таблица 1). В отличие от этого, продукт гена vwb S. aureus WU1 и JSNZ значительно отличается от S. aureus Newman с наибольшей вариацией последовательности в протромбин-связывающих доменах D1 и D2 (фиг. 1A) и не распознается поликлональными антителами, индуцированными против vWbp Newman (фиг. 1B). Секретируемый vWbp из двух штаммов CC88 могут распознаваться сывороткой, индуцированной против консервативного C-концевого домена vWbp штамма USA300 (фиг. 1C). В отличие от S. aureus Newman, секретирующего большие количества Coa и быстро агглютинирующего плазму человека и мыши, S. aureus WU1 и JSNZ секретируют меньше Coa и агглютинируют плазму мыши легче, чем плазму человека, по сравнению со штаммом Newman (фиг. 1B, D,E). Активность коагулазы S. aureus Newman зависит от экспрессии coa и vwb, т.к. соответствующие мутанты Δcoa, Δvwb и Δcoa Δvwb демонстрируют дефекты агглютинации в плазме мыши и человека (фиг. 1D, E). В совокупности, эти данные позволяют предполагать, что аллель ST88 гена vwb S. aureus WU1 и JSNZ может способствовать эффективному протромбин-опосредованному свертыванию и агглютинации фибрина в плазме мыши, что может поддерживать патогенез инвазивных заболеваний, таких как PGA.

2. S. aureus WU1 персистентно колонизирует носоглотку мышей.

Для анализа S. aureus WU1 на его способность колонизировать мышей анализировали когорты самок (n=10) C57BL/6, распределяя мазки из глотки и экскременты на BPA. Наивных мышей, у которых отсутствует бактериальный рост на BPA, анестезировали и инокулировали посредством пипетирования 10 мкл суспензий 1×10^8 КОЕ S. aureus WU1 в фосфатно-солевом буфере (PBS) в правую ноздрю. Животных анализировали на колонизацию, получая мазок из ротоглотки с недельными интервалами, т.е. через 7, 14, 21, 28, 35 и 42 дня после инокуляции. Мазки распределяли по BPA, инкубировали для образования колоний и подсчитывали (фиг. 2A). Даже без предшествующего лечения антибиотиками или селекции с использованием антибиотиков S. aureus WU1 колонизировал экспериментальных животных с нагрузкой в диапазоне 1,2-2,9 $\log_{10}$ КОЕ на мазок за 42 дня (фиг. 2A). Для валидации персистентной колонизации S. aureus WU1 колонии, полученные через 42 дня, анализировали посредством MLST и генотипирования spa. Данные свидетельствовали о том, что мыши все равно были колонизированы ST88 spa t186, что свидетельствует о том, что S. aureus WU1 персистентно колонизирует носоглотку мышей C57BL/6. В качестве контроля, ложная инокуляция PBS когорт животных C57BL/6J в отдельных клетках, которых держали в том же виварии и на тех же подставках для клеток, что и колонизированные S. aureus WU1 животные, не приводила к стафилококковой колонизации носоглотки (фиг. 2A). Образцы кала мышей в день 42 гомогенизировали в PBS и высевали на маннитно-солевой агар (MSA) для подсчета КОЕ (фиг. 2B). Образцы кала колонизированных S. aureus WU1 мышей содержали 5,1-7,3 $\log_{10}$ КОЕ $г^{-1}$ кала, что свидетельствует о том, что желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) также колонизирован штаммом S. aureus WU1. В качестве контроля, ложно (PBS) инокулированные мыши не имели S. aureus в образцах кала (фиг. 2B).

Колонизация S. aureus WU1 запускает сывороточный IgG-ответ у мышей. В более ранней работе получали антигенный матрикс S. aureus, состоящий из 25 консервативных секретируемых белков. Каждый из 25 рекомбинантных аффинно-меченых белков очищали и иммобилизовали на мембранном филь-

тре (44). Для измерения иммунных ответов организма-хозяина во время колонизации, наивным или колонизированным S. aureus WU1 животным пускали кровь через 15 дней после инокуляции и анализировали сывороточные IgG-ответы посредством инкубации с антигенным матриксом S. aureus. Связывание IgG определяли с использованием IRDye 680-конъюгированного IgG козы против мыши (LI-COR) и количественно анализировали посредством инфракрасной визуализации. Этот эксперимент показал, что колонизация S. aureus WU1 приводила к повышениям сывороточного IgG против сортаза-заякоренных поверхностных белков ClfA, ClfB, IsdA и IsdB и гигантского, связывающегося с внеклеточным матриксом белка (Ebh), размера клеток и синтеза пептидогликановых детерминант S. aureus (45) (табл. 2).

Таблица 2

Сывороточные IgG-ответы у мышей C57BL/6J, колонизированных S. aureus WU1 или его вариантом Δspa

	Антигены	**WU1 (колонизированные)**		**WU1Δspa (колонизированные)**		**WU1Δspa (очищенные)**	
		Кратное изменение[b]	**Значение p[c] (относительно наивных)**	**Кратное изменение[b]**	**Значение p[c] (относительно колонизированных WU1)**	**Кратное изменение[b]**	**Значение p[c] (относительно колонизированных WU1Δspa)**
Заякоренный в клеточной стенке поверхностный белок	**SpA_{KKAA}**	1,3±0,08	n.s	1,1±0,06	n.s.	1,1±0,49	n.s.
	ClfA	5,3±2,77	<0,0001	4,3 ± 0,83	n.s.	3,5±1,69	n.s.
	ClfB	4,8±0,72	0,001	3,9±1,28	n.s.	17,4±4,70	<0,0001
	Ebh	3,7±0,50	0,0454	2,8±0,62	n.s.	3,9±1,56	n.s.
	FnbpA	1,9±0,89	n.s.	1,3±0,79	n.s.	2,6±0,96	n.s.
	FnbpB	2,6±1,33	n.s.	2,3±0,85	n.s.	4,3±0,96	n.s.
	IsdA	4,5±0,84	0,0036	2,1±0,22	n.s.	13,0±0,44	<0,0001
	IsdB	5,2±1,43	0,0002	2,7±0,83	n.s.	2,8±1,18	n.s.
	SdrC	1,1±0,14	n.s.	1,5±0,45	n.s.	1,7±0,69	n.s.
	SdrD	1,5±1,08	n.s.	1,0±0,25	n.s.	1,2±0,35	n.s.
	SdrE	1,8±0,52	n.s.	2,9±0,65	n.s.	1,4±0,60	n.s.
	SasA	3,0±1,3	n.s.	1,1±0,4	n.s.	3,3±1,14	n.s.

		3		4			
	SasB	5,1±2,22	n.s.	1,0±0,34	n.s.	5,7±4,42	n.s.
	SasD	2,7±1,47	n.s.	0,7±0,23	n.s.	1,3±0,59	n.s.
	SasF	1,2±0,61	n.s.	0,9±0,63	n.s.	1,2±0,32	n.s.
	SasG	2,1±0,24	n.s.	1,2±0,47	n.s.	10,3±1,19	<0,0001
	SasI	1,4±0,75	n.s.	1,2±0,08	n.s.	1,4±0,53	n.s.
	SasK	2,5±0,26	n.s.	1,3±0,30	n.s.	1,7±1,09	n.s.
Секретируемый белок	**Coa**	2,7±0,29	n.s.	1,2±0,45	n.s.	1,5±0,45	n.s.
	vWbp	2,0±0,97	n.s.	1,4±0,59	n.s.	1,7±0,89	n.s.
	Hla	1,8±0,65	n.s.	1,2±0,46	n.s.	1,2±0,34	n.s.
	SCIN	4,3±1,23	0,0071	2,8±1,80	n.s.	1,4±0,49	n.s.
	Eap	1,3±0,20	n.s.	0,8±0,97	n.s.	1,2±0,31	n.s.
	Efb	2,9±1,68	n.s.	2,6±1,63	n.s.	1,6±0,52	n.s.
	EsxA	2,6±1,73	n.s.	1,6±1,00	n.s.	2,6±0,35	n.s.
	EsxB	2,8±0,28	n.s.	1,6±0,19	n.s.	1,9±0,21	n.s.

a. Когорты мышей C57BL/6J инокулировали интраназально с помощью 10^8 КОЕ указанных штаммов S. aureus. Через 15 дней после инокуляции животным пускали кровь и анализировали образцы сыворотки на гуморальные ответы на стафилококковые антигены.

b. Кратные изменения вычисляли, разделяя средние интенсивности сигнала группы инокулированных мышей на средние интенсивности сигнала группы наивных мышей. Данные представлены как средние значения±стандартное отклонение.

c. Значения p вычисляли с использованием двухстороннего ANOVA с критерием Тьюки. n.s.=не значимо

3. S. aureus WU1 необходим стафилококковый белок A для персистентной колонизации.

Аналогично S. aureus Newman SpA, продукт гена spa S. aureus WU1 состоит из пяти IgBD и несет одну замену аминокислоты в домене из 278 остатков. Эксперименты по иммуноблоттингу показали, что штаммы S. aureus Newman и WU1 продуцировали схожие количества SpA (фиг. 3A). Используя аллельную рекомбинацию, авторы настоящего изобретения получали мутанта Δspa S. aureus WU1. Как измеряли посредством иммуноблоттинга, продукция SpA у мутанта Δspa прекращалась, и этот дефект восстанавливали с помощью экспрессии с использованием плазмиды spa дикого типа (pSpA) (фиг. 3A). Иммуноблоттинг с использованием антител против сортазы A (SrtA) использовали в качестве контроля на-

грузки (фиг. 3A). При инокуляции мышей в правую ноздрю и анализа колонизации с помощью мазка из глотки в день 7 мутант Δspa исходно колонизировал животных C57BL/6J аналогично штамму WU1 дикого типа (фиг. 3B). Однако в более поздние моменты времени, в частности в день 35 и 42, мутант Δspa колонизировал меньше животных, чем штамм WU1 дикого типа (фиг. 3B). Во время бактериального роста S. aureus высвобождает SpA, связанный с пептидогликановыми фрагментами, в окружающую среду (46). В модели внутривенной стимуляции S. aureus на мышах высвобожденный SpA активирует пролиферацию B-клеток и повышает секрецию VH3-идиотипических молекул IgM и IgG (33). Однако подвергнутый экспансии VH3-идиотипический IgG не распознает стафилококковые антигены (33). Молекулярной основой этой B-клеточной суперантигенной активности является SpA-опосредованная перекрестная сшивка VH3-идиотипических B-клеточных рецепторов, запускающая пролиферацию B-клеток в зависимости от $CD4^+$ T-хелперов и киназы RIPK2 (33, 47). У животных, инфицированных мутантными стафилококками Δspa, отсутствует экспансия VH3-идиотипических иммуноглобулинов, и у них наблюдают повышенное количество патоген-специфических IgG, таким образом, запускающих иммунные ответы, являющиеся протективными против последующей инфекции S. aureus (48). Затем анализировали, ассоциирована ли колонизация мутантом Δspa WU1 с измененными сывороточными IgG-ответами. Сыворотки животных, колонизированных в течение 15 дней, анализировали на связывание IgG с компонентами антигенного матрикса S. aureus (табл. 2). Этот эксперимент показал повышение антител против ClfB, IsdA и SasG у животных, которые затем подвергались деколонизации, но не у животных, оставшихся колонизированными мутантом Δspa (табл. 2). В совокупности, эти данные позволяют предполагать, что носоглоточная колонизация мышей C57BL/6 стафилококками-мутантами Δspa ассоциирована с повышенными IgG-ответами против ключевых детерминант колонизации, по-видимому, способствующими удалению мутанта Δspa S. aureus из носоглотки.

4. Белок A-нейтрализующие антитела влияют на персистентную колонизацию S. aureus.

Иммунизация мышей белком A дикого типа не приводит к образованию антител IgG сыворотки, связывающихся и нейтрализующих способность пяти IgBD связываться с доменом Fcγ молекул IgG или вариантом тяжелой цепи VH3-идиотипического иммуноглобулина (44). SpA_{KKAA} является вариантом с 20 заменами аминокислот на всем протяжении пяти IgBD SpA, устраняющими связывание Fcγ, а также снижающими связывание с VH3-идиотипическим иммуноглобулином (44). Несмотря на это, SpA_{KKAA} сохраняет общее содержание α-спиралей и антигенную структуру белка A. В результате иммунизация мышей адъювантным SpA_{KKAA} приводит к высокому титру белок A-нейтрализующих IgG (44). Эти антитела блокируют анти-опсоническую и B-клеточную суперантигенную активности белка A во время инфекции S. aureus, усиливая IgG-ответы против стафилококковых антигенов и способствуя развитию протективного иммунитета (44). Для тестирования того, влияют ли белок A-нейтрализующие антитела на колонизацию S. aureus, мышей C57BL/6 иммунизировали адъювантным SpA_{KKAA} или адъювантом в отдельности. По сравнению с ложноиммунизированными животными, животные, которым вводили $SpA_{KKAA,}$ имели высокий титр белок A-нейтрализующих антител (табл. 3). При инокуляции с помощью S. aureus WU1, ложноиммунизированные и иммунизированные SpA_{KKAA} животные сначала колонизировались аналогичным образом, т.к. в мазках из носоглотки выявляли средние нагрузки колонизации, не отличающиеся значимо в дни 7 и 14 после инокуляции (фиг. 4). Однако, начиная со дня 21, иммунизированные SpA_{KKAA} мыши чаще подвергались деколонизации, чем ложноиммунизированные животные (фиг. 4). При анализе на сывороточные IgG-ответы и сравнении с наивными мышами, колонизация S. aureus WU1 у ложноиммунизированных животных приводила к гуморальным ответам против ClfB, IsdA, IsdB, SasD и SasF (табл. 3). У животных, сохраняющих колонизацию S. aureus WU1, иммунизация SpA_{KKAA} приводила к гуморальным ответам против ClfA, Coa, vWBP и Hla (табл. 3). По сравнению с вакцинированными SpA_{KKAA} мышами C57BL/6J, у животных, которые затем подвергались деколонизации, наблюдали повышенные IgG в сыворотке против ClfA, ClfB, фибронектин-связывающих белков A (FnBPA) и B (FnBPB), IsdB, Coa и SasG (табл. 3). В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что вакцинация SpA_{KKAA} приводит к повышенным сывороточным IgG-ответам у мышей, колонизированных S. aureus. Кроме того, вакцина SpA_{KKAA} индуцировала антитела против многих разных стафилококковых антигенов, включая известные факторы колонизации (ClfB, IsdA и SasG). В целом, эти индуцируемые вакциной SpA_{KKAA} IgG-ответы против колонизирующих стафилококков, по-видимому, способствуют деколонизации носоглотки.

Таблица 3

Влияние иммунизации SpA_{KKAA} на сывороточные IgG-ответы у колонизированных S. aureus WU1 мышей C57BL/6

		Иммунизированные SpA_{KKAA} (колонизированные)		**Иммунизированные SpA_{KKAA} (очищенные)**		**Ложноиммунизированные PBS (колонизированные)**	
	Антигены	**Кратное изменение**[b]	**Значение p**[d] **(относительно ложной иммунизации PBS)**	**Кратное изменение**[b]	**Значение p**[d] **(относительно иммунизированных SpA_{KKAA}, колонизированные)**	**Кратное изменение**[c]	**Значение p**[d] **(относительно наивных)**
Заякоренный в клеточной стенке поверхностный белок	**SpA_{KKAA}**	121,3±64,98	<0,0001	126,3±13,35	<0,0001	0,9±0,16	n.s.
	ClfA	3,8±0,49	<0,0001	5,7±2,28	0,0069	1,3±0,65	n.s.
	ClfB	1,1±0,28	n.s.	14,8±1,12	<0,0001	4,3±1,49	<0,0001
	Ebh	1,0±0,15	n.s.	1,3±0,57	n.s.	1,3±0,43	n.s.
	FnbpA	1,1±0,34	n.s.	6,4±1,86	<0,0001	1,1±0,29	n.s.
	FnbpB	1,5±0,33	n.s.	10,6±1,0	<0,0001	1,2±0,72	n.s.
	IsdA	1,8±0,46	n.s.	2,8±0,59	n.s.	2,0±0,43	n.s.
	IsdB	1,7±0,37	n.s.	5,8±2,75	<0,0001	2,1±0,96	n.s.
	SdrC	1,4±0,67	n.s.	1,5±0,61	n.s.	1,2±0,45	n.s.
	SdrD	1,1±0,39	n.s.	1,5±0,36	n.s.	1,2±0,23	n.s.
	SdrE	1,2±0,36	n.s.	1,8±0,94	n.s.	1,2±0,22	n.s.
	SasA	1,8±0,36	n.s.	1,6±0,28	n.s.	0,8±0,80	n.s.
	SasB	1,9±0,90	n.s.	1,1±0,42	n.s.	1,0±0,24	n.s.
	SasD	1,3±0,46	n.s.	1,0±0,44	n.s.	2,4±0,53	0,0023
	SasF	2,4±0,34	n.s.	1,7±0,55	n.s.	2,6±1,59	0,004
	SasG	0,9±0,15	n.s.	5,5±1,04	<0,0001	1,1±0,32	n.s.
	SasI	2,1±0,46	n.s.	1,8±0,02	n.s.	1,3±0,22	n.s.

	SasK	2,3±0,62	n.s.	2,7±0,38	n.s.	1,1±0,02	n.s.
Секретируемый белок	**Coa**	3,0±1,31	0,0049	5,8±0,87	<0,0001	1,2±0,43	n.s.
	vWbp	5,7±1,34	<0,0001	6,6±2,82	n.s.	1,4±0,65	n.s.
	Hla	2,9±0,08	0,0070	3,6±0,36	n.s.	1,1±0,58	n.s.
	SCIN	2,1±0,77	n.s.	1,4±0,21	n.s.	1,0±0,37	n.s.
	Eap	1,7±0,38	n.s.	1,1±0,22	n.s.	0,9±0,23	n.s.
	Efb	1,5±0,47	n.s.	1,49±0,25	n.s.	0,98±0,27	n.s.
	EsxA	2,4±0,65	n.s.	3,22±1,81	n.s.	0,82±0,26	n.s.
	EsxB	2,5±0,35	n.s.	3,75±1,08	n.s.	1,46±0,25	n.s.

a. Когорты мышей C57BL/6J иммунизировали с помощью 50 мкг рекомбинантного SpA_{KKAA}, эмульгированного с CFA, или PBS-имитации в CFA и в день 11 подвергали бустерной иммунизации с помощью 50 мкг рекомбинантного SpA_{KKAA}, эмульгированного с IFA, или PBS-имитации а IFA. В день 24 мышей инокулировали интраназально с помощью 10^8 КОЕ указанных штаммов S. aureus и еженедельно получали мазок из горла для подсчета бактериальной нагрузки. Через 15 дней после инокуляции животным пускали кровь и анализировали образцы сыворотки на гуморальные ответы на стафилококковые антигены.

b. Кратные изменения вычисляли, разделяя средние интенсивности сигналов SpA_{KKAA}-иммунизированной группы на средние интенсивности сигналов ложноиммунизированной PBS группы. Данные представлены как средние значения±стандартное отклонение.

Колонизация S. aureus WU1 мышей BALB/c. Для тестирования того, ограничена ли колонизация S. aureus WU1 мышами C57BL/6, авторы настоящего изобретения инокулировали когорты (n=20) наивных мышей BALB/c с помощью 1×10^8 КОЕ S. aureus WU1 в правую ноздрю и измеряли носоглоточную колонизацию с использованием культур мазков. Аналогично мышам C57BL/6, S.aureus WU1 персистентно колонизировали мышей BALB/c (фиг. 5). Иммунизация мышей BALB/c с использованием SpA_{KKAA} не влияла на исходную колонизацию S. aureus WU1. Однако, по сравнению с ложноиммунизированными животными, вакцинация SpA_{KKAA} способствовала деколонизации мышей BALB/c (фиг. 5).

5. Вакцина SpA_{KKAA} влияет на колонизацию мышей S. aureus JSNZ.

Затем анализировали, влияют ли белок А-нейтрализующие антитела также на колонизацию мыши S. aureus JSNZ. В отличие от штаммов Newman и WU1, продукт гена spa S. aureus JSNZ содержит только четыре IgBD (37). В более ранней работе показано, что варианты SpA с четырьмя IgBD ассоциированы со сниженной В-клеточной суперантигенной активностью по сравнению с пятью IgBD, как правило, ассоциированными с колонизацией S. aureus носоглотки человека (33). При инокуляции в правую ноздрю анестезированных мышей S. aureus JSNZ эффективно колонизировал носоглотку мышей BALB/c за 42 дня (фиг. 6). Вакцинация SpA_{KKAA} не влияла на исходную колонизацию S. aureus JSNZ. Однако, по сравнению с ложноиммунизированными мышами, мыши BALB/c с нейтрализующими белок А антителами в сыворотке чаще подвергаются деколонизации S. aureus JSNZ, начиная со дня 21 (фиг. 6). В совокупности, эти данные позволяют предполагать, что S. aureus JSNZ также необходима белок А-опосредованная В-клеточная суперантигенная активность для персистентной колонизации мышей.

В. Материалы и способы.

1. Среды и условия бактериального роста.

Штаммы S. aureus выращивали в триптическом соевом бульоне (TSB) или на триптическом соевом агаре (TSA) при 37°C. Для экспериментов, в которых исследовали колонизацию носоглотки мышей, образцы мазков из глотки выращивали агаре Берда-Паркера при 37°C, как указано. Для экспериментов, в которых исследовали колонизацию ЖКТ S. aureus, образцы кала выращивали на маннитно-солевом агаре при 37°C, как указано. Штаммы Escherichia coli DH5α и BL21 (DE3) выращивали в среде или агаре Лу-

риа (LB) при 37°C. Для селекции плазмиды использовали ампициллин (100 мкг/мл для E. coli) и хлорамфеникол (10 мкг/мл для S. aureus).

2. Генотипирование S. aureus.

Изолят S. aureus WU1 получали из носоглотки и очагов абсцессов препуциальной железы мышей в виварии авторов настоящего изобретения. Штамм S. aureus JSNZ мыши был предоставлен Dr. Siouxsie Wiles (36). Стафилококковую геномную ДНК выделяли с использованием набора для очистки геномной ДНК Wizard (Promega). Генотипирование Spa и типирование мультилокусной последовательности (MLST) осуществляли, как описано ранее (85). В кратком изложении, для типирования spa геномную ДНК штамма S. aureus WU1 подвергали ПЦР-амплификации с помощью праймеров 1095F (5'AGACGATCCTTCGGTGAGC3') и 1517R (5'GCTTTTGCAATGTCATTTACTG3') (86). Продукт ПЦР очищали с помощью набора Nucleospin Gel and PCR Clean-up kit, секвенировали с помощью праймеров 1095F и 1517R и анализировали с использованием программного обеспечения Ridom. Для типирования MLST геномную ДНК штамма S. aureus WU1 подвергали ПЦР-амплификации с использованием праймеров arc-up (5'TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC3'), arc-dn (5'AGGTATCTGCTTCAATCAGCG3'), aro-up (5'ATCGGAAATCCTATTTCACATTC3'), arc-dn (5'GGTGTTGTATTAATAACGATATC3'), glp-up (5'CTAGGAACTGCAATCTTAATCC3'), glp-dn (5'TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC3'), gmk-up (5'ATCGTTTTATCGGGACCATC3'), gmk-dn (5'TCATTAACTACAACGTAATCGTA3'), pta-up (5'GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG3'), pta-dn (5'GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA3'), tpi-up (5'TCGTTCATTCTGAACGTCGTGA3'), tpi-dn (5'TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC3'), yqi-up (5'CAGCATACAGGACACCTATTGGC3') и yqi-dn (5'CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC3') (см., например, saureus.mlst.net/misc/info.asp). Продукт ПЦР очищали с использованием набора Nucleospin Gel and PCR Clean-up kit, подвергали ПЦР-амплификации, секвенировали и анализировали с помощью онлайн программного обеспечения (см., например: saures.mlst.net/). Файлы полногеномных последовательностей для штамма S. aureus JSNZ были предоставлены Dr. Silva Holtfreter. Получив библиотеку Truseq DNA-seq, осуществляли секвенирование Illumina MiSeq с использованием геномной ДНК S. aureus WU1 в Environmental Sample Preparation and Sequencing Facility в Argonne National Laboratory. Последовательность анализировали с использованием программного обеспечения Geneious.

3. Мутанты S. aureus.

Аллельную рекомбинацию с плазмидой pKOR1 использовали для делеции гена spa S. aureus WU1 (87). Для конструирования мутанта Δspa два фрагмента ДНК по 1 т.п.н. выше и ниже гена spa амплифицировали с хромосомы S. aureus WU1 с использованием праймеров ext1F (5′ GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATTTAAGAAGATTGTTTCAGATTTATG 3'), ext1R (5′ ATTTGTAAAGTCATCATAATATAACGAATTATGTATTGCAATACTAAAATC 3'), ext2F (5′ CGTCGCGAACTATAATAAAAACAAACAATACACAACGATAGATATC 3') и ext2R (5′ GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCAACGAACGCCTAAAGAAATTGTCTTTGC 3'). Две фланкирующие области подвергали слиянию при последующей ПЦР и клонировали конечный продукт ПЦР в pKOR1 с использованием набора BP Clonase II (Invitrogen). Полученную плазмиду последовательно переносили в E. coli DH5α, штамм S. aureus RN4220 и, наконец, штамм S. aureus WU1 и переключали температуру на 40°C, блокируя репликацию плазмид и способствуя их инсерции в хромосому (87). Выращивание при 30°C использовали для стимуляции аллельного замещения. Мутации в генах spa проверяли посредством секвенирования ДНК продуктов ПЦР-амплификации.

4. Анализ агглютинации.

Анализы агглютинации осуществляли, как описано ранее (88). В кратком изложении, ночные культуры штаммов S. aureus разводили 1:100 в свежем TSB и выращивали при 37°C в течение 6 часов. Бактерии из культуры 1 мл (нормализованы по OD_{600} 4,0) инкубировали с SYTO 9 (1:500) (Invitrogen) в течение 15 мин, дважды промывали 1 мл PBS и суспендировали в 1 мл PBS. Бактерии смешивали 1:1 с обработанной цитратом плазмой человека или плазмой мыши на предметных стеклах и инкубировали в течение 30 мин. Образцы осматривали и получали изображения с помощью микроскопа с использованием флуоресценции полного внутреннего отражения IX81 для анализа живых клеток с использованием 20-кратного объектива (Olympus). Получали по меньшей мере 10 изображений для каждого образца. Области комплексов агглютинации на каждом изображении измеряли и количественно анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ.

5. Иммуноблоттинг.

Ночные культуры штаммов S. aureus разводили 1:100 в свежем TSB (с хлорамфениколом в присутствии плазмид) и выращивали при 37°C до OD_{600} 0,5-1,0. Клетки из 1 мл культуры центрифугировали, суспендировали в PBS и инкубировали с 20 мкг/мл лизостафина (AMBI) при 37°C в течение 1 ч. Белки в лизате цельных клеток осаждали с помощью 10% трихлоруксусной кислоты и 10 мкг дезоксихолевой кислоты, промывали ледяным ацетоном, сушили на воздухе, суспендировали в 100 мкл 0,5 М Трис-HCl (pH 6,8) и 100 мкл буфера для образцов для электрофореза в ПААГ с SDS [100 мМ Трис-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 0,2% бромфенолового синего, 200 мМ дитиотреитола] и кипятили в течение 10 мин. Белки разделяли на 12% ПААГ с SDS и подвергали электроблоттингу на мембрану PVDF. Мембраны PVDF блокиро-

вали 5% молоком в Трис-забуференном физиологическом растворе с Tween-20 (TBST) [20 мМ Трис-HCl (pH 7,6), 137 мМ NaCl, 0,1% Tween-20]. Для детекции ClfA использовали моноклональное антитело мыши против ClfA 2A12.12 (разведение 1:1000) и конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) IgG против мыши (Cell Signaling, разведение 1:10000). Для детекции Coa использовали поликлональное антитело кролика против Coa (разведение 1:1000) и HRP-конъюгированный IgG против кролика (разведение 1:10000). Для детекции vWbp использовали два разных поликлональных антитела кролика против vWbp (разведение 1:1000), распознающие полноразмерный vWbp из S. aureus Newman или C-концевой домен vWbp, соответственно, и HRP-конъюгированный IgG против кролика (разведение 1:10000). Для детекции SpA использовали HRP-конъюгированный IgM человека в TBST (разведение 1:10000). Для детекции SrtA использовали поликлональные антитела кролика против SrtA (разведение 1:10000) и HRP-конъюгированный IgG против кролика (разведение 1:10000). Окрашенные с помощью антител мембраны промывали TBST и инкубировали с хемилюминесцентным субстратом SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) и проявляли на высокоэффективных хемилюминесцентных пленках Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

6. Очистка рекомбинантных белков.

E. coli BL21(DE3), несущие плазмиды pET15b+ для экспрессии His-меченого SpA_{KKAA}, а также 24 стафилококковых антигенов (ClfA, ClfB, FnBPA, FnBPB, IsdA, IsdB, SasA, SasB, SasD, SasF, SasG, SasI, SasK, SdrC, SdrD, SdrE, EsxA, EsxB, SCIN, Eap, Efb, Hla, Coa, vWbp и Ebh), выращивали в течение ночи, разводили 1:100 в свежей среде и выращивали при 37°C до ~OD_{600} 0,5. Культуры индуцировали с помощью 1 мМ изопропил-β-d-тиогалактопиранозида и выращивали еще в течение 3 ч. Клетки осаждали, ресуспендировали в колоночном буфере (50 мМ Трис-HCl [pH 7,5], 150 мМ NaCl) и разрушали с помощью пресса Френча при 14000 фунтов/дюйм^2. Лизаты очищали от мембран и нерастворимых компонентов посредством ультрацентрифугирования при 40000×g. Очищенные лизаты подвергали Ni-NTA-аффинной хроматографии и белки элюировали в колоночный буфер, содержащий последовательно повышающиеся концентрации имидазола (от 100 до 500 мМ). Элюаты подвергали диализу PBS, и чистоту белка проверяли с помощью окрашивания кумасси ПААГ с SDS. Концентрации белка определяли с помощью анализа с бицинхониновой кислотой (Thermo Scientific).

7. Колонизация носоглотки мыши.

Ночные культуры штаммов S. aureus WU1 и его мутанта Δspa разводили 1:100 в свежем TSB и выращивали в течение 2 ч. при 37°C. Клетки центрифугировали, промывали и суспендировали в PBS. Самок мышей BALB/c, C57BL/6J или B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J возрастом семь недель (The Jackson Laboratory) анестезировали посредством интраперитонеальной инъекции 100 мг/мл кетамина и 20 мг/мл ксилазина на килограмм массы тела. 1×10^8 КОЕ S. aureus (в объеме 10 мкл) переносили пипеткой в правую ноздрю каждой мыши. В день 7, 14, 21, 28, 35 и 42 после инокуляции получали мазок из ротоглотки мышей, образцы мазков распределяли по агару Берда-Паркера и инкубировали для подсчета бактерий. В день 15 после инокуляции мышам пускали кровь посредством пункции периорбитальной вены для получения сывороток для анализов гуморальных ответов с использованием стафилококкового антигенного матрикса. В день 42 после инокуляции собирали образцы кала и гомогенизировали в PBS. Гомогенаты высевали на маннитно-солевой агар и инкубировали для подсчета бактерий. Все эксперименты на мышах осуществляли в соответствии с правилами, принятыми в учреждении, следуя экспериментальному протоколу и одобрению Институционального комитета по биологической безопасности (IBC) и Институционального комитета по содержанию и использованию животных (IACUC) в University of Chicago. Эксперименты на животных повторяли по меньшей мере однократно для обеспечения воспроизводимости данных.

8. Активная иммунизация.

Мышей возрастом четыре недели иммунизировали посредством подкожной инъекции 50 мкг $SpA_{KKAA,}$ эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда (CFA; Difco), и подвергали бустерной иммунизации с помощью 50 мкг того же антигена, эмульгированного в неполном адъюванте Фрейнда (IFA), через 11 дней после начальной иммунизации. В день 21 иммунизированным мышам пускали кровь посредством пункции периорбитальной вены для получения сывороток для ELISA. В день 24 мышам интраназально инокулировали 1×10^8 КОЕ штаммов S. aureus WU1 или JSNZ и осуществляли мониторинг колонизации носоглотки.

9. Стафилококковый антигенный матрикс.

Нитроцеллюлозные мембраны подвергали блоттингу с 2 мкг аффинно очищенных стафилококковых антигенов. Мембраны блокировали 5% дегранулированного молока, инкубировали с разведенными сыворотками мыши (разведение 1:10000) и IRDye 680-конъюгированным IgG козы против мыши (LI-COR). Интенсивности сигналов количественно анализировали с использованием инфракрасной системы визуализации Odyssey (LI-COR).

10. Статистический анализ.

Для анализа статистической значимости данных о колонизации носоглотки, ELISA и антигенном матриксе осуществляли двухсторонний ANOVA с поправкой Шидака на множественность сравнений (программное обеспечение GraphPad).

Пример 2. Варианты стафилококкового белка А.

Следующие анализы можно использовать для оценки вариантов SpA, представленных в настоящем описании, на их эффективность в способах и композициях по изобретению.

А. Анализы.

Вакцинная защита в абсцессе мыши, летальная инфекция у мышей и модели пневмонии на мышах. Получали три модели на животных для исследования инфекционного заболевания S. aureus. Эти модели можно использовать для исследования уровня протективного иммунитета, обеспечиваемого посредством образования белок А-специфических антител.

Абсцесс у мыши - мышей BALB/c (самки возрастом 24 дней, 8-10 мышей на группу, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) можно иммунизировать посредством внутримышечной инъекции очищенного белка в заднюю конечность (Chang et al., 2003; Schneewind et al., 1992). Очищенный SpA и/или вариант SpA можно вводить в дни 0 (эмульгированный 1:1 с полным адъювантом Фрейнда) и 11 (эмульгированный 1:1 с неполным адъювантом Фрейнда). Образцы крови можно получать посредством ретроорбитального забора в дни 0, 11 и 20. Сыворотки можно исследовать посредством ELISA на титры IgG на предмет специфической связывающей активности варианта. Иммунизированным животным можно проводить провокационную пробу в день 21 посредством ретроорбитальной инъекции 100 мкл суспензии S. aureus Newman или S. aureus USA300 (1×10^7 КОЕ). Для этого ночные культуры S. aureus Newman можно разводить 1:100 в свежем триптическом соевом бульоне и выращивать в течение 3 ч. при 37°C. Стафилококки можно центрифугировать, промывать дважды и разводить в PBS для достижения A_{600} 0,4 (1×10^8 КОЕ на мл). Разведения можно проверять экспериментально посредством высевания на агар и образования колоний. Мышей можно анестезировать посредством интраперитонеальной инъекции 80-120 мг кетамина и 3-6 мг ксилазина на килограмм массы тела и инфицировать посредством ретроорбитальной инъекции. В день 5 или 15 после провокационной пробы мышей можно умерщвлять посредством ингаляции сжатого CO_2. Почки можно удалять и гомогенизировать в 1% Triton X-100. Аликвоты можно разводить и высевать на агаровую среду для определения КОЕ в трех параллелях. Для гистологического анализа ткань почек можно инкубировать при комнатной температуре в 10% формалине в течение 24 ч. Ткани можно заключать в парафин, получать тонкие срезы, окрашивать гематоксилином-эозином и анализировать посредством микроскопии.

Летальная инфекция мышей - мышей BALB/c (самок возрастом 24 дня, 8-10 мышей на группу, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) можно иммунизировать посредством внутримышечной инъекции очищенного SpA или варианта SpA в заднюю конечность. Вакцину можно вводить в дни 0 (эмульгированный 1:1 с полным адъювантом Фрейнда) и 11 (эмульгированный 1:1 с неполным адъювантом Фрейнда). Образцы крови можно получать посредством ретроорбитального забора в дни 0, 11 и 20. Сыворотки исследуют посредством ELISA на титры IgG на предмет специфической связывающей активности варианта. Иммунизированным животным можно проводить провокационную пробу в день 21 посредством ретроорбитальной инъекции 100 мкл суспензии S. aureus Newman или S. aureus USA300 (15×10^7 КОЕ). Для этого ночные культуры S. aureus Newman можно разводить 1:100 в свежем триптическом соевом бульоне и выращивать в течение 3 ч. при 37°C. Стафилококки можно центрифугировать, промывать дважды, разводить PBS для достижения A_{600} 0,4 (1×10^8КОЕ на мл) и концентрировать. Разведения можно проверять экспериментально посредством высевания на агар и образования колоний. Мышей можно анестезировать посредством интраперитонеальной инъекции 80-120 мг кетамина и 3-6 мг ксилазина на килограмм массы тела. Иммунизированным животным можно проводить провокационную пробу в день 21 посредством интраперитонеальной инъекции 2×10^{10} КОЕ S. aureus Newman или $3\text{-}10\times10^9$ КОЕ клинических изолятов S. aureus. Животных можно подвергать мониторингу в течение 14 дней и регистрировать летальное заболевание.

Модель пневмонии на мышах - штаммы S. aureus Newman или USA300 (LAC) можно выращивать при 37°C в триптическом соевом бульоне/ангаре до OD_{660} 0,5. Аликвоты культур 50 мл можно центрифугировать, промывать PBS и суспендировать в 750 мкл PBS для исследований смертности ($3\text{-}4\times10^8$ КОЕ на объем 30 мкл) или 1,250 мкл PBS (2×10^8 КОЕ на объем 30 мкл) для экспериментов по бактериальной нагрузке и гистологическому анализу. В случае инфекции легких мышей 7 C57BL/6J возрастом 7 недель (The Jackson Laboratory) можно анестезировать перед инокуляцией 30 мкл суспензии S. aureus в левую ноздрю. Животных можно помещать в клетку в положении лежа на спине для восстановления и наблюдать в течение 14 дней. Для активной иммунизации мышам возрастом 4 недель можно вводить 20 мкг варианта SpA в CFA в день 0 i.m. путем с последующим бустерным введением 20 мкг варианта в неполном адъюванте Фрейнда (IFA) в день 10. Животным можно проводить провокационную пробу S. aureus в день 21. Сыворотки можно собирать перед иммунизацией и в день 20 для оценки продукции специфических антител. Для исследований пассивной иммунизации мышам возрастом 7 недель можно вводить 100 мкл NRS (нормальной сыворотки кролика) или SpA-вариант-специфических антисывороток кролика посредством i.p. инъекции за 24 ч. до провокационной пробы. Для оценки патологических коррелятов пневмонии инфицированных животных можно умерщвлять с помощью форсированной ингаляции CO_2 перед удалением обоих легких. Правое легкое можно гомогенизировать для подсчета бактериальной на-

грузки легких. Левое легкое можно помещать в 1% формалин и погружать в парафин, получать тонкие срезы, окрашивать гематоксилином-эозином и анализировать посредством микроскопии.

Антитела кролика - Очищенный вариант SpA можно использовать в качестве иммуногена для получения антисывороток кролика. Белок можно эмульгировать с CFA для инъекции в день 0 с последующими бустерными инъекциями белка, эмульгированного с IFA, в дни 21 и 42. Титры антител кролика можно определять посредством ELISA. Очищенный антитела можно получать посредством аффинной хроматографии сыворотки кролика на сефарозе с вариантом SpA. Концентрацию элюируемых антител можно измерять по поглощению при A_{280} и титры специфических антител можно определять посредством ELISA.

Активная иммунизация вариантами SpA. Для определения эффективности вакцины животных можно активно иммунизировать очищенным вариантом SpA. В качестве контроля, животных можно иммунизировать адъювантом в отдельности. Титры антител против препаратов белка A можно определять с использованием варианта SpA в качестве антигенов. Используя описанные выше модели инфекционных заболеваний, можно измерять любое снижение бактериальной нагрузки (абсцесс и пневмония у мышей), гистопатологические показатели стафилококкового заболевания (абсцесс и пневмония у мышей) и защиту от летального заболевания (летальное инфицирование и пневмония у мышей).

Пассивная иммунизация аффинно очищенными поликлональными антителами кролика, полученными против вариантов SpA. Для определения протективного иммунитета белок A-специфических антител кролика мышей пассивно иммунизировали очищенными, полученными с помощью варианта SpA антителами кролика. Оба из этих препаратов антител очищают посредством аффинной хроматографии с использованием иммобилизованного варианта SpA. В качестве контроля, животных пассивно иммунизируют антителами rV10 (протективный антиген чумы, не влияющий на исход стафилококковых инфекций). Титры антител против всех препаратов белка A определяют с использованием варианта SpA в качестве антигена. Используя описанные выше модели инфекционных заболеваний, можно измерять снижение бактериальной нагрузки (абсцесс и пневмония у мышей), гистопатологические показатели стафилококкового заболевания (абсцесс и пневмония у мышей) и защиту от летального заболевания (летальное инфицирование и пневмония у мышей).

Бактериальные штаммы и выращивание. Штаммы Staphylococcus aureus Newman и USA300 можно выращивать в триптическом соевом бульоне (TSB) при 37°C. Escherichia coli штаммы DH5α и BL21 (DE3) можно выращивать в бульоне Луриа-Бертани (LB) с 100 мкг $мл^{-1}$ ампициллина при 37°C.

Антитела кролика. Варианты SpA можно получать стандартными рекомбинантными способами или способами синтеза, и очищенный антиген можно ковалентно связывать с HiTrap NHS-активированными колонками HP (GE Healthcare). Антигенный матрикс можно использовать для аффинной хроматографии 10-20 мл сыворотки кролика при 4°C. Заряженный матрикс можно промывать 50 объемами колонки PBS, элюировать антитела элюирующим буфером (1 M глицин, pH 2,5, 0,5 M NaCl) и незамедлительно нейтрализовать с помощью 1 M Трис-HCl, pH 8,5. Очищенные антитела можно подвергать диализу в течение ночи против PBS при 4°C.

$F(ab)_2$-фрагменты. Аффинно очищенные антитела можно смешивать с 3 мг пепсина при 37°C в течение 30 мин. Реакцию можно тушить с помощью 1 M Трис-HCl, pH 8,5, и $F(ab)_2$-фрагменты можно аффинно очищать с использованием конъюгированных со специфическим антигеном, HiTrap NHS-активированных колонок HP. Очищенные антитела можно подвергать диализу в течение ночи против PBS при 4°C, нагружать на ПААГ с SDS и визуализировать посредством окрашивания кумасси синим.

Активная и пассивная иммунизация. Мышей BALB/c (возрастом 3 недели, самок, Charles River Laboratories) можно иммунизировать с помощью 50 мкг белка, эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда (Difco), посредством внутримышечной инъекции. Для бустерных иммунизаций белки можно эмульгировать в неполном адъюванте Фрейнда и инъецировать через 11 дней после начальной иммунизации. В день 20 после иммунизации 5 мышам можно пускать кровь для получения сывороток для определения титров специфических антител посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Аффинно очищенные антитела в PBS можно инъецировать в концентрации 5 мг $кг^{-1}$ массы экспериментального животного в брюшную полость мышам BALB/c (возрастом 6 недель, самки, Charles River Laboratories) за 24 часа до провокационной пробы S. aureus. Кровь животных можно собирать посредством пункции периорбитальной вены. Клетки крови можно удалять с использованием гепаринизированных капиллярных пробирок для микрогематокрита (Fisher) и можно использовать микропробирки для разделения сыворотки с Z-гелем (Sarstedt) для сбора и измерения титров антиген-специфических антител посредством ELISA.

Почечный абсцесс у мышей. Ночные культуры S. aureus Newman или USA300 (LAC) можно разводить 1:100 в свежем TSB и выращивать в течение 2 часов при 37°C. Стафилококки можно осаждать, промывать и суспендировать в PBS при OD_{600} 0,4 ($\sim 1\times10^8$ КОЕ $мл^{-1}$). Прививочный материал можно количественно анализировать посредством распределения аликвот образцов на TSA и подсчета образующихся колоний. Мышей BALB/c (возрастом 6 недель, самки, Charles River Laboratories) можно анестези-

ровать посредством интраперитонеальной инъекции 100 мг $мл^{-1}$ кетамина и 20 мг $мл^{-1}$ ксилазина на килограмм массы тела. Мышей можно инфицировать посредством ретроорбитальной инъекции 1×10^7 КОЕ S. aureus Newman или 5×10^6 КОЕ S. aureus USA300. В день 4 после провокационной пробы мышей можно умерщвлять посредством ингаляции CO_2. Можно удалять обе почки и анализировать стафилококковую нагрузку в одном органе посредством гомогенизации ткани почки с PBS, 1% Triton X-100. Серийные разведения гомогената распределяли по TSA и инкубировали для образования колоний. Оставшийся орган можно исследовать посредством гистопатологического анализа. В кратком изложении, почки можно фиксировать в 10% формалине в течение 24 часов при комнатной температуре. Ткани можно заключать в парафин, получать тонки срезы, окрашивать гематоксилином-эозином и анализировать посредством световой микроскопии для подсчета очагов абсцессов. Все эксперименты на мышах можно осуществлять в соответствии с правилами, принятыми в учреждении, следуя экспериментальному протоколу и одобрению Институционального комитета по биологической безопасности (IBC) и Институционального комитета по содержанию и использованию животных (IACUC) в University of Chicago.

Связывание белка A. В случае связывания IgG человека Ni-NTA-аффинные колонки можно предварительно нагружать 200 мкг очищенных белков (вариантов SpA) в колоночном буфере. После промывки 200 мкг IgG человека (Sigma) можно нагружать на колонку. Образцы белков можно собирать после промывок и элюций и подвергать электрофорезу в ПААГ с SDS с последующим окрашиванием кумасси синим. Очищенными белками (вариантами SpA) можно покрывать планшеты MaxiSorp ELISA (NUNC) в 0,1 М карбонатном буфере (pH 9,5) в концентрации 1 мкг $мл^{-1}$ в течение ночи при 4°C. Затем планшеты можно блокировать 5% цельного молока с последующей инкубацией с серийными разведениями пероксидаза-конъюгированного IgG человека, Fc или $F(ab)_2$-фрагментов в течение одного часа. Планшеты можно промывать и проявлять с использованием реагентов OptEIA ELISA (BD). Реакции можно тушить 1 М фосфорной кислотой и считывания A_{450} использовали для вычисления полумаксимального титра и процента связывания.

Анализы связывания фактора фон Виллебранда (vWF). Очищенными белками (вариантами SpA) можно покрывать и блокировать, как описано выше. Планшеты можно инкубировать с vWF человека в концентрации 1 мкг $мл^{-1}$ в течение двух часов, затем промывать и блокировать с помощью IgG человека еще в течение часа. После промывки планшеты можно инкубировать с серийным разведением пероксидаза-конъюгированным антителом против vWF человека в течение одного часа. Планшеты можно промывать и проявлять с использованием реагентов OptEIA ELISA (BD). Реакции можно тушить с помощью 1 М фосфорной кислоты и считывания A_{450} можно использовать для вычисления полумаксимального титра и процента связывания. Для анализов ингибирования планшеты можно инкубировать с аффинно очищенными $F(ab)_2$-фрагментами, специфическими для варианта SpA, в концентрации 10 мкг $мл^{-1}$ в течение одного часа перед анализами связывания лиганда.

Апоптоз спленоцитов. Аффинно очищенные белки (150 мкг варианта SpA) можно инъецировать в брюшную полость мышей BALB/c (возрастом 6 недель, самки, Charles River Laboratories). Через четыре часа после инъекции животных умерщвляли посредством ингаляции CO_2. Их селезенки можно удалять и гомогенизировать. Клеточный детрит можно удалять с использованием клеточного сита и суспендированные клетки можно переносить в лизирующий буфер ACK (0,15 М NH_4Cl, 10 мМ $KHCO_3$, 0,1 мМ ЭДТА) для лизиса эритроцитов. Лейкоциты можно осаждать посредством центрифугирования, суспендировать в PBS и окрашивать с использованием разведенного 1:250, R-PE-конъюгированного моноклонального антитела против CD19 (Invitrogen) на льду и в темноте в течение одного часа. Клетки можно промывать 1% FBS и фиксировать 4% формалином в течение ночи при 4°C. На следующий день клетки можно разводить PBS и анализировать посредством проточной цитометрии. Оставшийся орган можно исследовать посредством гистопатологического анализа. В кратком изложении, селезенки можно фиксировать в 10% формалине в течение 24 ч при комнатной температуре. Ткани можно заключать в парафин, получать тонкие срезы, окрашивать с использованием набора для определения апоптоза (Millipore) и исследовать посредством световой микроскопии.

Количественный анализ антител. Сыворотки можно собирать от здоровых людей-добровольцев или мышей BALB/c, инфицированных S. aureus Newman или USA300 в течение 30 дней или иммунизированных вариантом SpA, как описано выше. IgG человека/мыши (Jackson Immunology Laboratory), вариант SpA и CRM_{197} можно подвергать блоттингу на нитроцеллюлозную мембрану. Мембраны можно блокировать 5% цельного молока с последующей инкубацией с сыворотками человека или мыши. Конъюгированные с IRDye 700DX, аффинно очищенные IgG против человека/мыши (Rockland) можно использовать для количественного анализа интенсивности сигналов с использованием инфракрасной системы визуализации Odyssey™ (Li-cor). Эксперименты с кровью людей-добровольцев включали протоколы, рассмотренные, одобренные и осуществленные под надзором Экспертного совета (IRB) The University of Chicago.

Статистический анализ. Для анализа статистической значимости данных о почечном абсцессе, ELISA и B-клеточных суперантигенах можно использовать двухсторонний t-критерий Стьюдента.

Используя эти анализы, можно тестировать варианты, представленные в настоящем описании (на-

пример, показанные на фиг. 12-15). Можно осуществлять дополнительные анализы, такие как анализ SPR для определения аффинностей связывания новых вариантов SpA с VH3-IgG человека и VH3-IgE человека по сравнению с контролями SpA, SpA/KKAA, а также SpA/KKAA/F (SpA*31). Также можно тестировать возможность производства (выход очищенных вариантов SpA*/грамм массы клеток E. coli). Можно проводить спектроскопия кругового дихроизма для тестирования содержания α-спиралей по сравнению с SpA и SpA/KKAA. Также можно определять стабильность белка во время очистки и хранения при различных температурах (4°C, 25°C и 37°C в течение 1-7 дней).

Для тестирования безопасности и эффективности лекарственного средства можно осуществлять анализ высвобождения гистамина базофилами (фиг. 16). Этот тест известен в этой области (см., например, Kowal, K. et al., 2005. Allergy and Asthma Proc. Vol. 26, No. 6). В кратком изложении, сыворотку и/или базофилы человека можно инкубировать в течение 60 мин. при 37°C. Высвобождение гистамина можно измерять в стимулированных (посредством добавления вариантов SpA) и нестимулированных клетках и результаты можно выражать как высвобождение гистамина в процентной доле общего содержания гистамина. В некоторых аспектах высвобождение гистамина >16,5% представляет собой положительный результат теста у детей и взрослых и пациентов.

Пример 3. Варианты вакцины SpA с улучшенной безопасностью.

B. Результаты.

1. Замены аминокислот в Gly^{29} в вакцинах-кандидатах SpA.

Авторы настоящего изобретения пытались экспериментально идентифицировать замены аминокислот в положении Gly^{29} SpA-IgBD, вызывающие наибольшее снижение аффинности между IgG человека и SpA_{KK}, т.е. пять IgBD (EDABC), также несущие замены аминокислот $Gln^{9,10}Lys$, нарушающие взаимодействие между SpA и Fcγ (48). С этой целью, авторы настоящего изобретения конструировали девятнадцать разных плазмид, кодирующих меченый полигистидином на N-конце $SpA_{Q9,10K/G29X}$, где X является любой из 19 природных аминокислот (за исключением глицина), обеспечиваемых генетическим кодом. Белки $SpA_{Q9,10K/G29X}$ очищали посредством аффинной хроматографии на Ni-NTA-смоле, элюировали, подвергали диализу, определяли концентрацию с помощью анализа BCA и связывали в равной концентрации (250 нМ) с чипом Bio-Rad ProteOn HTG. Каждый чип подвергали экспериментам с использованием поверхностного плазмонного резонанса с помощью серийных разведений IgG человека или контрольного PBS. Регистрировали ассоциацию IgG человека с вакцинами-кандидатами SpA, нагруженными на чип, и преобразовывали данные для получения констант ассоциации для каждого белка (табл. 4). В качестве контроля, авторы настоящего изобретения количественно анализировали константы ассоциации SpA дикого типа (K_A $1{,}081\times10^8$ M^{-1}) и SpA_{KKAA} для IgG человека (K_A $5{,}022\times10^5$ M^{-1}). В случае белков $SpA_{Q9,10K/G29X}$ четыре замены аминокислот в Gly^{29} вызывали значительное повышение константы ассоциации: $Gly^{29}Ser$ (K_A $9{,}398\times10^5$ M^{-1}), $Gly^{29}Lys$ (K_a $9{,}738\times10^5$ M^{-1}), $Gly^{29}Ile$ (K_A $10{,}070\times10^5$ M^{-1}) и $Gly^{29}Ala$ (K_A $11{,}310\times10^5$ M^{-1}), что позволяет предполагать, что эти варианты сильнее связываются с V_H3-вариантами тяжелых цепей IgG человека, чем SpA_{KKAA} (табл. 4). Результаты для $SpA_{Q9,10K/G29A}$ были неожиданными для авторов настоящего изобретения. Замена $Gly^{29}Ala$ в конструкции ZZZZ для коммерческой очистки антител (MabSelectSure™) снижает связывание с V_H3-IgG (150), в то время как $Gly^{29}Ala$ в контексте $Gln^{9,10}Lys$ в SpA-IgBD может способствовать умеренному повышению аффинности к V_H3-IgG. По сравнению с SpA_{KKAA}, десять замен аминокислот в Gly^{29} не вызывали значимых различий в константах ассоциации с: $Gly^{29}Thr$, $Gly^{29}Leu$, $Gly^{29}Glu$, $Gly^{29}Pro$, $Gly^{29}Phe$, $Gly^{29}Met$, $Gly^{29}Val$, $Gly^{29}Trp$, $Gly^{29}Asp$, $Gly^{29}Arg$, $Gly^{29}As$, и $Gly^{29}Tyr$ (табл. 4). Другие три замены аминокислот в Gly^{29} снижали константу ассоциации: $Gly^{29}His$ (K_a $1{,}435\times10^5$ M^{-1}), $Gly^{29}Cys$ (K_a $1{,}743\times10^5$ M^{-1}), и $Gly^{29}Gln$ (K_a $2{,}057\times10^5$ M^{-1}) с IgG человека по сравнению с SpA_{KKAA} (табл. 4). Таким образом, замены аминокислот в Gly^{29} не приводят к универсальному эффекту в отношении связывания SpA-IgBD с IgG человека. Некоторые замены аминокислот в Gly^{29} повышают аффинность между IgG человека и $SpA_{Q9,10K/G29X}$, в то время как другие являются нейтральными (не имеют значимого эффекта) или снижают аффинность.

2. Замены аминокислот в Ser33 вакцин-кандидатов SpA.

Для идентификации замен аминокислот в положении Ser^{33} SpA-IgBD, вызывающие наибольшее снижение аффинности между IgG человека и SpA_{KK}, авторы настоящего изобретения конструировали девятнадцать разных плазмид, кодирующих меченый полигистидином на N-конце $SpA_{Q9,10K/S33X}$, где X является любой из 19 природных аминокислот (за исключением серина), обеспечиваемых генетическим кодом. Белки $SpA_{Q9,10K/S33X}$ очищали посредством аффинной хроматографии на Ni-NTA-смоле, элюировали, подвергали диализу, определяли концентрацию с помощью анализа BCA и связывали в равной концентрации (250 нМ) с чипом Bio-Rad ProteOn HTG. Каждый чип подвергали экспериментам с использованием поверхностного плазмонного резонанса с помощью серийных разведений IgG человека или контрольного PBS. Регистрировали ассоциацию IgG человека с вакцинами-кандидатами SpA, нагруженными на чип, и преобразовывали данные для получения констант ассоциации для каждого белка (таблица 5). Две замены аминокислот в Ser^{33} вызывали повышение аффинности к IgG человека: $Ser^{33}Gly$ (K_A $11{,}180\times10^5$ M^{-1}) и $Ser^{33}Ala$ (K_A $10{,}540\times10^5$ M^{-1}), что свидетельствует о том, что эти варианты проявляют более высокую аффинность к IgG человека, чем SpA_{KKAA} (возможно, из-за повышенной аффинности к

V_H3-вариантам тяжелых цепей) (табл. 5). Четырнадцать замен аминокислот в Ser^{33} не вызывали значимых различий в константах ассоциации с: $Ser^{33}Tyr$, $Ser^{33}Leu$, $Ser^{33}Trp$, $Ser^{33}Val$, $Ser^{33}His$, $Ser^{33}Asn$, $Ser^{33}Met$, $Ser^{33}Arg$, $Ser^{33}Asp$, $Ser^{33}Phe$, $Ser^{33}Gln$, $Ser^{33}Pro$, $Ser^{33}Cys$ и $Ser^{33}Lys$ (табл. 5). Три замены аминокислот в Ser^{33} снижали аффинность к IgG человека и $SpA_{Q9,10K/S33X}$: $Ser^{33}Thr$ (K_A $0,386\times10^5$ M^{-1}), $Ser^{33}Glu$ (K_A $0,496\times10^5$ M^{-1}) и $Ser^{33}Ile$ (K_A $1,840\times10^5$ M^{-1}) (табл. 5). Таким образом, некоторые замены аминокислот в Ser^{33} повышают аффинность между IgG человека и $SpA_{Q9,10K/S33X}$, в то время как другие являются нейтральными (не имеют значимого эффекта) или снижают ассоциацию с IgG человека. Из тех, которые снижают аффинность между IgG человека, $Ser^{33}Glu$ и $Ser^{33}Thr$ демонстрируют наибольшее снижение константы ассоциации (табл. 5).

3. Комбинирование замены аминокислот в Gly29, Ser33 и Asp36,37 в вакцинах-кандидатах SpA.

По сравнению с одиночной заменой аминокислоты в Ser^{33}, вызывают ли комбинации замен аминокислот в положениях Gly^{29}, Ser^{33} или $Asp^{36,37}$ IgBD дополнительное снижение аффинности к IgG человека, или имеют ли множественные замены парадоксальные эффекты, которые также могут повышать аффинность между двумя белками? Чтобы ответить на этот вопрос, авторы настоящего изобретения сравнивали константы ассоциации трех белков с заменами аминокислот в Ser^{33}: $SpA_{Q9,10K/S33E}$ (сниженная аффинность), $SpA_{Q9,10K/S33F}$ (аффинность не затронута) и $SpA_{Q9,10K/S33Q}$ (аффинность не затронута) - с белками, несущими дополнительные замены аминокислот в Gly^{29} и/или $Asp^{36,37}$ (табл. 6). В случае $SpA_{Q9,10K/S33E}$ (K_A $0,496\times10^5$ M^{-1}) не наблюдали дополнительного эффекта при добавлении замен $Gly^{29}Ala$ (K_A $1,265\times10^5$ M^{-1}), $Gly^{29}Phe$ (K_A $1,575\times10^5$ M^{-1}), $Asp^{36,37}Ala$ (K_A $0,568\times10^5$ M^{-1}), $Gly^{29}Ala/Asp^{36,37}Ala$ (K_A $1,892\times10^5$ M^{-1}) или $Gly^{29}Arg$ (K_A $4,840\times10^5$ M^{-1}). Однако, комбинирование $Asp^{36,37}Ala$ с $Gly^{29}Phe$ (K_A $14,850\times10^5$ M^{-1}) или $Gly^{29}Arg$ (K_A $10,240\times10^5$ M^{-1}) повышало аффинность $SpA_{Q9,10K/S33E}$ к IgG человека (табл. 6). При анализе $SpA_{Q9,10K/S33F}$ (K_A $3,902\times10^5$ M^{-1}), константа ассоциации которого не отличается значимо от SpA_{KKAA}, авторы настоящего изобретения наблюдали схожие эффекты. Ни одна из замен не изменяла аффинность $SpA_{Q9,10K/S33F}$ к IgG человека, за исключением комбинации $Asp^{36,37}Ala$ с $Gly^{29}Phe$ ($SpA_{Q9,10K/S33Q/D36,37A/Gly29F}$ K_A $12,470\times10^5$ M^{-1}), повышающей аффинность родительской вакцины к IgG человека (табл. 6). Таким образом, комбинирование замен аминокислот в Gly^{29}, Ser^{33} и $Asp^{36,37}$ SpA-IgBD предсказуемо не снижало аффинность к IgG человека. В каждом случае, аффинность рекомбинантных вакцин-кандидатов SpA необходимо определить экспериментально.

SpA-KR является вариантом SpA_{KKAA} с двумя дополнительными заменами аминокислот в домене E IgBD, несущем N-концевое удлинение из шести остатков с аминокислотной последовательностью ADAQQN (Международная патентная заявка № WO 2015/144653 AI). Авторы настоящего изобретения - Fabio Bagnoli, Luigi Fiaschi и Maria Scarselli (Glaxo-SmithKline INC.) - предположили, что два остатка глутамина (QQ) в гексапептидном удлинении домена E SpA_{KKAA} может представлять собой дополнительный участок связывания для IgG человека без указания того, где эти остатки могут связываться с иммуноглобулином, т.е. Fcγ или V_H3-тяжелыми цепями, или является экспериментальным доказательством такого связывания. При анализе на аффинность к IgG человека константа ассоциации SpA-KR (K_A $5,464\times10^5$ M^{-1}) не отличалась значимо от SpA_{KKAA}, что позволяет предполагать, что SpA-KR также может проявлять перекрестно-сшивающую активность в отношении V_H3-IgG (табл. 6). SpA_{RRVV} является вариантом вакцины SpA, описанным в патентной заявке № EP3101027A1 (OLYMVAX INC.). Аналогично SpA_{KKAA}, SpA_{RRVV} несет замены аминокислот в $Gln^{9,10}$ и $Asp^{36,37}$ каждого из пяти IgBD SpA, хотя замены представляют собой замены $Gln^{9,10}$ аргинином (Arg или R) и $Asp^{36,37}$ валином (Val или V). При анализе на аффинность к IgG человека константа ассоциации SpA_{RRVV} (K_A $5,609\times10^5$ M^{-1}) была схожей с SpA_{KKAA}, что позволяет предполагать, что SpA_{RRVV} также может проявлять перекрестно-сшивающую активность в отношении V_H3-IgG (табл. 6).

4. Перекрестно-сшивающая активность вариантов вакцин SpA в отношении VH3-идиотипического IgG и Fab-фрагментов IgG человека.

Ключевой проблемой безопасности при клинической разработке вакцин SpA является отсутствие перекрестно-сшивающей активности в отношении V_H3-идиотипических IgE и IgG на поверхности базофилов и тучных клеток, которые в ином случае запускают высвобождение гистамина и анафилаксию (140, 142, 145). Для количественного анализа V_H3-перекрестно-сшивающей активности вакцин-кандидатов SpA авторы настоящего изобретения использовали очищенный IgG человека (54% V_H3-идиотипических вариантов тяжелых цепей), расщепленный папаином, и V_H3-клональные Fab-фрагменты, очищенные с использованием аффинной хроматографии на SpA_{KK} (75) (табл. 7). При исследовании с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для измерения аффинности SpA и его вариантов, IgBD белка A дикого типа (SpA) демонстрировали мощную перекрестно-сшивающую активность ($K_A$$1,44\times10^7$ M^{-1}, табл. 7). Аффинность к V_H3-Fab была снижена в случае SpA_{KKAA} (K_A $8,27\times10^4$ M^{-1}) и SpA-KR (K_A $6,42\times10^4$ M^{-1}), хотя оба варианта сохраняли значительную перекрестно-сшивающую активность по сравнению с $SpA_{Q9,10K/S33E}$ (K_A 41,24 M^{-1}) и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ (K_A 43,55 M^{-1}) (табл. 7). $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ демонстрировали связывающие свойства, схожие с контролем PBS (т.е. значениями, полученными без добавления лиганда). Таким образом, замены аминокислот $Ser^{33}Glu$ и $Ser^{33}Thr$ устраняют V_H3-IgE- и V_H3-IgG-перекрестно-сшивающие активности у вакцин-

кандидатов $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$, соответственно.

5. Fcγ-связывающая активность вариантов вакцин SpA.

Deisenhofer разрешил кристаллическую структуру домена B SpA (IgBD-B), связанного с Fcγ человека, и идентифицировал область контакта между двумя молекулами (154). Четыре водородные связи способствуют взаимодействиям между SpA (нумерация домена B, фигура 20B) и Fcγ: Gln^{9} (IgG Ser^{254}), Gln^{10} (IgG Gln^{311}), Asn^{11} (IgG Asn^{434}) и Tyr^{14} (IgG Leu^{432}) (54). Эти остатки домена B являются консервативными во всех пяти IgBD (фигура 20), что позволяет предполагать универсальный механизм связывания Fcγ (43). В более ранней работе показано, что замена $Gln^{9,10}Lys$ в IgBD-D или во всех пяти IgBD SpA снижает связывание SpA_{KK} ($SpA_{Q9,10K}$) с Fcγ IgG человека, мыши и морской свинки (76, 43). Т.к. недавно сконструированные варианты вакцины SpA, $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$, сохраняют замены аминокислот $Gln^{9,10}Lys$ в своих пяти IgBD, авторы настоящего изобретения предположили, что эти варианты также должны демонстрировать значительные дефекты связывания с Fcγ человека. Для валидации этого предположения авторы настоящего изобретения использовали очищенный IgG человека, расщепленный папаином, и очищали полученные Fcγ-фрагменты (табл. 8). При исследовании с использованием интерферометрии биослоя (BLI) для измерений аффинности SpA и его вариантов, IgBD белка A дикого типа демонстрировали высокую аффинность к Fcγ (K_A $5{,}17\times10^{7}$ M^{-1}). Fcγ-связывающая активность исчезала в случае SpA_{KKAA} (K_A 32,68 M^{-1}), SpA-KR (K_A 39,12 M^{-1}), $SpA_{Q9,10K/S33E}$ (K_A 32,68 M^{-1}) и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ (K_A 39,91 M^{-1}), соответственно. Таким образом, замены $Ser^{33}Glu$ и $Ser^{33}Thr$ не нарушают эффекты $Gln^{9,10}Lys$ в отношении связывания Fcγ в спирали 1 $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ (табл. 8).

6. Модель анафилактической активности вакцин-кандидатов SpA на мышах.

Клинические и экспериментальные исследования показали, что повышенная проницаемость сосудов является типичным признаком анафилаксии (155, 156). Активированные тучные клетки или базофилы высвобождают вазоактивные медиаторы, включая гистамин и фактор активации тромбоцитов, индуцирующие анафилактический ответ повышенной проницаемости сосудов, вызывая вазодилатацию и нарушение эндотелиального барьера (156). Эти явления можно измерять в модели анафилактической повышенной проницаемости сосудов на мышах как экстравазацию внутривенно вводимого красителя синего Эванса в экспериментальных участках (ткань уха), примированных 24 ч ранее посредством интрадермальной инъекции 2 мкг V_H3-идиотипического IgG человека (157). Затем транссудацию синего Эванса в ткань уха количественно анализируют (нг красителя/мг ткани) в когортах по пять животных, вычисляют средние значения и стандартное отклонение (SD) и анализируют данные на статистически значимые различия. Плазма мышей C57BL/6 дикого типа содержит только 5-10% иммуноглобулина с V_H3-идиотипическими вариантами тяжелых цепей (48). По этой причине мыши, в отличие от морских свинок (20-30% V_H3-идиотипических вариантов тяжелых цепей), резистентны к SpA-индуцируемому анафилактическому шоку (140). Таким образом, авторы настоящего изобретения выбирали мышей μMT для исследования; у этих животных отсутствуют функциональные B-клеточные рецепторы IgM, арест развития B-клеток на стадии пре-B-клеток, и они не могут продуцировать IgG плазмы (158). Мышей μMT использовали в качестве реципиентов для интрадермальной инъекции 2 мкг V_H3-идиотипического IgG человека в ткань уха. Через 24 ч 200 мкг SpA, варианты вакцины SpA или контрольный буфер (PBS) инъецировали мышам внутривенно. Через пять минут после введения SpA мышам внутривенно инъецировали 2% раствор синего Эванса для оценки проницаемости сосудов в тканях ушей. Через 30 мин животных умерщвляли, вырезали ткань уха, сушили и экстрагировали формамидом для спектрофотометрического количественного анализа красителя. По сравнению с контрольным PBS [34,73 (±) 8,474 нг синего Эванса/мг ткань уха], введение SpA вызывало анафилактическую повышенную проницаемость сосудов, приводя к высвобождению 124,9 нг/мг (±26,54 нг/мг) синего Эванса (PBS vs. SpA, $P<0{,}0001$) (фиг. 22). В когортах животных, которым предварительно делали интрадермальную инъекцию V_H3-IgG человека, внутривенное введение SpA_{KKAA} также вызывало повышенную проницаемость сосудов [70,31 нг/мг (±23,04 нг/мг); PBS vs. SpA_{KKAA}, $P<0{,}01$], хотя и на более низком уровне, чем SpA дикого типа (SpA vs. SpA_{KKAA}, $P<0{,}0001$) (фиг. 22). В отличие от этого, внутривенное введение 200 мкг $SpA_{Q9,10K/S33E}$ [38,57 нг/мг (±15,07 нг/мг); $SpA_{Q9,10K/S33E}$ vs. PBS, не значимо] или $SpA_{Q9,10K/S33T}$ [41,43 нг/мг (±13,15 нг/мг); $SpA_{Q9,10K/S33T}$ vs. PBS, не значимо] не вызывало повышенную проницаемость сосудов в участках, в которые вводили V_H3-идиотипический IgG человек у мышей μMT (фиг. 22). В качестве сравнения, вакцина-кандидат SpA-KR вызывала анафилактическую повышенную проницаемость сосудов, схожую с SpA_{KKAA} (фиг. 22). Таким образом, в отличие от SpA и SpA_{KKAA}, запускающих повышенную проницаемость сосудов посредством перекрестной сшивки V_H3-идиотипического IgG, связанного с активирующим FcεRI на тучных клетках и базофилах или FcγR на других эффекторных клетках, $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ не могут перекрестно сшивать V_H3-идиотипический IgG для стимуляции анафилактических реакций у мышей μMT в участках, в которые предварительно вводили V_H3-идиотипический IgG человека.

7. Вакцина-кандидат SpA, перекрестно сшивающая V_H3-IgE.

Базофилы и тучные клетки являются двумя основными типами эффекторных клеток анафилактических ответов и секретируют провоспалительные медиаторы после антиген-опосредованной перекрестной

сшивки IgE на их поверхностных рецепторах FcεRI. Штамм S. aureus Cowan I, экспрессирующий SpA в избытке, или растворимый очищенный SpA могут активировать базофилы, индуцируя высвобождение гистамина. Этот стимулирующий эффект зависит от Fab-связывающей активности белка A (145). Для исследования потенциального эффекта перекрестной сшивки вакцин-кандидатов SpA с циркулирующими IgE или IgG, связанными на поверхности базофилов, варианты вакцины, очищенные в PBS, добавляли к свежеполученной крови человека с добавленным антикоагулянтом ЭДТА на 30 мин. SpA дикого типа использовали в качестве положительного контроля. PBS использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки окрашивали с использованием антител против CD123, против CD203c, против HLA-DR (удаление дендритных клеток и моноцитов) и против CD63. Базофилы идентифицировали посредством гейтирования по $SSC^{low}CD203c^{+}/CD123^{+}/HLA\text{-}DR^{-}$ клеткам. Активацию $CD123^{+}$ базофилов выражали как долю CD63 и корректировали по отрицательному и положительному контролю. По сравнению с контрольным PBS (4,39% активированных базофилов), введение SpA или SpA_{KKAA} вызывало значимые повышения популяции $CD63^{+}$ активированных базофилов, 32,05% (PBS vs. SpA, P<0,0001) и 10,66% (PBS vs. SpA_{KKAA}, P<0,01), соответственно (табл. 9). В отличие от SpA_{KKAA}, $SpA_{Q9,10K/S33E}$ [5,38%; $SpA_{Q9,10K/S33T}$ vs. SpA_{KKAA}, P<0,05] или $SpA_{Q9,10K/S33T}$ [4,57%; $SpA_{Q9,10K/S33T}$ vs. SpA_{KKAA}, P<0,01] не могли активировать базофилы и действовали аналогично контрольному PBS (табл. 9). В этом анализе вакцины-кандидаты SpA-KR [8,15%] и SpA_{RRVV} [10,16%] демонстрировали активацию базофилов, схожую с SpA_{KKAA}. Таким образом, $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ не могут перекрестно сшивать циркулирующий IgE в крови и не могут сенсибилизировать базофилы посредством связывания высокоаффинных рецепторов FcεRI. В отличие от $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33}$, вакцины-кандидаты SpA_{KKAA}, SpA-KR и SpA_{RRVV} сохраняют значимую активность в отношении перекрестной сшивки IgE, инициирующей нежелательную анафилактическую реакцию.

Функциональный ответ тучных клеток измеряли посредством запускаемого антигеном высвобождения β-гексозаминидазы и гистамина. Для этого анализа использовали линию тучных клеток человека LAD2. Тучные клетки (2×10^5 клетки/мл) сенсибилизировали после инкубации в течение ночи с 100 нг/мл VH3 IgE перед стимуляцией вариантами вакцины SpA (10 мкг) в течение 30 мин и измеряли высвобождение β-гексозаминидазы (фиг. 23A) или гистамина (фиг. 23B). Инкубация с SpA дикого типа индуцировала приблизительно 35% высвобождения β-гексозаминидазы. Вакцины SpA_{KKAA} и SpA-KR вызывали 10,32% и 9,87% высвобождения β-гексозаминидазы, соответственно, без значимых различий (SpA-KR vs. SpA_{KKAA}, не значимо). Эти снижения являлись значимыми при сравнении с SpA дикого типа (SpA vs. SpA_{KKAA}, P<0,0001; SpA vs. SpA-KR, P<0,0001). Кроме того, вакцины SpA_{KKAA} и SpA-KR сохраняют активность высвобождения β-гексозаминидазы выше уровней отрицательного контроля (SpA_{KKAA} vs. PBS, P<0,0001; SpA-KR vs. PBS, P<0,0001) (фиг. 23A). В качестве сравнения, $SpA_{Q9,10K/S33E}$ [6,46%; $SpA_{Q9,10K/S33E}$ vs. SpA_{KKAA}, P<0,01] и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ [4,43%; $SpA_{Q9,10K/S33T}$ vs. SpA_{KKAA}, P<0,0001] вызывали значимо меньшее высвобождение β-гексозаминидазы по сравнению с SpA_{KKAA}. $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ демонстрировали высвобождение β-гексозаминидазы, схожее с контролем PBS (фиг. 23A).

Схожие результаты получали при оценке высвобождения гистамина (фиг. 23B). SpA стимулировал наибольший уровень высвобождения гистамина; вакцины SpA_{KKAA} и SpA-KR сохраняли активность высвобождения гистамина выше уровней контрольного PBS, и $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ действовали подобно PBS отрицательного контроля [SpA vs. PBS, или SpA_{KKAA}, или SpA-KR, или $SpA_{Q9,10K/S33E}$, или $SpA_{Q9,10K/S33T}$, P<0,0001; SpA_{KKAA} vs SpA-KR или $SpA_{Q9,10K/S33E}$, не значимо; SpA_{KKAA} vs. $SpA_{Q9,10K/S33T}$ или PBS, P<0,05; $SpA_{Q9,10K/S33T}$ vs. SpA-KR, P<0,01].

В заключение, $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ утратили способность активировать тучные клетки, сенсибилизированные с помощью V_H3-идиотипического IgE, и представляют собой вакцины-кандидаты с профилем безопасность, подходящим для клинического тестирования на людях.

8. Иммуногенность и эффективность вакцин-кандидатов SpA в модели колонизации S. aureus.

По сравнению с когортами мышей C57BL/6, иммунизированных адъювантом в отдельности (ложноиммунизированных), иммунизация с помощью SpA_{KKAA} или $SpA_{O9,10K/S33E}$ или $SpA_{O9.10K/S33T}$ приводила к образованию SpA-нейтрализующих антител (фиг. 25A). Как и ожидали, иммунизация SpA_{KKAA} индуцировала деколонизацию S. aureus WU1 из носоглотки и желудочно-кишечного тракта мышей C57BL/6, начиная с 21 дня после интраназальной колонизации (фиг. 24AB-C). Кроме того, у подвергнутых деколонизации мышей иммунизация SpA_{KKAA} была ассоциирована с повышенными патоген-специфическими антителами IgG (включая антитела против ClfB, против IsdA, против IsdB, против SasG), ассоциированными с деколонизацией S. aureus [(102) и данные не представлены]. Схожие результаты наблюдали после иммунизации мышей C57BL/6 с помощью $SpA_{Q9,10K/S33E}$. По сравнению с ложным контролем, вакцинация $SpA_{Q9,10K/S33E}$ способствовала деколонизации S. aureus WU1 из носоглотки и желудочно-кишечного тракта мышей C57BL/6 аналогично вакцинации SpA_{KKAA} (фиг. 24BC). У подвергнутых деколонизации мышей вакцинация $SpA_{O9,10K/S33E}$ была ассоциирована с повышенными патоген-специфическими IgG (включая антитела против ClfB, против IsdA, против IsdB, против SasG; данные не представлены). По сравнению с иммунизированными SpA_{KKAA} животными, вакцинация $SpA_{Q9,10K/S33E}$ вызывала схожие уровни деколонизации S. aureus, что позволяет предполагать, что две вакцины демонстрируют схожую протективную эф-

фективность в модели колонизации на мышах. Вакцинация $SpA_{Q9,10K/S33T}$ приводила к уровням деколонизации S. aureus, схожим с вакцинацией SpA_{KKAA} и $SpA_{Q9,10K/S33E}$ (данные не представлены). Если когорты животных иммунизировали в одни и те же дни с помощью SpA_{KKAA} или $SpA_{Q9,10K/S33E}$or $SpA_{Q9,10K/S33T}$, приблизительно 50% животных подвергались деколонизации в носоглотке и желудочно-кишечном тракте, в то время как все животные, которым вводили только адъювант (имитация), оставались колонизированными (фиг. 24DE). Эти данные дополнительно демонстрируют, что все три вакцины-кандидата действуют аналогично в модели колонизации S. aureus.

9. Эффективность вакцин-кандидатов SpA в модели инфекции S. aureus кровотока на мышах.

В более ранней работе показано, что иммунизация мышей BALB/C с помощью SpA_{KKAA} приводила к образованию SpA-специфических антител, защищающих животных от внутривенного заражения кровотока MRSA USA300 LAC и последующего образования очагов абсцессов в тканях почек (43). По сравнению с ложноиммунизированными (адъювант в отдельности) мышами, иммунизация с помощью SpA_{KKAA}, $SpA_{Q9,10K/S33E}$ или $SpA_{Q9,10K/S33T}$ приводило к значимо более высоким титрам антител против $SpA_{KKAA,}$ против $SpA_{Q9,10K/S33E}$ или против $SpA_{Q9,10K/S33T}$ (фиг. 25A). Титры SpA-специфических антител, индуцированных посредством иммунизации SpA_{KKAA} у мышей BALB/c, были значимо выше при анализе посредством ELISA для $SpA_{KKAA,}$ чем анализе $SpA_{Q9,10K/S33E}$ или $SpA_{Q9,10K/S33T}$ (SpA_{KKAA} vs. $SpA_{Q9,10K/S33E}$, $P<0,0001$; SpA_{KKAA} vs. $SpA_{Q9,10K/S33T}$, $P<0,0001$). Аналогично, титры SpA-специфических антител, индуцированных посредством иммунизации $SpA_{Q9,10K/S33E}$ у мышей BALB/c, были значимо выше при анализе посредством ELISA для $SpA_{Q9,10K/S33E,}$ чем анализе SpA_{KKAA} или $SpA_{Q9,10K/S33T}$ (SpA_{KKAA} vs. $SpA_{Q9,10K/S33E}$, $P<0,001$; $SpA_{Q9,10K/S33E}$ vs. $SpA_{Q9,10K/S33T}$, $P<0,05$), в то время как титры SpA-специфических антител, индуцированных посредством иммунизации $SpA_{Q9,10K/S33T}$ у мышей BALB/c, были значимо выше при анализе посредством ELISA для $SpA_{Q9,10K/S33T,}$ чем анализе SpA_{KKAA} или $SpA_{Q9,10K/S33E}$ (SpA_{KKAA} vs. $SpA_{Q9,10K/S33T}$, $P<0,05$; $SpA_{Q9,10K/S33E}$ vs. $SpA_{Q9,10K/S33T}$, $P<0,05$) (фиг. 25A). Эти результаты позволяют предполагать, что некоторые, но не все эпитопы антител, продуцируемых при вакцинации $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ у мышей BALB/c, отличаются от эпитопов антител, продуцируемых при вакцинации $SpA_{KKAA,}$ и наоборот. Как описано ранее (43), по сравнению с ложноиммунизированными мышами, вакцинация SpA_{KKAA} снижала бактериальную нагрузку MRSA USA300 LAC и количество очагов абсцессов у мышей BALB/c (фиг. 25B; $P<0,0001$). Вакцинация $SpA_{Q9,\ 10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ приводила к схожей защите против инфекции кровотока MRSA USA300 LAC по сравнению с вакцинацией SpA_{KKAA}. По сравнению с ложноиммунизированными животными, иммунизация $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ снижала бактериальную нагрузку и количество очагов абсцессов у мышей BALB/c (фиг. 25C; $P<0,0001$). Таким образом, вакцинация $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ приводит к схожей защите против инфекции кровотока MRSA USA300 LAC и ассоциированного с ней образования абсцесса у мышей, как описано ранее для вакцины-кандидата SpA_{KKAA} (43).

10. Связывание вакцин-кандидатов SpA с SpA-нейтрализующим моноклональным антителом 3F6.

Гибридомное моноклональное антитело мыши (hMAb) 3F6 (IgG2a) получали с использованием спленоцитов из SpA_{KKAA}-иммунизированных мышей BALB/c (84). Ген hMAb 3F6 секвенировали и клонировали в экспрессирующий вектор для очистки рекомбинантного rMAb 3F6 из клеток HEK293 F (146). hMAb3F6 и rMAb 3F6 связываются с трехспиральной складкой каждого из пяти IgBD SpA (E, D, A, B, и C) и нейтрализуют их способность связываться с IgG или IgM человека (84, 146). Внутривенное введение hMAb3F6 или rMAb 3F6 в дозе 5 мг/кг защищает мышей BALB/c от ассоциированного с инфекцией кровотока S. aureus образования почечного абсцесса и бактериальной репликации (бактериальной нагрузки) (84, 146). Кроме того, внутривенное введение rMAb 3F6 (5 мг/кг) мышам C57BL/6 индуцирует деколонизацию S. aureus WU1 из носоглотки и желудочно-кишечного тракта предварительно колонизированных животных (146). Авторы настоящего изобретения задавались вопросом, связывается ли rMAb 3F6 с $SpA_{Q9,10K/S33E}$ или $SpA_{Q9,10K/S33T}$ с аффинностью, схожей с SpA_{KKAA}, когнатным антигеном, с помощью которого получено моноклональное антитело (84). При измерении посредством ELISA с фиксированными концентрациями лигандов и серийными разведениями rMAb 3F6, авторы настоящего изобретения получали константы аффинности SpA_{KKAA} (K_a $1,51\times10^{10}$ M^{-1}), $SpA_{Q9,10K/S33E}$ (K_a $1,42\times10^{10}$ M^{-1}) и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ (K_a $1,34\times10^{10}$ M^{-1}) для связывания с вакцинами-кандидатами SpA (фиг. 26). Эти данные позволяют предполагать, что замены аминокислот $Ser^{33}Glu$ и $Ser^{33}Thr$ не влияют на связывание SpA-нейтрализующего rMAb 3F6. Кроме того, замены аминокислот $Ser^{33}Glu$ и $Ser^{33}Thr$ не разрушают протективный SpA-эпитоп, что определяют по связыванию rMAb 3F6.

C. Обсуждение.

Авторы настоящего изобретения показали, что вакцины-кандидаты S. aureus - SpA_{KKAA} и SpA-KR - сохраняют значительное связывание с V_H3-идиотипическим иммуноглобулином при использовании $F(ab)_2$-фрагмента IgG человека в качестве лиганда. При анализе с использованием тучных клеток человека (клеток LAD2), покрытых V_H3-IgG, SpA_{KKAA} и SpA-KR запускает перекрестную сшивку V_H3-Ig, что измеряют по высвобождению β-гексозаминидазы и гистамина (145). В модели анафилактической повышенной проницаемости сосудов на мышах биологические эффекты такого высвобождения гистамина можно измерять как экстравазацию красителя синего Эванса в анатомических участках введения V_H3-

IgG мышам μMT. В совокупности, эти наблюдения вызывают озабоченность в отношении безопасности вакцин-кандидатов SpA в качестве потенциальных активаторов анафилактических реакций у людей.

Для решения проблем с вакцинами SpA авторы настоящего изобретения конструировали два новых антигена, $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$, с улучшенными профилями безопасности. У $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ отсутствует аффинность к V_H3-идиотипическим иммуноглобулинам, они демонстрируют сниженную или отсутствующую активность в отношении высвобождения гистамина из покрытых V_H3-IgE тучных клеток человека и не способствуют экстравазации красителя синего Эванса в ответ на инъекцию V_H3-IgG мышам μMT. Иммунизация мышей BALB/c с помощью $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ приводила к уровням SpA-специфических IgG-ответов, схожим с SpA_{KKAA}. При анализе на эффективность вакцины в моделях на мышах вакцинация с помощью $SpA_{Q9,10K/S33E}$ или $SpA_{Q9,10K/S33T}$ приводила к уровням защиты от колонизации S. aureus или инвазивной инфекции кровотока, схожим с вакциной SpA_{KKAA} (43). Кроме того, замены аминокислот $Ser^{33}Glu$ и $Ser^{33}Thr$ не нарушают протективные эпитопы IgBD, определяемые с помощью моноклонального антитела 3F6, протективного в отношении колонизации S. aureus и инвазивного заболевания (84, 146). Учитывая эти наблюдения, авторы настоящего изобретения предполагали, что вакцины-кандидаты S. aureus $SpA_{Q9,10K/S33E}$ и $SpA_{Q9,10K/S33T}$ могут подходить для разработки вакцин клинической категории для тестирования клинической безопасности и эффективности против колонизации S. aureus и инвазивного заболевания.

D. Материалы и способы.

Бактериальные штаммы и условия роста. Штаммы S. aureus USA300 (LAC) и WU1 выращивали в триптическом соевом бульоне (TSB) или триптическом соевом агаре (TSA) при 37°C. Штаммы Escherichia coli DH5α и BL21(DE3) выращивали при 37°C в лизогенном бульоне (LB) с 100 мкг/мл ампициллина и 1 мМ изопропил-β-d-1-тиогалактопиранозида (IPTG) для получения рекомбинантных белков.

Конструирование вариантов SpA. Кодирующую последовательность вариантов SpA синтезировали в Integrated DNA Technologies, Inc. Последовательности и плазмиду pET15b+ расщепляли с помощью NdeI и BamHI, соответственно. Затем два продукта расщепления лигировали и с их помощью трансформировали Escherichia coli DH5α для получения клонов, экспрессирующих меченые N-концевым гексагистидином (His6) рекомбинантные белки. Клоны-кандидаты валидировали посредством секвенирования ДНК. С помощью правильных плазмид трансформировали E. coli BL21 (DE3) для получения вариантов-кандидатов SpA.

Очистка белков. Культуры E. coli (2 литра), выращенные в LB, дополненном ампициллином и IPTG до оптической плотности 600 нм (A600) 2,0, центрифугировали (10,000×g в течение 10 минут). осажденные клетки суспендировали в буфере A (50 мМ Трис-HCl [pH 7,5], 150 мМ NaCl), и полученные суспензии лизировали в прессе Френча при 14000 фунтах/дюйм^2 (Thermo Spectronic, Rochester, NY). Неразрушенные клетки удаляли посредством центрифугирования (5000×g в течение 15 минут) и неочищенные лизаты подвергали ультрацентрифугированию (100000×g в течение 1 ч при 4°C). Растворимые рекомбинантные белки подвергали хроматографии с гравитационной элюцией на Ni-NTA-агарозе (QIAGEN) с заполненным объемом 1 мл, предварительно уравновешенным буфером A. Колонки промывали 20 объемами слоя буфера A, 20 объемами слоя буфера A, содержащего 10 мМ имидазола, и элюировали с помощью 6 мл буфера A, содержащего 500 мМ имидазола. Аликвоты элюированных фракций смешивали с равными объемами буфера для образцов и разделяли посредством электрофореза в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS). Рекомбинантные белки подвергали диализу против фосфатно-солевого буферв (PBS) и определяли их концентрации с помощью анализа бицинхониновой кислоты (Pierce). Для исследований иммунизации на животных и для инкубации с линиями клеток препараты рекомбинантных белков подвергали удалению эндотоксина с помощью центрифужных колонок (Pierce) для устранения контаминирующих LPS. Чистота образцов тестировали с помощью набора для хромогенного анализа LAL эндотоксина ToxinSensor™ (Genscript).

Очистка антител.

Для очистки VH3 IgG плазму человека (20 мл), полученную с использованием цельной крови человека, подвергали аффинной хроматографии на смоле с протеином G (Genscript) для удаления IgM, IgD и IgA человека. Иммуноглобулины, элюированные из смолы с протеином G, подвергали второй аффинной хроматографии на SpA_{KK}-связанной смоле для обогащения VH3 IgG [SpA_{KK} не может связываться с Fcγ-доменом IgG (48)]. Смолу с протеином G и SpA_{KK}-связанную смолу промывали 20 объемами колонки PBS и связанные белки элюировали с помощью 0,1 M глицина, pH 3,0, нейтрализовали с помощью 1 M Трис-HCl, pH 8,5, и подвергали диализу против PBS в течение ночи. В случае очистки VH3 IgE, линию клеток человека HEK 293F использовали для транзиторной экспрессии pVITRO1-трастузумаб-IgE-к. Клетки выращивали в среде DMEM с высокой глюкозой с 10% FCS, 2 мМ глутамином, пенициллином (5000 ед./мл) и стрептомицином (100 мкг/мл). Клетки, трансфицированные с помощью pVITRO1-трастузумаб-IgE-к с использованием PEI, инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2. Для стабильной экспрессии IgE клетки культивировали в среде Freestyle 293 в течение 7 дней и собирали при 12000×g в течение 20 минут. Супернатант очищали на 2 мл смолы с протеином L (Genscript). Смолу промывали 20 объемами колонки PBS и связанные VH3 IgE элюировали с помощью 0,1 M глицина, pH 3,0, нейтра-

лизовали с помощью 1 М Трис-HCl, pH 8,5, и подвергали диализу против PBS в течение ночи.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Эксперименты с SPR, показанные в табл. 4, 5, 6, 8, осуществляли с помощью ProteOn™ XPR36 с чипом ProteOn HTG. Подвижный буфер представлял собой PBS с 0,05% Tween-20. Поверхности сенсорного чипа активировали 2 мМ сульфатом никеля и регенерировали 300 мМ ЭДТА, соответственно. 500 нМ тестовых препаратов (SpA дикого типа или варианты) иммобилизовали при скорости потока 25 мкл/мин. Для измерения взаимодействий с SpA дикого типа лиганды (очищенные иммуноглобулины) использовали в концентрациях 500, 400, 300, 200 и 100 нМ. Для измерения взаимодействий с вариантами SpA лиганды использовали в концентрациях 4, 3, 2, 1 и 0,5 мкМ. Скорости ассоциации и диссоциации измеряли при постоянной скорости потока 30 мкл/мин и анализировали с использованием модели реакции двух состояний. Константы ассоциации определяли с помощью трех независимых экспериментов.

Интерферометрия биослоя (BLI). Эксперимент с BLI, показанный в табл. 8, осуществляли с использованием интерферометра биослоя BLItz. Тестовые препараты (25-50 нМ) иммобилизовали на сенсоре Ni-NTA на 120 с. Сенсор уравновешивали PBS в течение 80 с, погружали в растворы, содержащие лиганд в концентрациях 20, 15, 10 и 0 мкМ, на 120 (фаза ассоциации) с последующими 120 с в PBS (фаза диссоциации). Данные получали с использованием программного обеспечения для получения данных BLI 9.0 (FortéBIO) и анализировали с использованием программное обеспечение для анализа данных 9.0.0,14 (FortéBIO). Зарегистрированные значения ассоциации вычисляли с помощью модели аппроксимации кривой.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Планшеты для микротитрования (NUNC MaxiSorp) покрывали очищенными антигенами в количестве 1 мкг/мл (для измерения титров антител в тестовых сыворотках) или 0,5 мкг/мл (для измерения взаимодействия с антителами 3F6) в 0,1 М карбонатном буфере (pH 9,5) при 4°C в течение ночи. Лунки блокировали и инкубировали с тестовой сывороткой или антителами 3F6 перед инкубацией с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) IgG мыши или человека (1 мкг/мл, Jackson ImmunoResearch). Все планшеты инкубировали с HRP-конъюгированным вторичным антителом мыши (Fisher Scientific) и проявляли с использованием реагента OptEIA (BD Biosciences). Полумаксимальные титры вычисляли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Константу ассоциации вычисляли с помощью модели нелинейной регрессии (аппроксимация кривой) в программном обеспечении GraphPad Prism. Все эксперименты осуществляли в трех параллелях для вычисления средних значений и стандартной ошибки среднего и повторяли для воспроизводимости.

Анафилактический ответ у мышей μMT. Мышей с мутацией μMT приобретали в Jackson Laboratory и скрещивали в University of Chicago. Когорты по 5 самок мышей возрастом шесть недель на группу сенсибилизировали посредством интрадермальной инъекции в ухо VH3 IgG (2 мкг в 20 мкл PBS) и через 24 ч им внутривенно инъецировали под анестезией кетамином-ксилазином (100 мг-20 мг/кг) в периорбитальный венозный синус правого глаза PBS, SpA или его варианты (200 мкг в 100 мкл PBS). После 5 мин стимуляции тестовым препаратом животным внутривенно инъецировали в периорбитальный венозный синус левого глаза 100 мкл 2% синего Эванса. Животных умерщвляли, уши иссекали, сушили и экстрагировали в формамиде в течение 24 ч при 65°C. Экстравазация синего Эванса в тканях уха (проницаемость сосудов) количественно анализировали посредством измерения поглощения при 620 нм.

Эксперименты по активации базофила человека. Кровь (10 мл) получали из здоровых доноров и незамедлительно смешивали с 1 мл ЭДТА 0,1 М, pH7,5. SpA дикого типа, или варианты вакцины-кандидаты (1 мкг), или PBS добавляли в 1 мл аликвоты крови с ЭДТА и инкубировали образцы в течение 1 ч при 37°C с вращением. Аликвоты образцов обрабатывали лизирующим буфером RBC (Biolegend), центрифугировали (350×g) и выбрасывали супернатанты. Клетки в осадках промывали холодным PBS и ресуспендировали в PBS с 5% FBS для окрашивания с использованием антител против CD123-FITC, против HLA-Da-PerCP, против CD63-PE и против CD203c-APC (Biolegend) в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин. Все окрашенные образцы анализировали с использованием BD LSRII 3-8 (BD Biosciences). Общие количества базофилов получали посредством гейтирования из $SSC^{low}/CD203c^{+}/CD123^{+}/HLA\text{-}DR^{-}$ клеток и выбирали активированные базофилы из совокупности $CD63^{+}CD203c^{+}$. Эксперименты осуществляли в трех параллелях и повторяли по меньшей мере три раза с использованием разных здоровых доноров.

Дегрануляция тучных клеток. Тучные клетки человека (LAD2) [любезно предоставленные Dr. Kirshenbaum из NIAID] сенсибилизировали посредством инкубации 2×10^5 клеток с 100 нг VH3 IgE в течение ночи при 37°C в атмосфере 5% CO_2. Клетки собирали и дважды промывали буфером HEPES, содержащим 0,04% бычьего сывороточного альбумина (BSA), для удаления свободного IgE. Клетки суспендировали в том же буфере в концентрации 2×10^5 клеток/мл и стимулировали SpA или тестовыми препаратами в течение 30 мин перед анализом на высвобождение β-гексозаминидазы и гистамина. Клетки осаждали и истощенную среду переносили в новую пробирку, в то время как клетки в осадке лизировали 0,1% Triton X-100. Активность β-гексозаминидазы в истощенной среде и лизированные Triton X-100 клетки измеряли посредством добавления колориметрического субстрата pNAG (p-нитрофенил-N-

ацетил-β-D-глюкозаминида, полученного в Sigma; конечная концентрация 3,5 мг/мл при pH 4,5) в течение 90 мин. Реакцию тушили посредством добавления 0,4 М глицина, pH 10,7, и регистрировали поглощение при λ=405 нм. Результаты выражали как процент высвобождения β-гексозаминидазы в истощенной среде относительно общего (истощенная среды+лизированные Triton X-100 клетки). Эксперименты осуществляли в трех параллелях и повторяли по меньшей мере три раза. Гистамин измеряли с использованием ферментативного иммунологического анализа (SpiBio Bertin Pharma). В кратком изложении, лунки планшета для микротитрования покрывали антителом мыши против гистамина и инкубировали в течение 24 ч с меченым веществом (ацетилхолинэстеразы, связанной с гистамином), смешанным с экспериментальным экстрактом. Планшеты промывали и в лунки добавляли реактив Эллмана (субстрат ацетилхолинэстеразы). Образование продукта определяли посредством регистрации поглощения при 412 нм. Поглощение при 412 нм пропорционально количеству меченого вещества, связанного с лункой, и обратно пропорционально количеству гистамина, присутствующего в экспериментальном экстракте. Все образцы анализировали в двух параллелях.

Активная иммунизация мышей. Животных BALB/c или C57BL/6J (возрастом 3 недели, самки, 15 животных на группу) иммунизировали PBS или 50 мкг очищенного, несодержащего эндотоксин белка $SpA_{KKAA,}$ или $SpA_{Q9,10K/S33E}$, или $SpA_{Q9,10K/S33T}$, эмульгированного 5:2:3 антигена:CFA:IFA, и подвергали бустерной иммунизации 50 мкг белков, эмульгированных 1:1 антигена:IFA, через 11 дней после первой иммунизации. В день 20 мышам пускали кровь и собирали сыворотку для оценки титров антител против вакцин-кандидатов посредством ELISA. В день 21 мышей инокулировали для колонизации носоглотки или инфицировали посредством внутривенной инъекции бактерий.

Колонизация носоглотки мыши. Ночные культуры штамма S. aureus WU1 разводили 1:100 в свежем TSB и выращивали в течение 2 ч. при 37°C, как описано (102). Клетки центрифугировали, промывали и суспендировали в PBS. 10 иммунизированных самок мышей C57BL/6J на группу (Jackson Laboratory) анестезировали посредством интраперитонеальной инъекции кетамина-ксилазина (100 мг-20 мг/кг) и 1×10^8 КОЕ S. aureus (в объеме 10 мкл) переносили пипеткой в правую ноздрю каждой мыши. С недельными интервалами после инокуляции получали мазок из ротоглотки мышей и образцы кала собирали и гомогенизировали в PBS. Образцы мазков и гомогенаты образцов кала распределяли по маннитно-солевому агару (MSA) для подсчета бактерий. В конце эксперимента мышам пускали кровь посредством пункции периорбитальной вены для получения сывороток для анализов гуморальных ответов с использованием стафилококкового антигенного матрикса, как описано (43). В кратком изложении, нитроцеллюлозные мембраны подвергали блоттингу с 2 мкг аффинно-очищенных стафилококковых антигенов. Мембраны блокировали 5% дегранулированного молока и инкубировали с разведенными сыворотками мыши (разведение 1:10000) и IRDye 680-конъюгированным антителом козы против IgG мыши (Li-Cor). Интенсивности сигналов количественно анализировали с использованием инфракрасной системы визуализации Odyssey (Li-Cor). Все эксперименты на животных осуществляли в двух параллелях. Двухсторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Шидака на множественность сравнений (программное обеспечение GraphPad) использовали для анализа статистической значимости данных о колонизации носоглотки и кала, ELISA и антигенном матриксе.

Модель почечного абсцесса на мышах. Ночные культуры S. aureus USA300 (LAC) разводили 1:100 в свежем TSB и выращивали в течение 2 ч при 37°C. Стафилококки осаждали, промывали и суспендировали в PBS. Прививочный материал количественно анализировали, распределяя аликвоты образца на TSA и подсчитывая колонии, образовавшиеся после инкубации. Группы по 15 мышей BALB/c, иммунизированных несодержащим эндотоксин белком SpA_{KKAA} или $SpA_{Q9,10K/S33E}$ или $SpA_{Q9,10K/S33T}$, подготовленным в PBS, или ложноиммунизированных (контрольный PBS), анестезировали и инокулировали с помощью 5×10^6 КОЕ S. aureus USA300 (LAC) в периорбитальный венозный синус правого глаза. В день 15 после провокационной пробы мышей умерщвляли посредством ингаляции CO_2. Обе почки удаляли и анализировали стафилококковую нагрузку в одном органе посредством гомогенизации ткани почки с PBS, 0,1% Triton X-100. Серийные разведения гомогената распределяли на TSA и инкубировали для образования колоний. Оставшийся орган подвергали гистопатологическому анализу. В кратком изложении, почки фиксировали в 10% формалине в течение 24 ч при комнатной температуре. Ткани заключали в парафин, получали тонкие срезы, окрашивали гематоксилином-эозином и анализировали посредством световой микроскопии для подсчета очагов абсцессов. Все эксперименты на животных осуществляли в двух параллелях и осуществляли статистический анализ с использованием t-критерия (и непараметрических критериев) в Graphpad Prism.

Заявление об этических принципах. Эксперименты с кровью людей-добровольцев осуществляли по протоколу, рассмотренному, одобренному и контролируемому Экспертным советом (IRB) University of Chicago. Все эксперименты на мышах осуществляли в соответствии с правилами, принятыми в учреждении, следуя экспериментальному протоколу и одобрению Институционального комитета по биологической безопасности (IBC) и Институционального комитета по содержанию и использованию животных (IACUC) в University of Chicago.

Статистические анализы. В случае фиг. 22, 23, 25 и табл. 4-9 для получения статистической значи-

мости между средними значениями многочисленных групп использовали односторонний ANOVA с апостериорным критерием (поправкой Бонферрони или Даннетта на множественность сравнений). В случае фигуры 24 для анализа статистической значимости данных о колонизации мыши и стафилококковом антигенном матриксе осуществляли двухсторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Шидака на множественность сравнений (программное обеспечение GraphPad). Все данные анализировали с помощью Prism (GraphPad Software, Inc.) и значения P менее 0,05 считали значимыми.

E. Таблицы.

Таблица 4

Измерения аффинности с использованием SpA дикого типа, вакцин-кандидатов SpA_{KKAA} и $SpA_{Q9,10K/G29X}$ и IgG человека[#]

$SpA_{Q9,10K/G29X}$[a]	**K_A($\times 10^5$ M^{-1})** [b]	**SD($\times 10^5$)**[c]	**Значение P**[d]
$SpA_{Q9,10K/G29H}$	1,435	0,2799	*
$SpA_{Q9,10K/G29C}$	1,743	0,8619	*
$SpA_{Q9,10K/G29T}$	1,982	0,9146	ns
$SpA_{Q9,10K/G29Q}$	2,057	0,9600	*
$SpA_{Q9,10K/G29L}$	3,146	1,3860	ns
$SpA_{Q9,10K/G29E}$	3,182	1,5300	ns
$SpA_{Q9,10K/G29P}$	3,396	1,4410	ns
$SpA_{Q9,10K/G29F}$	3,460	1,5860	ns
$SpA_{Q9,10K/G29M}$	3,893	0,7868	ns
$SpA_{Q9,10K/G29V}$	4,350	1,0830	ns
$SpA_{Q9,10K/G29W}$	4,508	0,7448	ns
$SpA_{Q9,10K/G29D}$	5,478	1,0150	ns
$SpA_{Q9,10K/G29R}$	6,056	0,9814	ns
$SpA_{Q9,10K/G29N}$	6,231	0,7696	ns
$SpA_{Q9,10K/G29Y}$	8,367	3,326	ns
$SpA_{Q9,10K/G29S}$	9,398	4,298	***
$SpA_{Q9,10K/G29K}$	9,738	2,345	**
$SpA_{Q9,10K/G29I}$	10,070	4,398	**
$SpA_{Q9,10K/G29A}$	11,310	3,119	***
SpA_{KKAA}	**5,022**	**2,150**	
SpA	1081	16,34	

[a]Тестовые препараты иммобилизовали на чипе Bio-Rad ProteOn HTG и подвергали измерениям посредством поверхностного плазмонного резонанса с увеличивающимися концентрациями IgG человека и позволяли им протекать через каждый канал чипа. Данные анализировали с помощью трех независимых экспериментов.

[b]Данные использовали для получения константы ассоциации (K_A) для каждого тестового препарата.

[c]Данные использовали для получения стандартного отклонения (SD) для каждого тестового препарата.

[d]Данные анализировали с использованием одностороннего ANOVA с поправкой Даннетта на множественность сравнений между каждым тестовым препаратом и SpA_{KKAA}. Обозначения: ns, не значимо; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; ****, P<0,0001.

Таблица 5

Измерения аффинности с использованием SpA дикого типа, вакцин-кандидатов SpA_{KKAA} и $SpA_{Q9,10K/S33X}$ и IgG человека[#]

$SpA_{Q9,10K/S33X}$[a]	**K_A($\times 10^5$ M^{-1})[b]**	**SD($\times 10^5$)[c]**	**Значение P[d]**
$SpA_{Q9,10K/S33E}$	0,496	0,0439	**
$SpA_{Q9,10K/S33T}$	0,386	0,1218	***
$SpA_{Q9,10K/S33Y}$	1,571	0,7497	ns
$SpA_{Q9,10K/S33I}$	1,840	1,1290	*
$SpA_{Q9,10K/S33L}$	2,051	0,7592	ns
$SpA_{Q9,10K/S33W}$	2,356	0,6373	ns
$SpA_{Q9,10K/S33V}$	2,471	1,2060	ns
$SpA_{Q9,10K/S33H}$	2,784	0,6087	ns
$SpA_{Q9,10K/S33N}$	3,066	1,0100	ns
$SpA_{Q9,10K/S33M}$	3,177	1,3750	ns
$SpA_{Q9,10K/S33R}$	3,463	1,7950	ns
$SpA_{Q9,10K/S33D}$	3,824	1,7100	ns
$SpA_{Q9,10K/S33F}$	3,902	1,8040	ns
$SpA_{Q9,10K/S33Q}$	4,068	2,8350	ns
$SpA_{Q9,10K/S33P}$	4,218	2,2560	ns
$SpA_{Q9,10K/S33C}$	4,577	0,6927	ns
$SpA_{Q9,10K/S33K}$	5,124	2,1810	ns
$SpA_{Q9,10K/S33A}$	10,540	5,0520	***
$SpA_{Q9,10K/S33G}$	11,180	5,2040	***
SpA_{KKAA}	**5,022**	**0,0439**	
SpA	1081^{-1}	16,34	

[a]Тестовые препараты иммобилизовали на чипе Bio-Rad ProteOn HTG и подвергали измерениям посредством поверхностного плазмонного резонанса с увеличивающимися концентрациями IgG человека и позволяли им протекать через каждый канал чипа. Данные анализировали с помощью трех независимых экспериментов.

[b]Данные использовали для получения константы ассоциации (K_A) для каждого тестового препарата.

[c]Данные использовали для получения стандартного отклонения (SD) для каждого тестового препарата.

[d]Данные анализировали с использованием одностороннего ANOVA с поправкой Даннетта на множественность сравнений между каждым тестовым препаратом и SpA_{KKAA}. Обозначения: ns, не значимо; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; ****, P<0,0001.

Таблица 6

Константа ассоциации для связывания с IgG человека вариантов SpA Q9,10K/S33X или Q9,10K/G29X в комбинации с другими заменами аминокислот#

Родительский вариант SpA[a]	**K_A ($\times 10^5$ M^{-1})[b]**	**SD[c]**	**Значение P[d]**	**Родительский вариант SpA с дополнительными заменами[a]**	**K_A ($\times 10^5$ M^{-1})[b]**	**SD ($\times 10^5$ M^{-1})[c]**	**Значение P[e]**

$SpA_{Q9,10K/S33E}$	0,496	0,044	*	$SpA_{Q9,10K/S33E/D36,37A}$	0,568	0,1185	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33E/G29A}$	1,265	0,6947	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33E/D36,37A/G29A}$	1,892	0,6793	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33E/G29F}$	1,575	0,4060	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33E/D36,37A/G29F}$	14,850	13,480	***
				$SpA_{Q9,10K/S33E/G29R}$	4,840	1,1960	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33E/D36,37A/G29R}$	10,240	5,2600	*
$SpA_{Q9,10K/S33Q}$	4,068	2,835	ns	$SpA_{Q9,10K/S33Q/D36,37A}$	3,930	1,9290	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33Q/G29A}$	2,563	1,3670	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33Q/D36,37A/G29A}$	4,893	3,8360	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33Q/G29F}$	1,275	0,7355	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33Q/D36,37A/G29F}$	12,470	8,8810	*
				$SpA_{Q9,10K/S33Q/G29R}$	2,333	0,4245	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33Q/D36,37A/G29R}$	6,378	4,6820	ns
$SpA_{Q9,10K/S33F}$	3,902	1,804	ns	$SpA_{Q9,10K/S33F/D36,37A}$	3,634	2,6420	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33F/G29A}$	1,190	0,4299	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33F/D36,37A/G29A}$	insoluble		
				$SpA_{Q9,10K/S33F/G29F}$	2,440	0,7657	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33F/D36,37A/G29F}$	insoluble		
				$SpA_{Q9,10K/S33F/G29R}$	1,903	0,8693	ns
				$SpA_{Q9,10K/S33F/D36,37A/G29R}$	9,056	4,9730	*
$SpA_{Q9,10K/S33K}$	5,124	2,181	ns	$SpA_{Q9,10K/S33K\ /D36,37A}$	8,048	4,1050	ns
$SpA_{Q9,10K/S33A}$	10,540	5,052	***	$SpA_{Q9,10K/S33A/D36,37A}$	18,830	18,320	ns
$SpA_{Q9,10K/G29F}$	3,460	1,586	ns	$SpA_{Q9,10K/G29F/D36,37A}$	3,723	1,5100	ns
$SpA_{Q9,10K/G29R}$	6,056	0,981	ns	$SpA_{Q9,10K/G29R/D36,37A}$	6,808	3,6840	ns
$SpA_{Q9,10K/G29A}$	11,310	3,119	**	$SpA_{Q9,10K/G29A/D36,37A}$	1,78	0,5098	***

SpA-KR	5,464	0,767	ns				
SpA_{RRVV}	5,609	2,355	ns				
SpA_{KKAA}	**5,022**	**2,150**	**-**				

[a]Тестовые препараты иммобилизовали на чипе Bio-Rad ProteOn HTG и подвергали измерениям посредством поверхностного плазмонного резонанса с увеличивающимися концентрациями IgG человека и позволяли им протекать через каждый канал чипа. Данные анализировали с помощью трех независимых экспериментов.

[b]Данные использовали для получения константы ассоциации (K_A) для каждого тестового препарата.

[c]Данные использовали для получения стандартного отклонения (SD) для каждого тестового препарата.

[d, e] Данные анализировали с использованием одностороннего ANOVA с поправкой Даннетта на множественность сравнений между каждым тестовым препаратом и SpA_{KKAA}[d] и между тестовым препаратом (столбец 5) и родительской вакциной (столбец 1)[e]. Обозначения: ns, не значимо; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; ****, P<0,0001.

Таблица 7

Константа ассоциации для связывания каждой комбинированной мутации с $F(ab)_2$-фрагментом IgG человека

Вариант SPA[A]	K_A (□M^{-1})[B]	SD[C]	Значение P[D]
SPA	$1,44\times10^7$	$8,193\times10^6$	-
SPA_{KKAA}	$8,27\times10^4$	$2,76\times10^4$	-
SPA-KR	$6,42\times10^4$	$3,80\times10^4$	ns
$SPA_{Q9,10K/S33E}$	41,24	5,386	***
$SPA_{Q9,10K/S33T}$	43,55	5,737	***

[a]Тестовые препараты иммобилизовали на сенсоре Bio-Rad ProteOn HTG и подвергали поверхностному плазмонному резонансу (SPR) с увеличивающимися концентрациями $F(ab)_2$-фрагмента IgG человека. Данные анализировали с помощью трех независимых экспериментов.

[b]Данные использовали для получения константы ассоциации (K_A) для каждого тестового препарата.

[c]Данные использовали для получения стандартного отклонения (SD) для каждого тестового препарата.

[d]Данные анализировали с использованием одностороннего ANOVA с поправкой Даннетта на множественность сравнений между каждым тестовым препаратом и SpAKKAA. Обозначения: ns, не значимо; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; ****, P<0,0001.

Таблица 8

Константа ассоциации для связывания каждой комбинированной мутации с Fcγ-фрагментом IgG человека

Вариант SpA[a]	**K_A (□M^{-1})[b]**	**SD[c]**	**Значение P[d]**
SpA	$5{,}17\times10^{7}$	$8{,}995\times10^{6}$	-
SpA_{KKAA}	32,91	16,291	-
$SpA_{Q9,10K/S33E}$	32,68	16,414	ns
$SpA_{Q9,10K/S33T}$	39,91	17,081	ns
SpA-KR	39,12	13,348	ns

[a]Тестовые препараты иммобилизовали на Ni-NTA-сенсоре и подвергали интерферометрии биослоя (BLI) с увеличивающимися концентрациями Fc-фрагмента IgG человека. Данные анализировали с помощью трех независимых экспериментов.

[b]Данные использовали для получения константы ассоциации (K_A) для каждого тестового препарата.

[c]Данные использовали для получения стандартного отклонения (SD) для каждого тестового препарата.

[d]Данные анализировали с использованием одностороннего ANOVA с поправкой Даннетта на множественность сравнений между каждым тестовым препаратом и SpA_{KKAA}. Обозначения: ns, не значимо; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; ****, P<0,0001.

Таблица 9

Активация базофилов человека SpA и вариантами вакцин-кандидатов

Вариант SpA/ PBS[a]	**PBS**	**SpA**	**SpA_{KKAA}**	**$SpA_{Q9,10K/S33E}$**	**$SpA_{Q9,10K/S33T}$**	**SpA-KR**	**SpA_{RRVV}**
% активированных базофилов	4,39±0,884	32,05±0,919	10,66±1,612	5,38±0,318	4,57±0,877	8,15±1,018	10,16±0,905
Значение P vs. PBS[b]	-	****	**	ns	ns	ns	**
Значение P vs. SpA_{KKAA}[c]		****	-	*	**	ns	ns

[a]Тестовые препараты инкубировали с базофилами человек и выражали данные как процент активированных базофилов от общей популяции базофилов (100%).

[b, c] Для статистического анализа использовали односторонний ANOVA с поправкой Бонферрони на множественность сравнений, сравнивая тестовый препарат и PBS[b] или тестовый препарат и SpA_{KKAA}[c]. Обозначения: ns, не значимо; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; ****, P<0,0001.

Ссылки.

Следующие ссылки, в той степени, в которой они предоставляют примерные процедурные или другие детали, дополняющие те, которые приведены в настоящем описании, конкретно включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Патент США № 3791932
Патент США № 3949064
Патент США № 4174384
Патент США № 4338298
Патент США № 4356170
Патент США № 4367110
Патент США № 4372945
Патент США № 4452901
Патент США № 4474757
Патент США № 4554101
Патент США № 4578770
Патент США № 4596792
Патент США № 4599230
Патент США № 4599231
Патент США № 4601903
Патент США № 4608251
Патент США № 4683195
Патент США № 4683202
Патент США № 4684611
Патент США № 4690915
Патент США № 4690915
Патент США № 4748018
Патент США № 4800159
Патент США № 4879236
Патент США № 4952500
Патент США № 5084269
Патент США № 5199942
Патент США № 5221605
Патент США № 5238808
Патент США № 5302523

Патент США № 5310687
Патент США № 5322783
Патент США № 5384253
Патент США № 5464765
Патент США № 5512282
Патент США № 5512282
Патент США № 5538877
Патент США № 5538880
Патент США № 5548066
Патент США № 5550318
Патент США № 5563055
Патент США № 5580859
Патент США № 5589466
Патент США № 5591616
Патент США № 5610042
Патент США № 5620896
Патент США № 5648240
Патент США № 5656610
Патент США № 5702932
Патент США № 5736524
Патент США № 5780448
Патент США № 5789215
Патент США № 5801234
Патент США № 5840846
Патент США № 5843650
Патент США № 5846709
Патент США № 5846783
Патент США № 5849497
Патент США № 5849546
Патент США № 5849547
Патент США № 5858652
Патент США № 5866366
Патент США № 5871986
Патент США № 5916776
Патент США № 5922574
Патент США № 5925565
Патент США № 5925565
Патент США № 5928905
Патент США № 5928906
Патент США № 5932451

Патент США № 5935819
Патент США № 5935825
Патент США № 5939291
Патент США № 5942391
Патент США № 5945100
Патент США № 5958895
Патент США № 5981274
Патент США № 5994624
Патент США № 6008341
Патент США № 6288214
Патент США № 6294177
Патент США № 6651655
Патент США № 6656462
Патент США № 6733754
Патент США № 6756361
Патент США № 6770278
Патент США № 6793923
Патент США № 6814971
Патент США № 6936258
Патентная заявка США № 2002/0169288
Патентная заявка США № 2003/0153022
Заявка PCT № PCT/US89/01025
Заявка PCT № WO 00/02523
Заявка PCT № WO 00/12132
Заявка PCT № WO 00/12689
Заявка PCT № WO 00/15238
Заявка PCT № WO 01/34809
Заявка PCT № WO 01/60852
Заявка PCT № WO 01/98499
Заявка PCT № WO 02/059148
Заявка PCT № WO 02/094868
Заявка PCT № WO 03/53462
Заявка PCT № WO 04/43407
Заявка PCT № WO 06/032472
Заявка PCT № WO 06/032475
Заявка PCT № WO 06/032500
Заявка PCT № WO 07/113222
Заявка PCT № WO 07/113223
Заявка PCT № WO 94/09699
Заявка PCT № WO 95/06128
Заявка PCT № WO 95/08348
Заявка PCT № WO 98/57994

1. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VGJ. 2015. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev 28:603-661.

2. van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, Wertheim HF, Verbrugh HA. 2009. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by Staphylococcus aureus. Infect Genet Evol 9:32-47.

3. Hanssen AM, Kindlund B, Stenklev NC, Furberg AS, Fismen S, Olsen RS, Johannessen M, Solid JUE. 2017. Localization of Staphylococcus aureus in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. BMC Microbiol 17:89.

4. Mertz D, Frei R, Periat N, Zimmerli M, Battegay M, Flückiger U, Widmer AF. 2009. Exclusive Staphylococcus aureus throat carriage: at-risk populations. Arch Intern Med 169:172-178.

5. Boyce JM, Havill NL, Maria B. 2005. Frequency and possible infection control implications of gastrointestinal colonization with methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 43:5992-5995.

6. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. 2001. Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia. N Engl J Med 344:11-16.

7. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. 2005. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. Lancet Infect Dis 5:751-762.

8. Buehlmann M, Frei R, Fenner L, Dangel M, Fluckiger U, Widmer AF. 2008. Highly effective regimen for decolonization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriers. Infect Control Hosp Epidemiol 29:510-516.

9. Gilpin DF, Small S, Bakkshi S, Kearney MP, Cardwell C, Tunney MM. 2010. Efficacy of a standard methicillin-resistant Staphylococcus aureus decolonisation protocol in routine clinical practice. J Hosp Infect 75:93-98.

10. Acton DS, Plat-Sinnige MJ, van Wamel W, de Groot N, van Belkum A. 2009. Intestinal carriage of Staphylococcus aureus: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18:115-127.

11. Verkaik NJ, Lebon A, de Vogel CP, Hooijkaas H, Verbrugh HA, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA, van Belkum A, van Wamel WJ. 2010. Induction of antibodies by Staphylococcus aureus nasal colonization in young children. Clin Microbiol Infect 16:1312-1317.

12. Swierstra J, Debets S, de Vogel C, Lemmens-den Toom N, Verkaik N, Ramdani-Bouguessa N, Jonkman MF, van Dijl JM, Fahal A, van Belkum A, van Wamel W. 2015. IgG4 subclass-specific responses to Staphylococcus aureus antigens shed new light on host-pathogen interaction. Infect Immun 83:492-501.

13. Holtfreter S, Jursa-Kulesza J, Masiuk H, Verkaik NJ, de Vogel C, Kolata J, Nowosiad M, Steil L, van Wamel W, van Belkum A, Völker U, Giedrys-Kalemba S, Bröker BM. 2011. Antibody responses in furunculosis patients vaccinated with autologous formalin-killed Staphylococcus aureus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30:707-717.

14. Kluytmans J, van Belkum A, Verburgh H. 1997. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 10:505-520.

15. Weinstein HJ. 1959. The relation between nasal-staphylococcal-carrier state and the incidence of postoperative complications. N Engl J Med 260:1303-1308.

16. Missiakas D, Schneewind O. 2016. Staphylococcus aureus vaccines: deviating from the carol. J Exp Med 231:1645-1653.

17. Corrigan RM, Miajlovic H, Foster TJ. 2009. Surface proteins that promote adherence of Staphylococcus aureus to human desquamated nasal epithelial cells. BMC Microbiol 9:22.

18. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H, Gross M, Nicholson G, Neumeister B, Mond JJ, Peschel A. 2004. Role of teichoic acids in Staphylococcus aureus nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. Nat Med 10:243-245.

19. Kiser KB, Cantey-Kiser JM, Lee JC. 1999. Development and characterization of a Staphylococcus aureus nasal colonization model in mice. Infect Immun 67:5001-5006.

20. Weidenmaier C, Goerke C, Wolz C. 2012. Staphylococcus aureus determinants for nasal colonization. Trends Microbiol 20:243-250.

21. Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O'Keeffe KM, Walsh EJ, Foster TJ, McLoughlin RM. 2012. Nasal colonisation by Staphylococcus aureus depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin. PLoS Pathog 8:e1003092.

22. Clarke SR, Wiltshire MD, Foster SJ. 2004. IsdA of Staphylococcus aureus is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. Mol Microbiol 51:1509-1519.

23. Mazmanian SK, Skaar EP, Gaspar AH, Humayun M, Gornicki P, Jelenska J, Joachmiak A, Missiakas DM, Schneewind O. 2003. Passage of heme-iron across the envelope of Staphylococcus aureus. Science 299:906-909.

24. Clarke SR, Foster SJ. 2008. IsdA protects Staphylococcus aureus against the bactericidal protease activity of apolactoferrin. Infect Immun 76:1518-1526.

25. Conrady DG, Brescia CC, Horii K, Weiss AA, Hassett DJ, Herr AB. 2008. A zinc-dependent adhesion molecule is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. Proc Nat Acad Sci USA 105:19455-19460.

26. Roche FM, Meehan M, Foster TJ. 2003. The Staphylococcus aureus surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. Microbiology 149:2759-2767.

27. Baur S, Rautenberg M, Faulstich M, Grau T, Severin Y, Unger C, Hoffmann WH, Rudel T, Autenrieth IB, Weidenmaier C. 2014. A nasal epithelial receptor for Staphylococcus

aureus WTA governs adhesion to epithelial cells and modulates nasal colonization. PLoS Pathog 10:e1004089.

28. Winstel V, Kühner P, Salomon F, Larsen J, Skov R, Hoffmann W, Peschel A, Weidenmaier C. 2015. Wall teichoic acid glycosylation governs Staphylococcus aureus nasal colonization. mBio 6:e00632-00615.

29. Forsgren A. 1970. Significance of protein A production by staphylococci. Infect Immun 2:672-673.

30. Burian M, Wolz C, Goerke C. 2010. Regulatory adaptation of Staphylococcus aureus during nasal colonization of humans. PLoS One 5:e10040.

31. Jenkins A, Diep BA, Mai TT, Vo NH, Warrener P, Suzich J, Stover CK, Sellman BR. 2015. Differential expression and roles of Staphylococcus aureus virulence determinants during colonization and disease. mBio 6:e02272-02214.

32. Votintseva AA, Fung R, Miller RR, Knox K, Godwin H, Wyllie DH, Bowden R, Crook DW, Walker AS. 2014. Prevalence of Staphylococcus aureus protein A (spa) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire. BMC Microbiol 14:63.

33. Kim HK, Falugi F, Missiakas D, Schneewind O. 2016. Peptidoglycan-linked protein A promotes T-cell dependent antibody expansion during Staphylococcus aureus infection. Proc Natl Acad Sci USA 113:5718-5723.

34. Cole AL, Muthukrishnan G, Chong C, Beavis A, Eade CR, Wood MP, Deichen MG, Cole AM. 2016. Host innate inflammatory factors and staphylococcal protein A influence the duration of human Staphylococcus aureus nasal carriage. Mucosal Immunol EPub ahead of press.

35. Hong X, Qin J, Li T, Dai Y, Wang Y, Liu Q, He L, Lu H, Gao Q, Lin Y, Li M. 2016. Staphylococcal protein A promotes colonization and immune evasion of the epidemic healthcare-associated MRSA ST239. Front Microbiol 7:951.

36. Holtfreter S, Radcliff FJ, Grumann D, Read H, Johnson S, Monecke S, Ritchie S, Clow F, Goerke C, Bröker BM, Fraser JD, Wiles S. 2013. Characterization of a mouse-adapted Staphylococcus aureus strain. PLoS One 8:e71142.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

49. Hersh AL, Chambers HF, Maselli JH, Gonzales R. 2008. National trends in ambulatory visits and antibiotic prescribing for skin and soft-tissue infections. Arch Intern Med 168:1585-1591.

50. Pallin DJ, Egan DJ, Pelletier AJ, Espinola JA, Hooper DC, Camargo CA, Jr. 2008. Increased US emergency department visits for skin and soft tissue infections, and changes in antibiotic choices, during the emergence of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Ann Emerg Med 51:291-298.

51. Edelsberg J, Taneja C, Zervos M, Haque N, Moore C, Reyes K, Spalding J, Jiang J, Oster G. 2009. Trends in US hospital admissions for skin and soft tissue infections. Emerg Infect Dis 15:1516-1518.

52. Lipsky BA, Kollef MH, Miller LG, Sun X, Johannes RS, Tabak YP. 2010. Predicting bacteremia among patients hospitalized for skin and skin-structure infections: derivation and validation of a risk score. Infect Control Hosp Epidemiol 31:828-837.

53. Carratalà J, Rosón B, Fernández-Sabé N, Shaw E, del Rio O, Rivera A, Gudiol F. 2003. Factors associated with complications and mortality in adult patients hospitalized for infectious cellulitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22:151-157.

54. Lucero CA, Hageman J, Zell ER, Bulens S, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Schaffner W, Fridkin SK. 2009. Evaluating the potential public health impact of a Staphylococcus aureus vaccine through use of population-based surveillance for invasive methicillin-resistant S. aureus disease in the United States. Vaccine 27:5061-5068.

55. Spellberg B, Daum RS. 2012. Development of a vaccine against Staphylococcus aureus. Semin Immunopathol 34:335-348.

56. Creech CB, Al-Zubeidi DN, Fritz SA. 2015. Prevention of recurrent staphylococcal skin infections. Infect Dis Clin North Am 29:429-464.

57. Fowler Jr. VG, Kong LK, Corey GR, Gottlieb GS, McClelland RS, Sexton DJ, Gesty-Palmer D, Harrell LJ. 1999. Recurrent Staphylococcus aureus bacteremia: pulsed-field gel electrophoresis findings in 29 patients. J Infect Dis 179:1157-1161.

58. Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA, van Keulen PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meester MH, Verbrugh HA. 2004. Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. Lancet 364:703-705.

59. Shinefield H, Black S, Fattom A, Horwith G, Rasgon S, Ordonez J, Yeoh H, Law D, Robbins JB, Schneerson R, Muenz L, Fuller S, Johnson J, Fireman B, Alcorn H, Naso R. 2002. Use of a Staphylococcus aureus conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. N Engl J Med 346:491-496.

60. Fowler VG, Allen KB, Moreira ED, Moustafa M, Isgro F, Boucher HW, Corey GR, Carmeli Y, Betts R, Hartzel JS, Chan IS, McNeely TB, Kartsonis NA, Guris D, Onorato MT, Smugar SS, DiNubile MJ, Sobanjo-ter Meulen A. 2013. Effect of an investigational vaccine for preventing Staphylococcus aureus infections after cardiothoracic surgery: a randomized trial. JAMA 309:1368-1378.

61. Fattom AI, Horwith G, Fuller S, Propst M, Naso R. 2004. Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against S. aureus infection: from the lab bench to phase III clinical trials. Vaccine 22:880-887.

62. Creech CB, Johnson BG, Alsentzer AR, Hohenboken M, Edwards KM, Talbot TR. 2009. Vaccination as infection control: a pilot study to determine the impact of Staphylococcus aureus vaccination on nasal carriage. Vaccine 28:256-260.

63. Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. 1969. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. J Exp Med 129:1385-1395.

64. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. 1969. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. J Exp Med 129:1307-1326.

65. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. 1969. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. J Exp Med 129:1327-1348.

66. Kim HK, Thammavongsa V, Schneewind O, Missiakas D. 2012. Recurrent infections and immune evasion strategies of Staphylococcus aureus. Curr Opin Microbiol 15:92-99.

67. Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O. 2015. Staphylococcal manipulation of host immune responses. Nat Rev Microbiol 13:529-543.

68. DeDent AC, McAdow M, Schneewind O. 2007. Distribution of protein A on the surface of Staphylococcus aureus. J Bacteriol 189:4473-4484.

69. Sjöquist J, Movitz J, Johansson I-B, Hjelm H. 1972. Localization of protein A in the bacteria. Eur J Biochem 30:190-194.

70. Schneewind O, Fowler A, Faull KF. 1995. Structure of the cell wall anchor of surface proteins in Staphylococcus aureus. Science 268:103-106.

71. Forsgren A. 1968. Protein A from Staphylococcus aureus. VI. Reaction with subunits from guinea pig γ1- and γ2-globulin. J Immunol 100:927-930.

72. Forsgren A, Quie PG. 1974. Effects of staphylococcal protein A on heat labile opsonins. J Immunol 112:1177-1180.

73. Goodyear CS, Silverman GJ. 2003. Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a staphylococcal toxin. J Exp Med 197:1125-1139.

74. Silverman GJ, Goodyear CS. 2006. Confounding B-cell defences: lessons from a staphylococcal superantigen. Nat Rev Immunol 6:465-475.

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

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

77. Mazmanian SK, Liu G, Jensen ER, Lenoy E, Schneewind O. 2000. Staphylococcus aureus mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. Proc Natl Acad Sci USA 97:5510-5515.

78. Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiaro J, Portoles M, Kiser KB, Risley A, Randall SM, Valtulina V, Speziale P, Walsh E, Foster T, Lee JC. 2006. Immunization with Staphylococcus aureus clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. Infect Immun 74:2145-2153.

79. Walsh EJ, O'Brien LM, Liang X, Hook M, Foster TJ. 2004. Clumping factor B, a fibrinogen-binding MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) adhesin of Staphylococcus aureus, also binds to the tail region of type I cytokeratin 10. J Biol Chem 279:50691-50699.

80. Ní Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök M, Foster TJ. 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of Staphylococcus aureus. Mol Microbiol 30:245-257.

81. Clarke SR, Brummell KJ, Horsburgh MJ, McDowell PW, Mohamad SA, Stapleton MR, Acevedo J, Read RC, Day NP, Peacock SJ, Mond JJ, Kokai-Kun JF, Foster SJ. 2006.

Identification of in vivo-expressed antigens of Staphylococcus aureus and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. J Infect Dis 193:1098-1108.

82. Viana D, Blanco J, Tormo-Más MA, Selva L, Guinane CM, Baselga R, Corpa JM, Lasa I, Novick RP, Fitzgerald JR, Penadés JR. 2010. Adaptation of Staphylococcus aureus to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. Mol Microbiol 77:1583-1594.

83. Cheng AG, DeDent AC, Schneewind O, Missiakas DM. 2011. A play in four acts: Staphylococcus aureus abscess formation. Trends Microbiol 19:225-232.

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

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

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

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

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

99. Prevaes SM, van Wamel WJ, de Vogel CP, Veenhoven RH, van Gils EJ, van Belkum A, Sanders EA, Bogaert D.2012. Nasopharyngeal colonization elicits antibody responses to staphylococcal and pneumococcal proteins that are not associated with a reduced risk of subsequent carriage. Infect Immun 80:2186-2193.

100. Lowy FD. 1998. Staphylococcus aureus infections. New Engl J Med 339:520-532.

101. Harrison KJ. 1963. Clinical trial of coagulase and alpha-hemolysin toxoids in chronic furunculosis. Br Med J 2:149-152.

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

103. Mazmanian SK, Ton-That H, Schneewind O. 2001. Sortase-catalyzed anchoring of surface proteins to the cell wall of Staphylococcus aureus. Mol Microbiol 40:1049-1057.

104. DeDent AC, McAdow M, Schneewind O. 2007. Distribution of protein A on the surface of Staphylococcus aureus. J Bacteriol 189:4473-4484.

105. Schneewind O, Model P, Fischetti VA. 1992. Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. Cell 70:267-281.

106. Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O.1999. Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. Science 285:760-763.

107. Ton-That H, Liu G, Mazmanian SK, Faull KF, Schneewind O. 1999. Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of Staphylococcus aureus at the LPXTG motif. Proc Natl Acad Sci USA 96:12424-12429.

108. Yu W, Missiakas D, Schneewind O.2018. Septal secretion of protein A in Staphylococcus aureus requires SecA and lipoteichoic acid synthesis. Elife 7:e34092.

109. Perry AM, Ton-That H, Mazmanian SK, Schneewind O.2002. Anchoring of surface proteins to the cell wall of Staphylococcus aureus. III. Lipid II is an in vivo peptidoglycan substrate for sortase-catalyzed surface protein anchoring. J Biol Chem 277:16241-16248.

110. Frankel MB, Hendrickx AP, Missiakas DM, Schneewind O. 2011. LytN, a murein hydrolase in the cross-wall compartment of Staphylococcus aureus, is involved in proper bacterial growth and envelope assembly. J Biol Chem 286:32593-32605.

111. Frankel MB, Schneewind O.2012. Determinants of murein hydrolase targeting to cross-wall of Staphylococcus aureus peptidoglycan. J Biol Chem 287:10460-10471.

112. Forsgren A, Sjöquist J.1966. Protein A from S. aureus. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. J Immunol 97:822-827.

113. van Loghem E, Frangione B, Recht B, Franklin EC.1982. Staphylococcal protein A and human IgG subclasses and allotypes. Scand J Immunol 15:275-278.

114. Duhamel RC, Schur PH, Brendel K, Meezan E.1979. pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-sepharose. J Immunol Meth 31:211.

115. Kronvall G, Williams RC, Jr. .1969. Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. J Immunol 103:828.

116. Skvaril F.1976. The question of specificity in binding human IgG subclasses to protein A-sepharose. Immunochemistry 13:871.

117. Forsgren A, Nordström K.1974. Protein A from Staphylococcus aureus: the biological significance of its interaction with IgG. Ann N Y Acad Sci 236:252-266.

118. Sasso EH, Silverman GJ, Mannik M.1989. Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain VHIII H chains. J Immunol 142:2778-2783.

119. Brunda MJ, Minden P, Grey HM.1979. Heterogeneity of binding human IgA subclasses to protein A. J Immunol 123:1457.

120. Grov A.1975. Antigenicity of human IgM in relation to interaction with staphylococcal protein A. Acta path microbiol scand Sect C 83:325.

121. Grov A.1976. Human colostral IgA interacting with staphylococcal protein A. Acta path microbiol scand Sect C 84:71.

122. van Kamp GJ.1979. J. Immunol. Meth. IgA contamination of IgG prepared on a protein A column 27:301.

123. Lind I, Harboe M, Foiling I.1975. Protein A reactivity of two distinct groups of human monoclonal IgM. Scand J Immunol 4:843.

124. van Loghem E, Natvig JB, Matsumoto H.1970. Genetic markers of immunoglobulins in Japanese families. Inheritance of associated markers belonging to one IgA and three IgG subclasses. Ann Human Genet Lond 33:351.

125. van Loghem E, Salimonu L, Williams AIO, Osunkoya BO, Boyd AM, de Lange G, Nijenhuis LE.1978. Immunoglobulin alloytpes in African populations. Gm-Am haplotypes in a Nigerian population. J Immunogenet 5:143.

126. Patrick CC, Virella G, Koistinen J, Fudenberg HH.1977. Differential binding of IgA proteins of different subclasses and allotypes to staphylococcal protein A. Z Immunitactsforsch 153:466.

127. Hillson JL, Karr NS, Opplinger IR, Mannik M, Sasso EH.1993. The structural basis of germline-encoded VH3 immunoglobulin binding to staphylococcal protein A. J Exp Med 178:331-336.

128. Roben PW, Salem AN, Silverman GJ.1995. VH3 family antibodies bind domain D of staphylococcal protein A. J Immunol 154:6437-6445.

129. Randen I, Potter KN, Li Y, Thompson KM, Pascual V, Førre O, Natvig JB, Capra JD.1993. Complementarity-determining region 2 is implicated in the binding of staphylococcal protein A to human immunoglobulin VHIII variable regions. Eur J Immunol 23:2682-2686.

130. Ljungberg UK, Jansson B, Niss U, Nilsson R, Sandberg BE, Nilsson B.1993. The interaction between different domains of staphylococcal protein A and human polyclonal IgG, IgA, IgM and F(ab')2: separation of affinity from specificity. Mol Immunol 30:1279-1285.

131. Inganäs M, Johansson SG, Bennich HH.1980. Interaction of human polyclonal IgE and IgG from different species with protein A from Staphylococcus aureus: demonstration of protein-A-reactive sites located in the Fab'2 fragment of human IgG. Scand J Immunol 12:23-31.

132. Inganäs M.1981. Comparison of mechanisms of interaction between protein A from Staphylococcus aureus and human monoclonal IgG, IgA and IgM in relation to the classical FC gamma and the alternative F(ab')2 epsilon protein A interactions. Scand J Immunol 13:343-352.

133. Romagnani S, Giudizi M, Biagiotti R, Almerigogna F, Maggi E, Del Prete G, Ricci M.1981. Surface immunoglobulins are involved in the interaction of protein A with human B cells and in the triggering of B cell proliferation induced by protein A-containing Staphylococcus aureus. J Immunol 127:1307-1313.

134. Vidal MA, Bernabeu C, Conde FP.1982. Binding of human immunoglobulin M to Staphylococcus aureus bearing protein A. Immunol Lett 4:311-315.

135. Lindmark R, Thorén-Tolling K, Sjöquist J.1983. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. J Immunol Meth 62:1-13.

136. Peterson PK, Verhoef J, Sabath LD, Quie PG.1977. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. Infect Immun 15:760-764.

137. Laky M, Sjöquist J, Moraru I, Gheţie V.1985. Mutual inhibition of the binding of Clq and protein A to rabbit IgG immune complexes. Mol Immunol 22:1297-1302.

138. Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier JB, Silverman GJ.2000. Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab

fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. Proc Nat Acad Sci USA 97:5399-5404.

139. Forsgren A, Svedjelund A, Wigzell H.1976. Lymphocyte stimulation by protein A of Staphylococcus aureus. Eur J Immunol 6:207-213.

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

141. Gustafson GT, Sjöquist J, Stålenheim G.1967. Protein A from Staphylococcus aureus. II. Arthus-like reaction produced in rabbits by interaction of protein A and human gamma-globulin. J Immunol 98:1178-1181.

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

143. Ballow C, Leh A, Slentz-Kesler K, Yan J, Haughey D, Bernton E.2013. Safety, pharmacokinetic, immunogenicity, and pharmacodynamic responses in healthy volunteers following a singlel intravenous injection of purififed staphylococcal protein A. J Clin Pharmacol 53:909-918.

144. Goldwater R, Garner R, Zamfirov V, Haughey D, Bernton E.2007. PK/PDrelationships in a sequential, escalating, single- dose study of PRTX- 100, a highly purified staphylococcal protein A. J Clin Pharmacol 47:1204.

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

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

147. Minakuchi K, Murata D, Okubo Y, Nakano Y, Yoshida S.2013. Remarkable alkaline stability of an engineered protein A as immunoglobulin affinity ligand: C domain having only one amino acid substitution. Protein Sci 22:1230-1238.

148. Jansson B, Uhlén M, Nygren PA.1998. All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding. FEMS Immunol Med Microbiol 20:69-78.

149. Yoshida S, Murata D, Taira S, Iguchi K, Takano M, Nakano Y, Minakuchi K.2012. Rational design and engineering of protein A to obtain the controlled elution profile in monoclonal antibody purification. Chem-Bio Informatics Journal 12:1-13.

150. Nilsson B, Moks T, Jansson B, Abrahmsén L, Elmblad A, Holmgren E, Henrichson C, Jones TA, Uhlén M.1987. A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. Protein Eng 1:107-113.

151. Gulich S, Uhlen M, Hober S.2000. Protein engineering of an IgG-binding domain allows milder elution conditions during affinity chromatography. J Biotechnol 76:233-244.

152. Ghose S, Allen M, Hubbard B, Brooks CP, Cramer SM.2005. Antibody variable region interactions with proteinA: implications for the development of generic purification processes. Biotechnol Bioengin 92:665-673.

153. Svensson HG, Hoogenboom HR, Sjobring U.1998. Protein LA, a novel hybrid protein with unique single-chain Fv antibody and Fab-binding properties. Eur J Biochem 258:890-896.

154. Deisenhofer J.1981. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-A resolution. Biochemistry 20:2361-2370.

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

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

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полипептид, содержащий вариант белка A (SpA), имеющий (i) замены лизина остатками глутамина в положениях 9 и 10 домена D, а также в положениях, которые соответствуют положениям 9 и 10 домена D, в каждом из доменов A-C и E, и (ii) замену 10 400 руб глутамата в положении 33 домена D, а также в положении, которое соответствует положению 33 домена D, в каждом из доменов A-C и E, где полипептид, относительно отрицательного контроля, не приводит к детектируемой перекрестной сшивке IgG и IgE с указанным полипептидом в крови или не активирует базофилы или тучные клетки.

2. Выделенный полипептид, содержащий вариант белка A (SpA), имеющий (i) замены лизина остатками глутамина в положениях 9 и 10 домена D, а также в положениях, которые соответствуют положениям 9 и 10 домена D, в каждом из доменов A-C и E, и (ii) замены треонина в положении 33 домена D, а также в положении, которое соответствует положению 33 домена D, в каждом из доменов A-C и E, где полипептид, относительно отрицательного контроля, не приводит к детектируемой перекрестной сшивке IgG и IgE с указанным полипептидом в крови или не активирует базофилы или тучные клетки.

3. Выделенный полипептид по п.1 или 2, где:

(A) аффинность связывания KA для VH3 из IgG человека снижена по сравнению с вариантом SpA, состоящим из замен лизина остатками глутамина в каждом из доменов A-E, соответствующих положению 9 и 10 в домене D, и замен аланина аспарагиновой кислотой в доменах A-E, соответствующих положению 36 и 37 домена D (SpAKKAA); и/или

(B) выделенный полипептид имеет аффинность связывания KA для VH3 из IgG человека, сниженную по меньшей мере в 2 раза по сравнению с SpAKKAA; и/или

(C) выделенный полипептид имеет аффинность связывания KA для VH3 из IgG человека, составляющую менее 1×10^5 M^{-1}; и/или

(D) вариант SpA не имеет замен в любом из доменов A-E, соответствующих положению 36 и 37 в домене D; и/или

(E) единственными заменами в варианте SpA являются (i) и (ii); и/или выделенный полипептид состоит из варианта SpA.

4. Композиция для обеспечения иммунного ответа против Staphylococcus у пациента-человека, содержащая

(A) выделенный полипептид по любому из предшествующих пунктов,

(B) адъювант и/или

(C) фармацевтически приемлемый эксципиент,

где композиция содержит менее 1% по массе общего количества белка полипептида, отличного от выделенного полипептида

5. Композиция по п.4, где выделенный полипептид связан с адъювантом; и/или где адъювант содержит алюмокалиевые квасцы.

6. Применение композиции по п.4 для вызывания безопасного иммунного ответа против бактерий

Staphylococcus у пациента-человека, включающее введение пациенту-человеку эффективного количества указанной композиции.

7. Применение по п.6, где:

(A) бактерии Staphylococcus включают штамм WU1 или JSNZ Staphylococcus aureus; и/или

(B) бактерии Staphylococcus содержат изолят типа ST88 или любую другую бактерию Staphylococcus человека, адаптированную для животного; и/или

(C) пациент-человек:

(a) является педиатрическим пациентом, необязательно, где педиатрический пациент имеет возраст 2 года или менее; или

(b) имеет возраст 65 лет или более; и/или

(c) является медицинским работником; и/или

(D) выделенный полипептид из композиции вводят в четырех дозах, и где интервал между дозами составляет по меньшей мере четыре недели.

8. Выделенный полипептид, содержащий вариант белка A (SpA), имеющий (i) замены лизина остатками глутамина в положениях 9 и 10 домена D, а также в положениях, соответствующих положениям 9 и 10, в каждом из доменов A-C и E и (ii) по меньшей мере одну другую замену аминокислоты, соответствующую положению 29 и/или 33 в SEQ ID NO: 2, в каждом из доменов A-E, где вариант SpA имеет аффинность связывания KD для VH3 из IgG человека, составляющую более $1,0\times10^{-4}$ M, и/или аффинность связывания KD для VH3 из IgE человека, составляющую более $1,0\times10^{-6}$ M.

9. Выделенный полипептид по п.8, где:

(A) вариант SpA содержит:

(a) замену аминокислоты, соответствующую положению 29 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E; или

(b) замену аминокислоты, соответствующую положению 33 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E; или

(c) замену аминокислоты, соответствующую положениям 29 и 33 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E; и/или

(B) вариант SpA содержит замену аминокислоты, соответствующую одному или обоим положениям 36 и 37 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E, необязательно, где вариант SpA содержит замены аминокислот, соответствующие обоим положениям 36 и 37 SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E, дополнительно необязательно, где замены аминокислот, соответствующие положениям 36 и 37, представляют собой замены остатков аланина остатками аспарагиновой кислоты; и/или

(C) вариант SpA содержит вариант доменов A-E, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, необязательно, где:

(a) вариант SpA содержит варианты доменов A-E, не содержащих какие-либо замены аминокислот в SEQ ID NO: 2, за исключением замен, соответствующих положениям 9, 10, 29, 33, 36 и/или 37; и/или

(b) вариант SpA содержит варианты доменов A-E, состоящие исключительно из замен аминокислот, соответствующих:

(I) положениям 9, 10 и 29 в SEQ ID NO: 2; или

(II) положениям 9, 10 и 33 в SEQ ID NO: 2; или

(III) положениям 9, 10, 29 и 33 в SEQ ID NO: 2; или

(IV) положениям 9, 10, 29, 36 и 37 в SEQ ID NO: 2; или

(V) положениям 9, 10, 33, 36 и 37 в SEQ ID NO: 2; или

(VI) положениям 9, 10, 29, 33, 36 и 37 в SEQ ID NO: 2; и/или

(D) замена аминокислоты, соответствующая:

(a) положению 29, представляет собой аланин, лейцин, пролин, фенилаланин, глутаминовую кислоту, аргинин, лизин, серин, треонин или глутамин, необязательно, где замена аминокислоты, соответствующая положению 29, представляет собой аланин, фенилаланин или аргинин; или

(b) положению 33, представляет собой аланин, фенилаланин, глутаминовую кислоту, лизин или глутамин; или

(c) положению 33, представляет собой фенилаланин, глутаминовую кислоту или глутамин; и/или

(E) вариант SpA имеет аффинность связывания KD для VH3, составляющую более $1,0\times10^{-2}$ M; и/или

(F) выделенный полипептид дополнительно содержит сегмент не-белка A, необязательно, где сегмент не-белка A является сегментом второго антигена; дополнительно необязательно, где сегмент второго антигена является сегментом стафилококкового антигена, дополнительно необязательно, где сегмент стафилококкового антигена представляет собой сегмент Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB и/или SasF.

10. Композиция для стимуляции иммунного ответа против бактерии Staphylococcus у нуждающегося в этом индивидуума, содержащая

(a) выделенный полипептид по п.8 или 9,

(b) адъювант и/или

(c) фармацевтически приемлемый эксципиент,

где композиция содержит менее 1% по массе общего количества белка полипептида, отличного от выделенного полипептида.

11. Композиция по п.10, где выделенный полипептид связан с адъювантом, где адъювант необязательно содержит алюмокалиевые квасцы.

12. Применение композиции по п.10 для профилактики или лечения стафилококковой инфекции, включающее стадию введения указанной композиции нуждающемуся в этом пациенту.

13. Применение выделенного полипептида по п.8 или 9 для профилактики или лечения стафилококковой инфекции, включающее стадию введения указанного выделенного полипептида нуждающемуся в этом пациенту.

14. Применение по п.12 или 13, где:

(A) бактерии Staphylococcus включают штамм WU1 или JSNZ Staphylococcus aureus; и/или

(B) бактерии Staphylococcus содержат изолят типа ST88 или любую другую бактерию Staphylococcus человека, адаптированную для животного; и/или

(C) пациент-человек:

(a) является педиатрическим пациентом, необязательно, где педиатрический пациент имеет возраст 2 года или менее; или

(b) имеет возраст 65 лет или более; и/или

(c) пациент-человек является медицинским работником; и/или

(D) выделенный полипептид или композицию вводят в четырех дозах, и где интервал между дозами составляет по меньшей мере четыре недели.

15. Применение композиции по п.10 для вызывания иммунного ответа против бактерии Staphylococcus у индивидуума, включающее введение индивидууму эффективного количества указанной композиции.

16. Применение выделенного полипептида по п.8 или 9 для вызывания иммунного ответа против бактерии Staphylococcus у индивидуума, включающее введение индивидууму эффективного количества указанного выделенного полипептида.

17. Применение по п.15 или 16, где

(A) индивидууму также вводят адъювант; и/или

(B) композиция содержит адъювант, необязательно, где вариант SpA связан с адъювантом, дополнительно необязательно, где адъювант содержит алюмокалиевые квасцы; и/или

(C) композицию составляют в фармацевтически приемлемой композиции; и/или

(D) бактерия Staphylococcus является бактерией S. aureus, необязательно, где бактерия Staphylococcus резистентна к одному или более способам лечения, дополнительно необязательно, где бактерия является метициллин-резистентной; и/или

(E) применение дополнительно включает введение индивидууму выделенного полипептида или композиции более одного раза; и/или

(F) композицию вводят перорально, парентерально, подкожно, внутримышечно или внутривенно; и/или

(G) применение дополнительно включает введение индивидууму композиции, содержащей второй стафилококковый антиген, необязательно, где второй стафилококковый антиген является одним или более из Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB и SasF, и/или

(H) индивидуум представляет собой млекопитающего, необязательно, где индивидуум является человеком; и/или

(I) иммунный ответ является протективным иммунным ответом; или

(J) у индивидуума не наблюдают какие-либо признаки токсичности от выделенного полипептида или композиции, необязательно, где у индивидуума не наблюдают какие-либо признаки анафилактического шока от выделенного полипептида или композиции; и/или

(K) бактерии Staphylococcus включают штамм WU1 или JSN4Z Staphylococcus aureus, и/или

(L) бактерии Staphylococcus содержат изолят типа ST88 или любую другую бактерию Staphylococcus человека, адаптированную для животного; и/или

(M) индивидуумом является пациент-человек и:

(a) является педиатрическим пациентом, необязательно, где педиатрический пациент имеет возраст 2 года или менее; или

(b) имеет возраст 65 лет или более; и/или

(c) является медицинским работником; и/или

(N) выделенный полипептид или композицию вводят в четырех дозах, и где интервал между дозами составляет по меньшей мере четыре недели.

18. Применение композиции для лечения стафилококковой инфекции у индивидуума, где компози-

ция включает выделенный полипептид, содержащий вариант белка A (SpA), имеющий (i) замены лизина остатками глутамина в положениях 9 и 10 домена D, а также в положениях, которые соответствуют положениям 9 и 10 домена D, в каждом из доменов A-C и E и (ii) по меньшей мере одну другую замену аминокислоты, соответствующую положению 29 и/или 33 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E, где вариант SpA имеет аффинность связывания KD для IgG, составляющую более $1,0\times10^{-5}$ M, где применение включает введение индивидууму, имеющему, как предполагают, имеющему или имеющему риск развития стафилококковой инфекции, эффективного количества композиции.

19. Применение по п.18, где

(A) вариант SpA содержит замену аминокислоты, соответствующую положению 29 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E; или

(B) вариант SpA содержит замену аминокислоты, соответствующую положению 33 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E; или

(C) вариант SpA содержит замену аминокислоты, соответствующую положениям 29 и 33 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E; и/или

(D) вариант SpA содержит замену аминокислоты, соответствующую одному или обоим из положений 36 и 37 в SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E, необязательно, где вариант SpA содержит замены аминокислот, соответствующие обоим положениям 36 и 37 SEQ ID NO: 2 в каждом из доменов A-E; и/или, где замены аминокислот, соответствующие положениям 36 и 37, представляют собой замены остатков аланина остатками аспарагиновой кислоты; и/или

(E) вариант SpA содержит вариант доменов A-E, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере 90% идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, необязательно, где

(a) вариант SpA содержит вариант доменов A-E, не содержащий какие-либо замены аминокислот в SEQ ID NO: 2, за исключением замен, соответствующих положениям 9, 10, 29, 33, 36 и/или 37; и/или

(b) вариант SpA содержит варианты доменов A-E, состоящие исключительно из замен аминокислот, соответствующих:

(I) положениям 9, 10 и 29 в SEQ ID NO: 2; или

(II) положениям 9, 10 и 33 в SEQ ID NO: 2; или

(III) положениям 9, 10, 29 и 33 в SEQ ID NO: 2; или

(IV) положениям 9, 10, 29, 36 и 37 в SEQ ID NO: 2; или

(V) положениям 9, 10, 33, 36 и 37 в SEQ ID NO: 2; или

(VI) положениям 9, 10, 29, 33, 36 и 37 в SEQ ID NO: 2; и/или

(F) замена аминокислоты, соответствующая:

(a) положению 29, представляет собой аланин, лейцин, пролин, фенилаланин, глутаминовую кислоту, аргинин, лизин, серин, треонин или глутамин, необязательно, где замена аминокислоты, соответствующая положению 29, представляет собой аланин, фенилаланин или аргинин; или

(b) положению 33, представляет собой аланин, фенилаланин, глутаминовую кислоту, лизин или глутамин; или

(c) положению 33, представляет собой фенилаланин, глутаминовую кислоту или глутамин; и/или

(G) вариант SpA имеет аффинность связывания KD для VH3, составляющую более $1,0\times10^{-2}$ M;

(H) сегмент не-белка A, необязательно, где сегмент не-белка A является сегментом второго антигена, дополнительно необязательно, где сегмент второго антигена является сегментом стафилококкового антигена; дополнительно необязательно, где сегмент стафилококкового антигена представляет собой сегмент Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB и/или SasF; и/или

(I) у индивидуума диагностирована персистирующая стафилококковая инфекция; и/или

(J) вариант SpA вызывает продукцию антитела, связывающегося с белком A, у индивидуума; и/или

(K) выделенный полипептид вводят с адъювантом, необязательно, где выделенный полипептид связан с адъювантом; и/или

(L) выделенный полипептид составляют в фармацевтически приемлемой композиции; и/или

(M) применение дополнительно включает введение второго стафилококкового антигена, необязательно, где:

(a) второй стафилококковый антиген вводят одновременно с выделенным полипептидом, необязательно, где второй стафилококковый антиген и выделенный полипептид вводят в одной композиции, дополнительно необязательно, где второй стафилококковый антиген слит с вариантом SpA; и/или

(b) второй стафилококковый антиген является одним или более из пептида Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB и SasF; и/или

(N) стафилококковая инфекция является инфекцией Staphylococcus aureus; и/или

(O) пептид вводят перорально, парентерально, трансдермально, чрезслизисто, подкожно, внутримышечно или посредством ингаляции; и/или

(P) применение дополнительно включает введение индивидууму выделенного полипептида более

одного раза; и/или

(Q) индивидуум:

(a) представляет собой млекопитающего, необязательно, где индивидуум является человеком; или

(b) не проявляет каких-либо признаков токсичности по причине выделенного полипептида или композиции, необязательно, где индивидуум не проявляет каких-либо признаков анафилактического шока по причине выделенного полипептида или композиции; и/или

(R) бактерии Staphylococcus включают штамм WU1 или JSN4Z Staphylococcus aureus; и/или

(S) бактерии Staphylococcus содержат изолят типа ST88 или любую другую бактерию Staphylococcus человека, адаптированную для животного; и/или

(T) индивидуум является пациентом-человеком, где пациент человек:

(a) является педиатрическим пациентом, необязательно, где педиатрический пациент имеет возраст 2 года или менее; или

(b) имеет возраст 65 лет или более; и/или

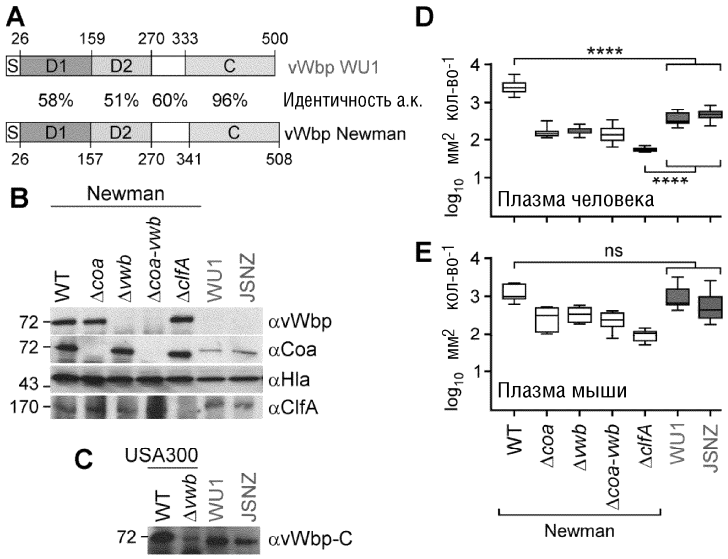
(c) является медицинским работником; и/или

(U) выделенный полипептид или композицию вводят в четырех дозах, и где интервал между дозами составляет по меньшей мере четыре недели.

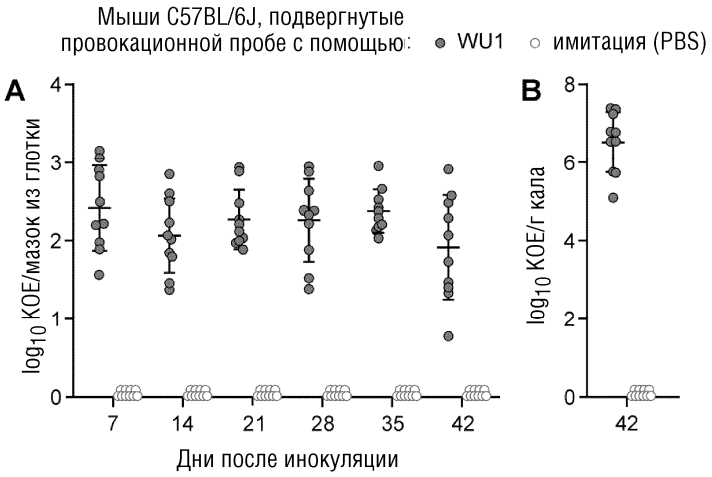
20. Применение композиции по п.10 для деколонизации, или профилактики колонизации, или реколонизации бактерий Staphylococcus у индивидуума посредством введения индивидууму эффективного количества указанной композиции.

21. Применение выделенного полипептида по п.8 или 9 для деколонизации, или профилактики колонизации, или реколонизации бактерий Staphylococcus у индивидуума посредством введения индивидууму эффективного количества указанного выделенного полипептида.

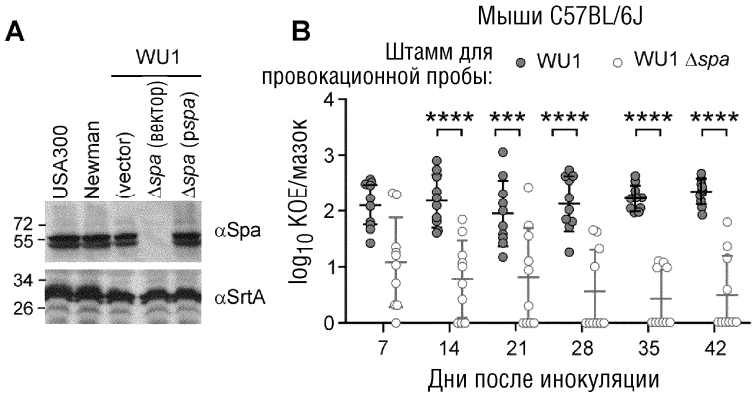
22. Выделенный полипептид, содержащий вариант белка A (SpA), имеющий (i) замены лизина остатками глутамина в положениях 9 и 10 домена D, а также в положениях, которые соответствуют положениям 9 и 10 домена D, в каждом из доменов A-C и E, и (ii) замену глутамата в положении 33 домена D, а также в положении, соответствующем положению 33 домена D, в каждом из доменов A-C и E, где полипептид, относительно отрицательного контроля, не приводит к детектируемой перекрестной сшивке IgG и IgE с указанным полипептидом в крови или не активирует базофилы или тучные клетки; где вариант SpA не имеет замены в любом из доменов A-E, соответствующие положениям 36 и 37 в домене D.



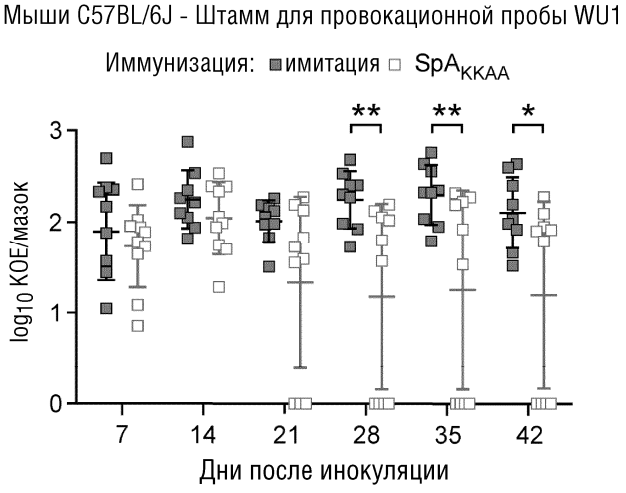
Фиг. 1A-E



Фиг. 2A, B

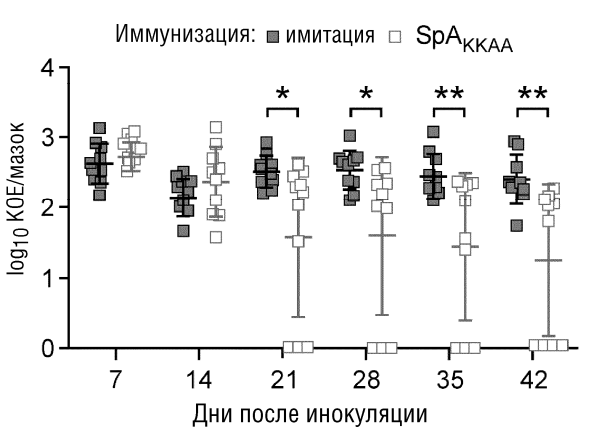


Фиг. 3A, B

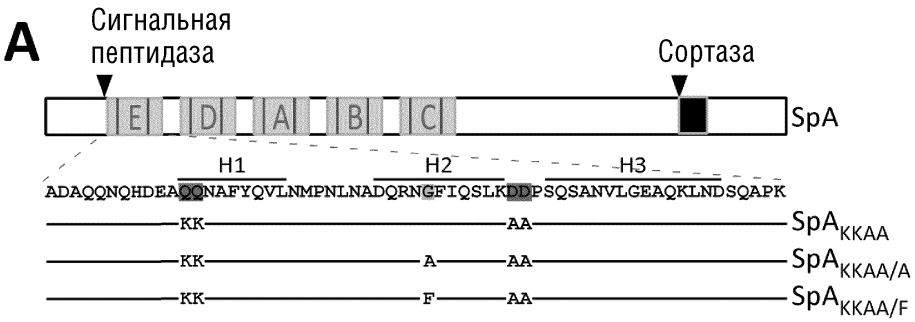


Фиг. 4

Фиг. 5



Фиг. 6



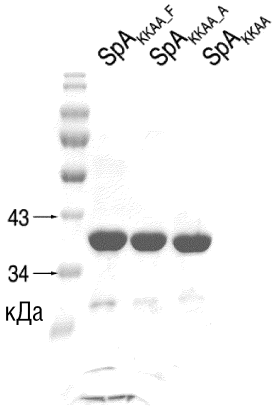
B

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

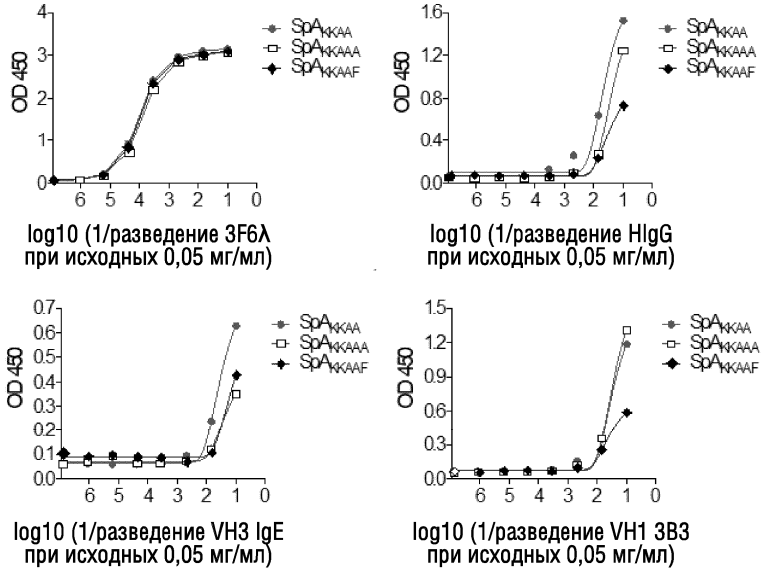
C

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

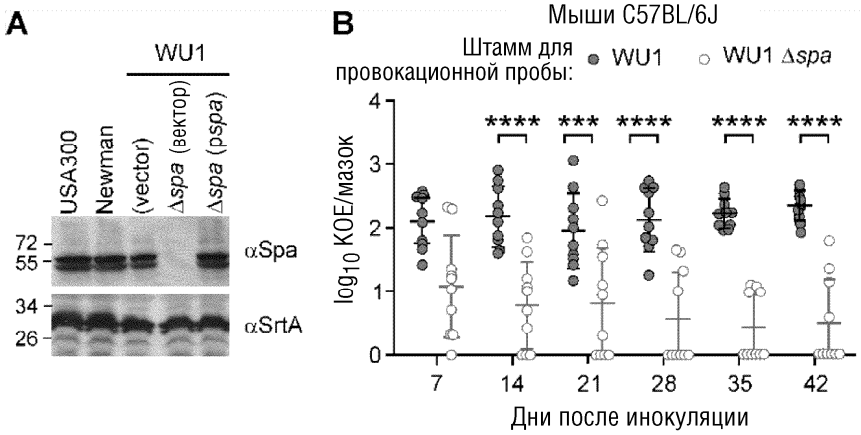
Фиг. 7A-C



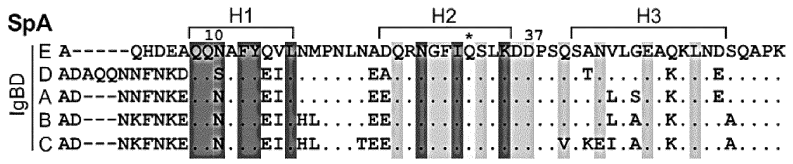
Фиг. 8A



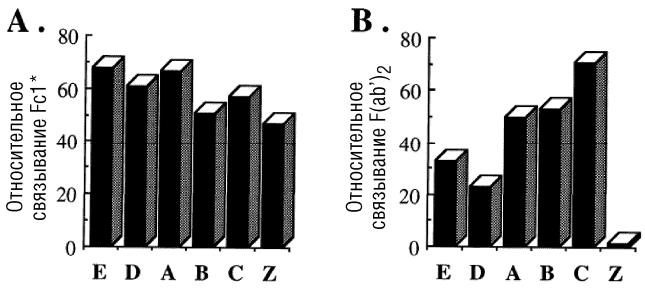
Фиг. 8B



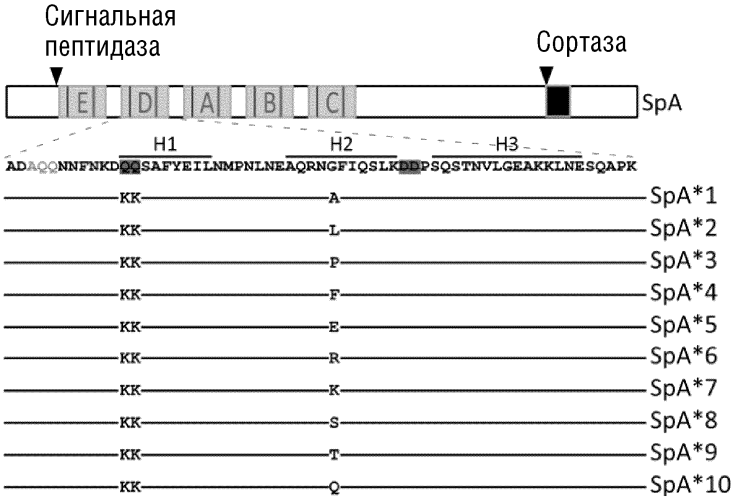
Фиг. 9A, B



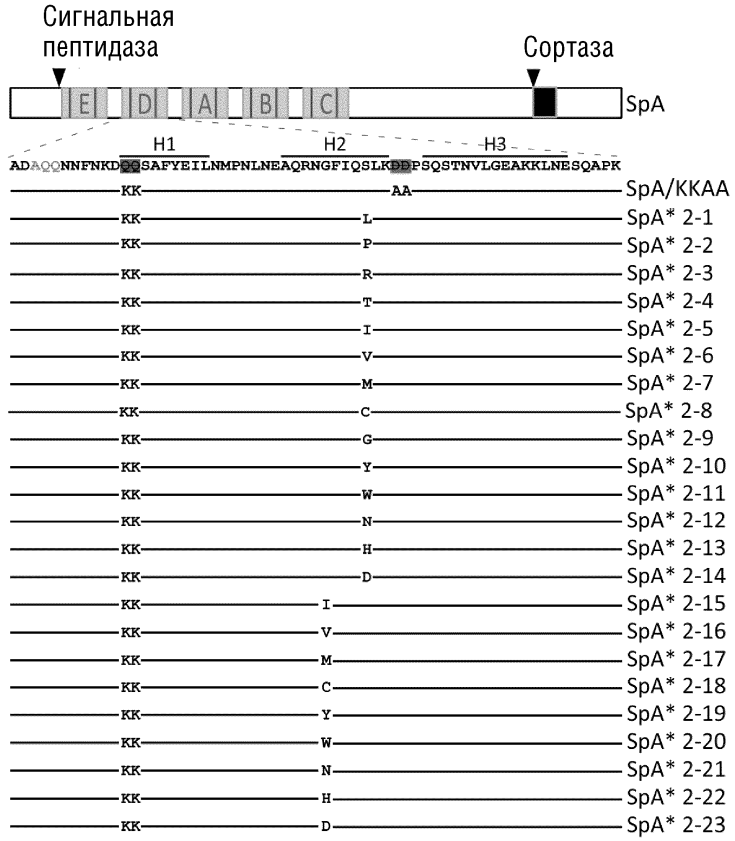
Фиг. 10



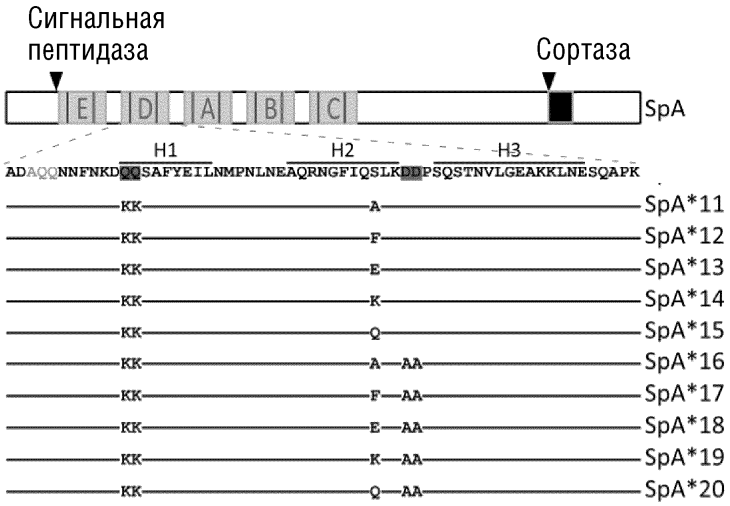
Фиг. 11



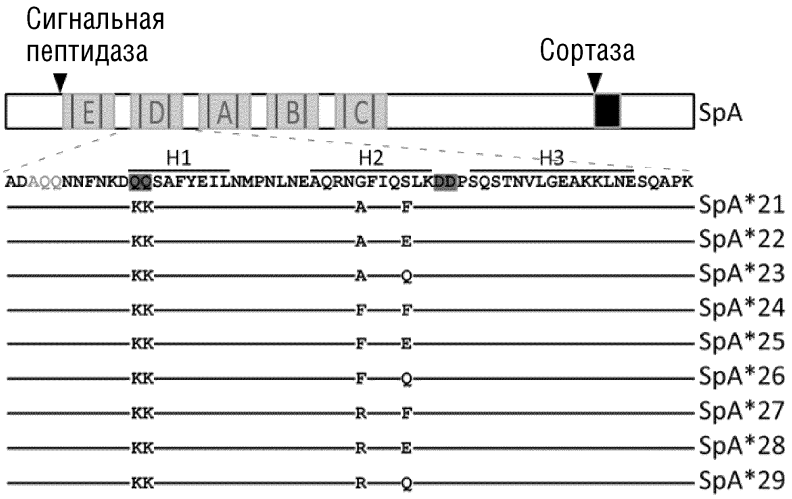
Фиг. 12A



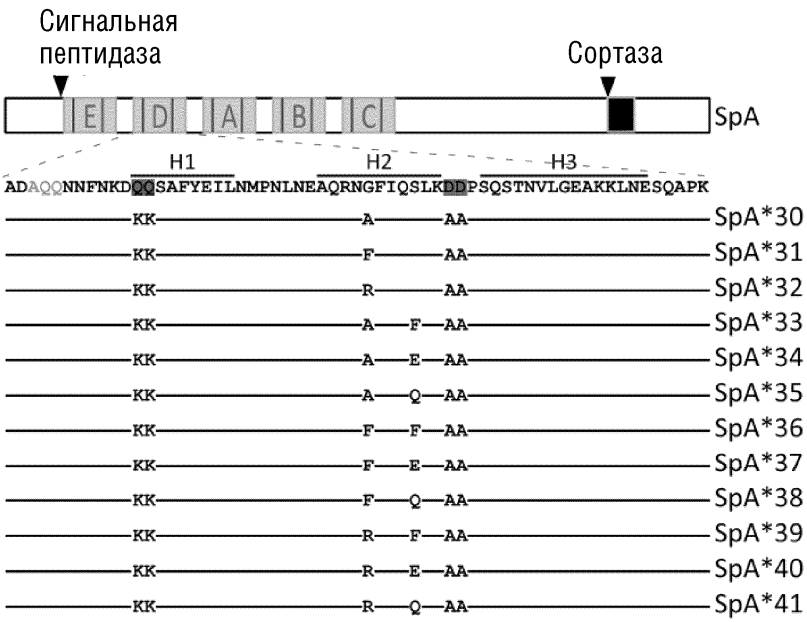
Фиг. 12B



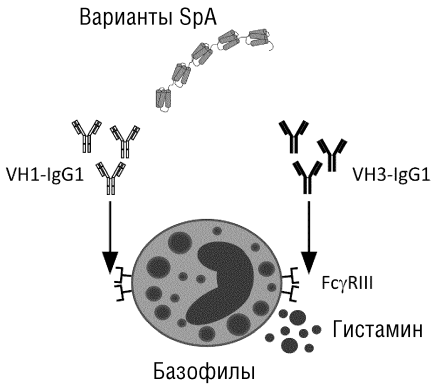
Фиг. 13



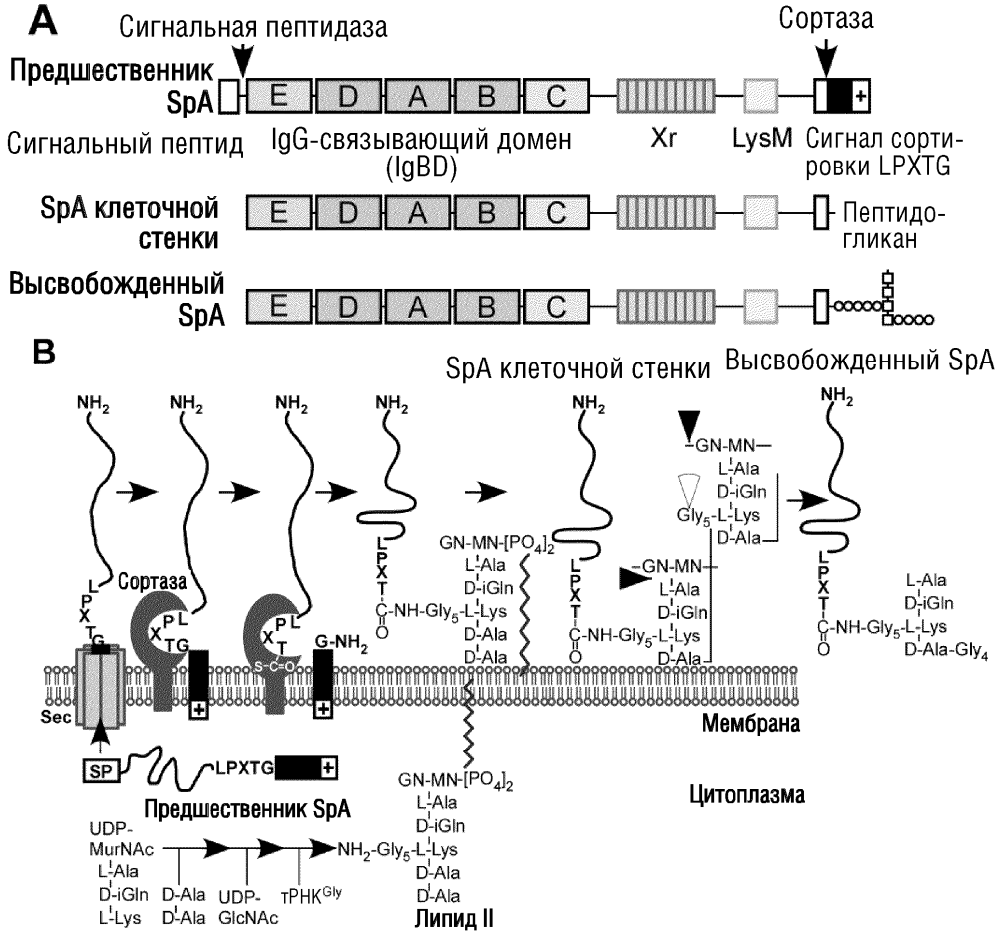
Фиг. 14



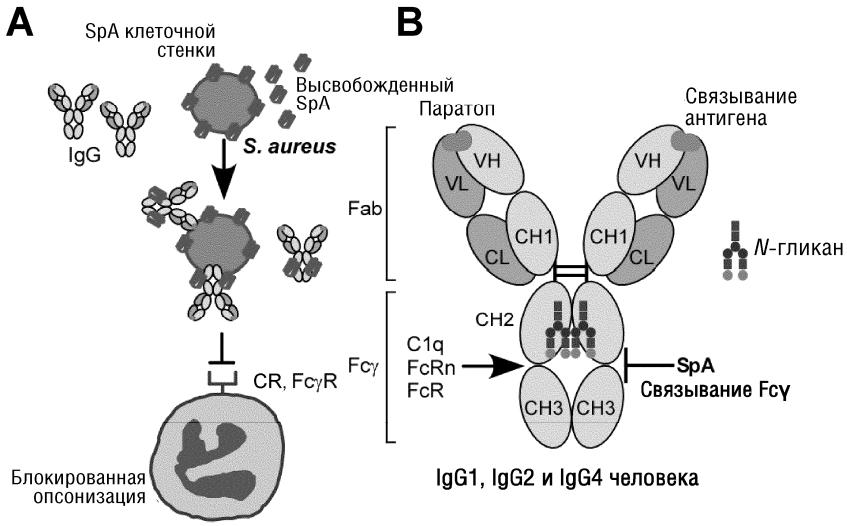
Фиг. 15



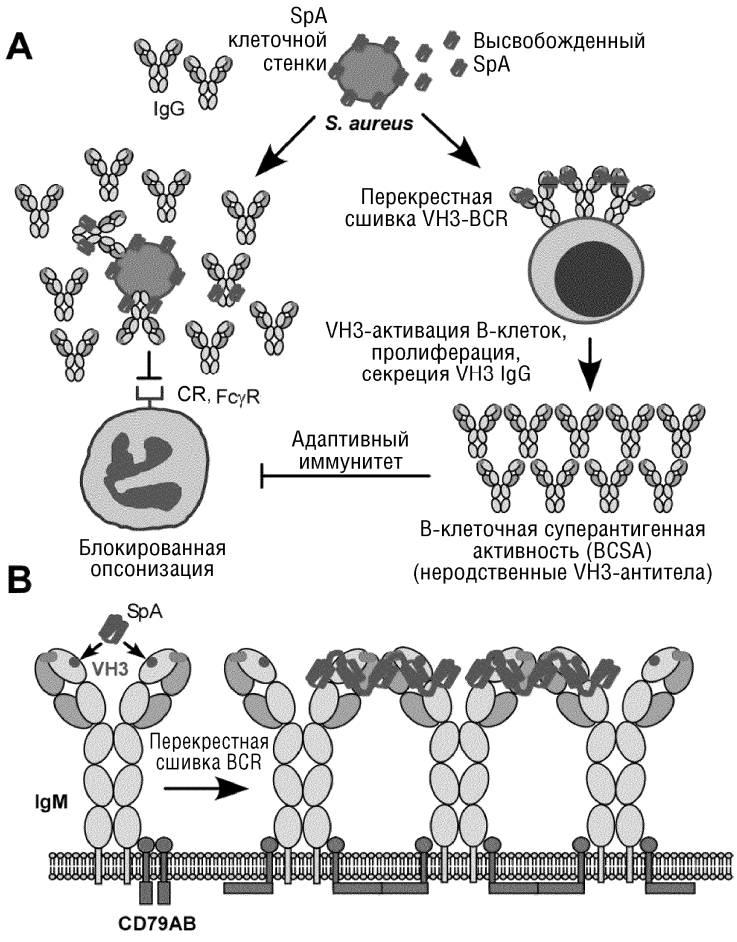
Фиг. 16



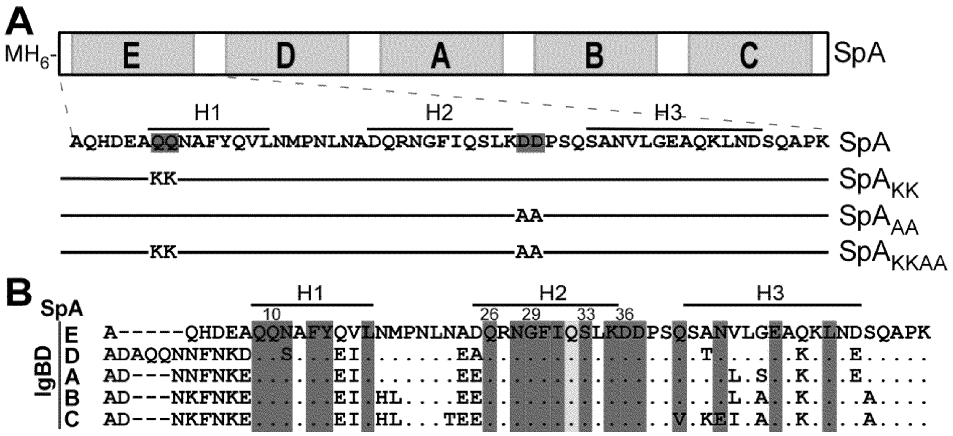
Фиг. 17A, B



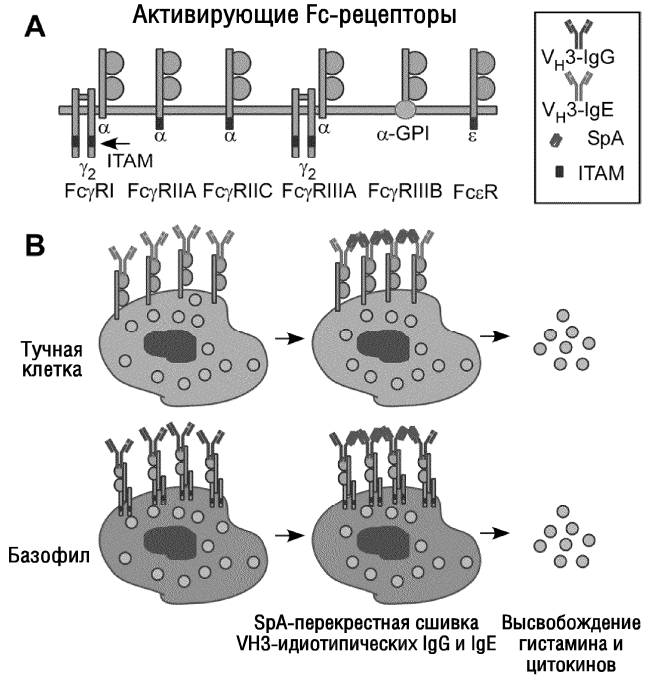
Фиг. 18A, B



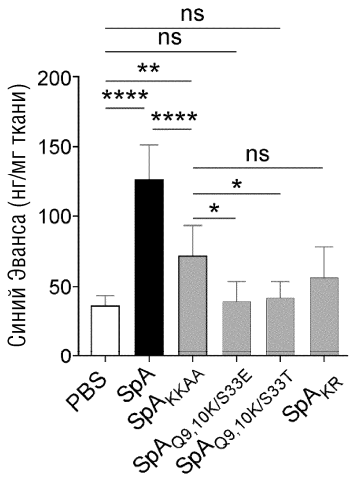
Фиг. 19A, B



Фиг. 20A, B

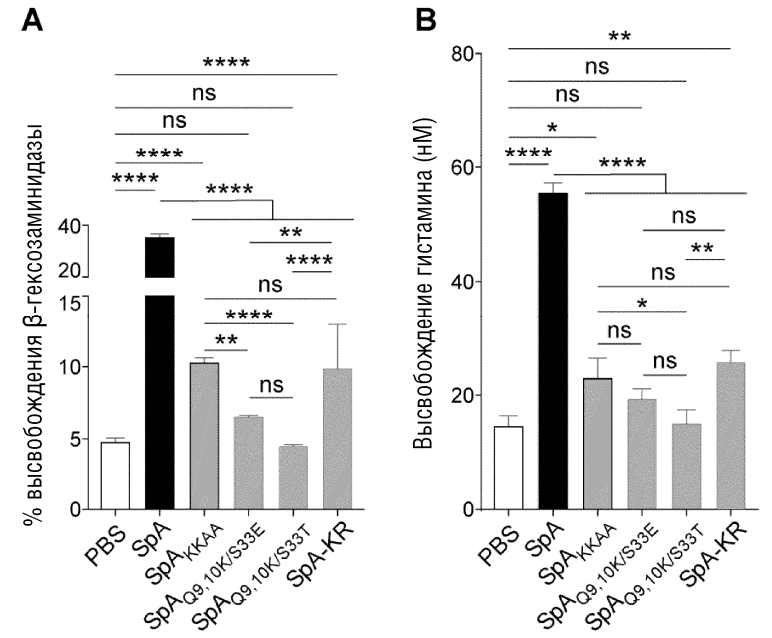


Фиг. 21A, B

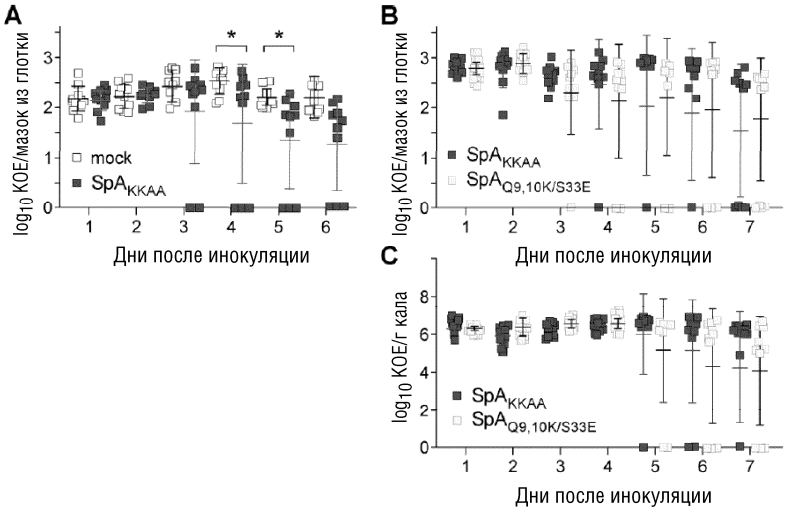


Мыши μMT возрастом 6 недель

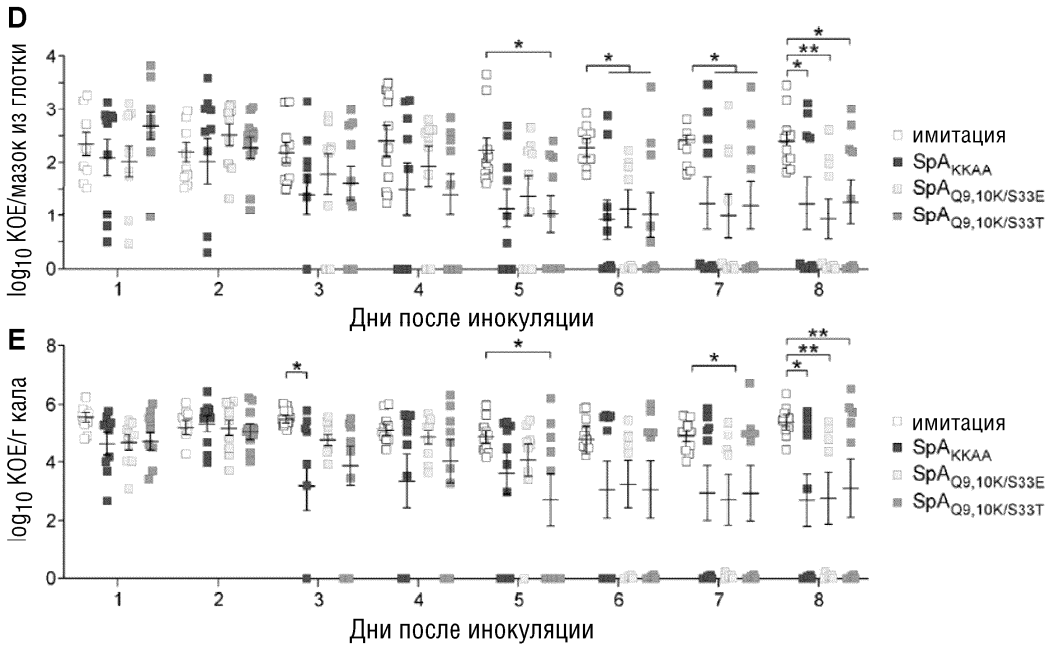
Фиг. 22



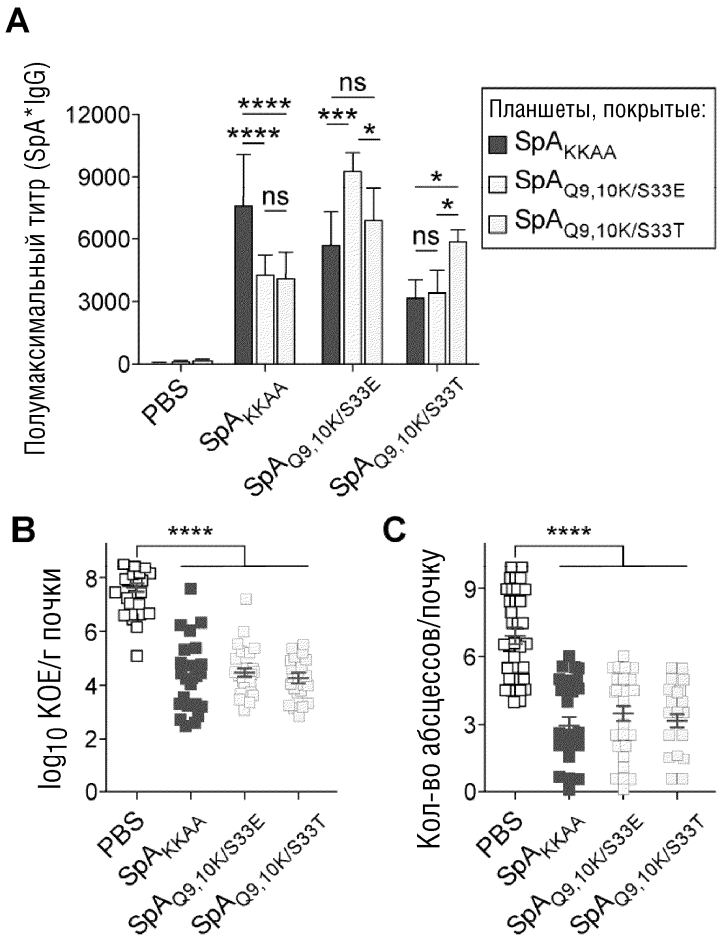
Фиг. 23A, B



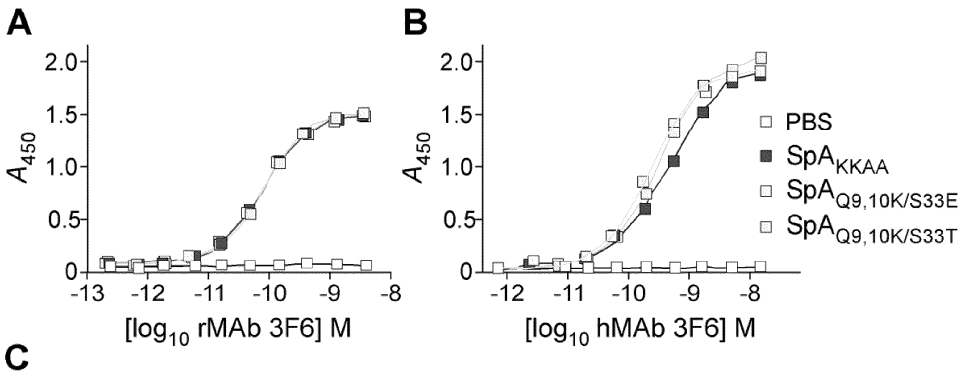
Фиг. 24A-C



Фиг. 24D, E



Фиг. 25A-C



C

K_A (x 10^{10}) M^{-1}	SpA$_{KKAA}$	SpA$_{Q9,10K/S33E}$	SpA$_{Q9,10K/S33T}$
rMAb 3F6	1.51	1.42	1.34
hMAb 3F6	4.99	9.82	7.96

Фиг. 26A-C