

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392715 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.12

(51) Int. Cl. *A61P 31/04* (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
A61K 39/085 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.31

(54) ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ПРОТИВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

(31) 63/170,089; 63/249,452

(32) 2021.04.02; 2021.09.28

(33) US

(86) PCT/US2022/022773

(87) WO 2022/212667 2022.10.06

(71) Заявитель:

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

(72) Изобретатель:

Морроу Брайан (US), Константинов
Сергей, Гёртсен Йерун (NL), Ло
Цзиньюань, Сомани Сандип, Бакли
Питер Т., Торрес Виктор Дж. (US),
Полман Ян Тёнис (NL)

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям для индуцирования иммунного ответа у субъекта для лечения и/или предупреждения инфекции, обусловленной *Staphylococcus aureus*. Раскрытые в данном документе иммуногенные композиции содержат полипептид белка A *S. aureus* (SpA) и вариант полипептида лейкоцидина A (LukA) и/или лейкоцидина B (LukB) *S. aureus*. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам обеспечения выработки иммунного ответа на *S. aureus* у субъекта, которые предусматривают введение раскрытых иммуногенных композиций.

A1

202392715

202392715

A1

ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ПРОТИВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

5 [0001] Данная заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки на патент США с серийным номером 63/170089, поданной 2 апреля 2021 года, и 63/249452, поданной 28 сентября 2021 года, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

10 [0002] Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям против *Staphylococcus aureus* и к применению описанных композиций для индуцирования иммунного ответа у субъекта для лечения и/или предупреждения инфекции, обусловленной *Staphylococcus*.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 [0003] *Staphylococcus aureus* вызывает широкий спектр инвазивных заболеваний, включая сепсис, инфекционный эндокардит и токсичный шок, а также менее тяжелые инфекции кожи и мягких тканей (Tong et al., «*Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management», *Clin. Microbiol. Rev.* 28(3):603-661 (2015)). В настоящее время отсутствует одобренная
20 вакцина против *S. aureus*, а варианты терапевтических средств дополнительно ограничены стремительно развивающейся резистентностью к антибиотикам (Sause et al., «Antibody-Based Biologics and Their Promise to Combat *Staphylococcus aureus* Infections», *Trends Pharmacol. Sci.* 37(3):231-241 (2016)). Способность *S. aureus* вызывать
25 разные клинические синдромы часто связывают со значительными изменениями в содержимом генома (Copin et al., «After the Deluge: Mining *Staphylococcus aureus* Genomic Data for Clinical Associations and Host-Pathogen Interactions», *Curr. Opin. Microbiol.* 41:43-50 (2018) и Recker et al., «Clonal Differences in *Staphylococcus aureus* Bacteraemia-Associated Mortality», *Nat. Microbiol.* 2(10):1381-1388 (2017)). Стоит
30 отметить, что приблизительно 40% генома не является общим для всех изолятов *S. aureus* (Bosi et al., «Comparative Genome-Scale Modelling of *Staphylococcus aureus* Strains Identifies Strain-Specific Metabolic Capabilities Linked to Pathogenicity», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113(26):E3801-3809 (2016)), что еще больше усложняет идентификацию консервативных мишеней для создания вакцин и биологических препаратов.

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

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 **[0005]** Первый аспект настоящего изобретения относится к иммуногенной композиции, содержащей (i) полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) и (ii) вариант полипептида лейкоцидина A (LukA) *Staphylococcus aureus*. В альтернативном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена комбинация двух или более композиций, которые совместно содержат (i) полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) и (ii) вариант полипептида лейкоцидина A (LukA) *Staphylococcus aureus*.

10 **[0006]** В одном аспекте вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

15 **[0007]** Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к иммуногенным композициям или комбинации двух или более иммуногенных композиций, содержащих вариант полипептида LukA, предусматривающий одну или более дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или добавлений к описанным выше.

20 **[0008]** Другой аспект настоящего изобретения относится к иммуногенным композициям или комбинации двух или более иммуногенных композиций, которые совместно содержат (i) полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA), (ii) вариант полипептида лейкоцидина A (LukA) *Staphylococcus aureus* и (iii) полипептид лейкоцидина B (LukB) *Staphylococcus aureus* или его вариант.

25 **[0009]** Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к иммуногенным композициям или комбинации двух или более иммуногенных композиций, содержащим одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид белка A *S. aureus* (SpA) или его вариант, вариант полипептида LukA и полипептид LukB или его вариант из иммуногенных композиций, описанных в данном документе.

30 **[0010]** Другой аспект настоящего изобретения относится к иммуногенной композиции или комбинации двух или более иммуногенных композиций, содержащим один или более векторов, содержащих одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид белка A *S. aureus* (SpA) или его

вариант, вариант полипептида LukA и полипептид LukB или его вариант из иммуногенных композиций, описанных в данном документе.

[0011] Другой аспект настоящего изобретения относится к иммуногенной композиции, содержащей клетку-хозяина, где клетка-хозяин содержит одну или более молекул нуклеиновой кислоты или векторов, описанных в данном документе.

[0012] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения или предупреждения стафилококковой инфекции у нуждающегося в этом субъекта. Способ предусматривает введение эффективного количества иммуногенной композиции или комбинации иммуногенных композиций, описанных в данном документе, субъекту в условиях, эффективных для лечения или предупреждения стафилококковой инфекции у указанного субъекта.

[0013] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу обеспечения развития иммунного ответа на *Staphylococcus aureus* у нуждающегося в этом субъекта. Способ предусматривает введение эффективного количества иммуногенной композиции или комбинации иммуногенных композиций, описанных в данном документе, субъекту в условиях, эффективных для обеспечения развития указанного иммунного ответа на *S. aureus* у указанного субъекта.

[0014] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу обеспечения деколонизации или предупреждения колонизации или повторной колонизации бактерией рода *Staphylococcus* у нуждающегося в этом субъекта. Способ предусматривает введение эффективного количества иммуногенной композиции или комбинации иммуногенных композиций, описанных в данном документе, субъекту в условиях, эффективных для обеспечения деколонизации или предупреждения колонизации или повторной колонизации бактерией рода *Staphylococcus* у указанного субъекта.

[0015] Другой аспект настоящего изобретения относится к применению иммуногенной композиции или комбинации иммуногенных композиций, описанных в данном документе, в способе обеспечения выработки иммунного ответа на *S. aureus* у субъекта.

[0016] *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) отвечает за большое количество внутрибольничных и внебольничных инфекций. Чтобы избежать клиренса, осуществляемого иммунной системой, *S. aureus* использует широкий спектр стратегий. Белок A *Staphylococcus* (SpA), поверхностный белок, является одним из ключевых факторов вирулентности *S. aureus*, который выполняет по меньшей мере две функции,

связанные с развитием инфекции. Во-первых, SpA, закоренный в клеточной стенке на поверхности бактерий, связывается с Fc γ -доменом IgG и блокирует эффекторные функции антител. Антитела неспецифически связываются «в перевернутом положении», тем самым защищая стафилококки от опсонофагоцитарного уничтожения (ОРК) иммунными клетками хозяина и предупреждая осуществление надлежащего клиренса. Во-вторых, SpA играет роль ключевого фактора уклонения от иммунологического надзора, который предупреждает развитие защитного иммунитета во время колонизации и инфицирования посредством *S. aureus*. Во время колонизации и инвазивного заболевания высвобождаемый SpA осуществляет перекрестное сшивание кодируемых V $\text{H}3$ рецепторов клональных В-клеток и запускает секрецию антител, неспецифичных к *S. aureus*, которые не способны распознавать стафилококковые детерминанты в качестве антигенов. Такая активность суперантигена в отношении В-клеток (т. е. V $\text{H}3$ -связывающая активность высвобождаемого SpA) отвечает за предупреждение развития защитного иммунитета против *S. aureus* во время колонизации или инвазивного заболевания. Применение варианта SpA в качестве вакцинного антигена, утратившего свою иммуноглобулинсвязывающую активность, индуцирует выработку специфических к SpA антител, которые (1) нейтрализуют его способность связывать IgG посредством Fc γ , (2) нейтрализуют его способность связывать IgG посредством тяжелых цепей V $\text{H}3$ -идиотипа и делают возможным развитие иммунитета к стафилококку, а также (3) индуцируют опсонофагоцитарный клиренс посредством связанного с поверхностью SpA.

[0017] Стафилококковые лейкоцидины А и В образуют двухкомпонентный токсин (LukAB), обладающий другим механизмом действия, способствующим инфекции, опосредованной *S. aureus*. LukAB представляет собой секретируемый токсин, который при связывании с фагоцитирующими клетками собирается в пору, внедряется в мембрану и лизирует клетку-хозяина. Это позволяет *S. aureus* избежать атаки нейтрофилов и избежать клиренса хозяином. Антитела, выработка которых была индуцирована иммунизацией анатоксином LukA, LukB или LukAB, нейтрализуют активность токсина LukAB, что приводит в результате к выживанию фагоцитирующих клеток, которые могут осуществлять очистку организма от *S. aureus*.

[0018] Иммуногенная композиция, содержащая комбинацию данных антигенов, т. е. SpA, LukA, LukB и LukAB, будет индуцировать выработку антител, которые нейтрализуют два фактора вирулентности *S. aureus* и предотвращают два независимых

ключевых механизма ускользания *S. aureus*, что делает эффективным антитело-опосредованный опсонофагоцитоз.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

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

[0020] На ФИГ. 2 представлено выравнивание четырнадцати разных аминокислотных последовательностей LukB *Staphylococcus aureus*, включая LukB из CC8 (SEQ ID NO: 15); CC45 (SEQ ID NO: 16); A9635 из CC45 (SEQ ID NO: 40); E1410 из CC30 (SEQ ID NO: 43); MRSA252 из CC30 (SEQ ID NO: 45); D139 из CC10 (SEQ ID NO: 42); Mu.50 из CC5 (SEQ ID NO: 46); JKD6008 из CC239 (SEQ ID NO: 44); COL из CC8 (SEQ ID NO: 41); USA300_FPR3757 из CC8 (SEQ ID NO: 115); NEWMAN из CC8 (SEQ ID NO: 116); RF122 из CC151 (SEQ ID NO: 98); MW2 из CC1 (SEQ ID NO: 47) и TCH130 из CC72 (SEQ ID NO: 99). Аминокислотная последовательность, представляющая собой последовательность LukB, построенную по правилу преобладания, полученную в результате сравнения выравненных последовательностей, представлена под SEQ ID NO: 39. Места аминокислотных замен, описанных в данном документе, также идентифицированы в каждой из последовательностей LukB.

[0021] На ФИГ. 3 показана цитотоксичность разных вариантов LukAB, примененных для иммунизации. Интоксикацию первичных полиморфноядерных лейкоцитов человека («PMN») (n = 4) с помощью титров разных вариантов LukAB проводили в течение 1 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью CellTiter.

Данные представляют собой среднее значение \pm SEM по данным 4 доноров, полученным в 2 отдельных экспериментах.

[0022] На ФИГ. 4А–4В показаны титры антител к LukAB из CC8 или CC45 у мышей, иммунизированных разными вариантами LukAB. Мышам Envigo Hsd:ND4 (в 5 возрасте 4 недели) ($n = 5$ /антиген) подкожно вводили 20 мкг LukAB в 50 мкл 10% глицерина 1X TBS, смешанного с 50 мкл адьюванта TiterMax® Gold. Когорта из 5 мышей также получала иммунизацию имитационным контролем, который состоял из равных объемов 10% глицерина 1X TBS и TiterMax® Gold. После двух бустерных 10 введений (интервал между бустерными введениями составлял 2 недели) одного и того же коктейля антигена и адьюванта у мышей брали кровь с помощью сердечной 15 пункции и получали сыворотку крови. Образцы сыворотки крови от иммунизированных мышей, у которых для иммунизации использовали указанные антигены, объединяли и серийно разводили для определения титров антител к LukAB из CC8 (ФИГ. 4А) или LukAB из CC45 (ФИГ. 4В). Планшеты покрывали с 15 использованием 2 мкг/мл LukAB из CC8 или CC45. Тепловая карта показывает среднее значение поглощения, полученное в повторных измерениях.

[0023] На ФИГ. 5 представлен профиль нейтрализации для образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных разными вариантами LukAB, в отношении разных 20 токсинов LukAB. Интоксикация PMN человека ($n = 4$) в течение 1 ч. с помощью 0,156 мкг/мл (LD90) указанных вариантов LukAB в присутствии 4—0,031% образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных указанными антигенами. Образцы сыворотки крови от иммунизированных мышей, у которых для иммунизации 25 использовали указанные антигены, перед использованием объединяли и инактивировали путем нагревания. Жизнеспособность клеток определяли с помощью CellTiter. На тепловой карте представлен средний процент гибели клеток у 4 доноров, при этом черный цвет обозначает отсутствие гибели клеток, а белый цвет обозначает 100% гибель клеток.

[0024] На ФИГ. 6А–6С представлены таблицы, в которых показан процент 30 мертвых полиморфноядерных лейкоцитов человека после интоксикации с помощью LD₉₀ вариантов токсина LukAB по последовательности при отсутствии или в присутствии 2% (ФИГ. 6А), 1% (ФИГ. 6В) и 0,5% (ФИГ. 6С) образцов сыворотки крови мыши от мышей, иммунизированных указанным антигеном. Данные представлены как процент мертвых клеток. Клетки без заштриховывания представляют наиболее низкий

уровень гибели клеток, а клетки с наиболее темным серым заштриховыванием представляют наиболее высокий уровень гибели клеток.

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

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

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

[0028] На ФИГ. 10 представлено схематичное изображение схемы иммунизации самцов геттингенских минипигов. Геттингенских минипигов внутримышечно иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели. Через три недели после последней иммунизации минипигов заражали посредством *S. aureus* в модели инфекции области хирургического вмешательства. Через восемь дней определяли бактериальную

5 нагрузку. В таблице на ФИГ. 14В представлен обзор протестированных экспериментальных групп.

[0029] На ФИГ. 11А—11В показана действенность LukAB RARPR-33 и SpA* +/- GLA-SE в модели инфекции области хирургического вмешательства у минипигов.

10 Минипигов внутримышечно иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели. Через три недели после последней иммунизации минипигов заражали посредством *S. aureus* в модели инфекции области хирургического вмешательства. Через восемь дней определяли бактериальную нагрузку. Показана бактериальная нагрузка в мышце на средней глубине (ФИГ. 15А) и в мышце на большой глубине (ФИГ. 15В) через восемь

15 дней после заражения посредством *S. aureus*. Каждой точкой представлен 1 минипиг и указано среднее геометрическое. Пунктирной линией представлен предел выявления. Статистическую значимость определяли с помощью дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта для поправки на множественные сравнения, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

20 **[0030]** На ФИГ. 12 представлено схематичное изображение схемы иммунизации самцов геттингенских минипигов. Минипиги получали три внутримышечные иммунизации с интервалом в 3 недели. Через три недели после третьей иммунизации животных заражали посредством 10^6 КОЕ *S. aureus* в модели инфекции в участке хирургического вмешательства. Через восемь дней после заражения (день 71)

25 определяли бактериальную нагрузку в участке хирургического вмешательства и в селезенке. В нескольких моментах времени забирали кровь и собирали сыворотку. В таблице показаны подробности для трех экспериментальных групп.

[0031] На ФИГ. 13А—13С представлены графики, на которых показана иммуногенность LukAB RARPR-33 и SpA*. Геттингенских минипигов (n=3)

30 иммунизировали посредством 100 мкг LukAB RARPR-33 + 100 мкг SpA* в комбинации с AS01b (25 мкг MPL и 25 мкг QS-21) или 10 мкг GLA-SE. Контрольная группа получала буфер для составления антигена. Образцы сыворотки крови собирали перед каждой иммунизацией и через три недели после третьей иммунизации. Специфичность к LukAB из CC8 (ФИГ. 13А), LukAB из CC45 (ФИГ. 13В) или SpA* (ФИГ. 13С)

определяли методом ELISA. Показаны титры EC_{50} . Каждой точкой представлено одно животное. Показано среднее геометрическое \pm геометрическое стандартное отклонение для каждой группы. Пунктирной линией указан предел выявления, и он установлен на уровне 30. Образцы ниже данного значения цензурируются до 30. После трех

5 иммунизаций определяли статистическую значимость результатов при сравнении животных, иммунизированных посредством LukAB RARPR-33 + SpA* в комбинации с AS01b или GLA-SE, и контрольной группы, получавшей буфер, с помощью однофакторной модели Тобита с поправкой Бонферрони для поправки на

множественное сравнение, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

10 **[0032]** На ФИГ. 14А—14D показана перекрестная нейтрализация LukAB антителами, выработка которых индуцирована вакциной. Геттингенских минипигов ($n=3$) иммунизировали посредством 100 мкг LukAB RARPR-33 + 100 мкг SpA* в комбинации с AS01b (25 мкг MPL и 25 мкг QS-21) или 10 мкг GLA-SE. Контрольная группа получала буфер для составления антигена. Образцы сыворотки крови собирали

15 перед каждой иммунизацией и через три недели после третьей иммунизации. Клетки ТНР-1 инкубировали с различными вариантами последовательностей токсинов LukAB (СС8 (ФИГ. 14А), СС45 (ФИГ. 14В), СС22а (ФИГ. 14С), СС398 (ФИГ. 14D)) в присутствии серийно разведенных образцов сыворотки крови от минипигов до и после иммунизации. Показаны титры относительной эффективности, представляющие собой

20 разницу в титрах IC_{50} (разведение сыворотки крови, при котором наблюдали 50% цитотоксичность) между образцами сыворотки крови и эталонным моноклональным антителом к LukAB. На графике показано среднее геометрическое \pm геометрическое стандартное отклонение. Каждой точкой представлено 1 животное. Статистическую значимость определяли для образцов, полученных от животных после трех

25 иммунизаций посредством LukAB RARPR-33 + SpA* в комбинации с AS01b или GLA-SE, и сравнивали с контрольной группой, получавшей буфер,. Использовали однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Даннетта для поправки на множественное сравнение, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

30 **[0033]** На Фиг. 15А—15С показана действенность иммунного ответа в области хирургического вмешательства и селезенке у животных, иммунизированных посредством LukAB RARPR-33 + SpA* в комбинации с различными адьювантами и зараженных посредством *S. aureus*. Геттингенских минипигов ($n=3$) иммунизировали посредством 100 мкг LukAB RARPR-33 и 100 мкг SpA* с адьювантом AS01b (25 мкг MPL и 25 мкг QS-21) или 10 мкг GLA-SE. Контрольная группа получала только буфер.

Через три недели после третьей иммунизации животных заражали посредством 10^6 КОЕ *S. aureus* СС398 в модели инфекции области хирургического вмешательства. Через восемь дней после заражения определяли бактериальную нагрузку (Log_{10} КОЕ/грамм ткани) в участке хирургического вмешательства в мышце на средней глубине (ФИГ. 15А), в мышце на большой глубине (ФИГ. 15В) и в селезенке (ФИГ. 15С). Каждой точкой представлено одно животное. Указано среднее геометрическое для каждой группы. Статистическую значимость определяли с помощью дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта для поправки на множественные сравнения, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$.

10 **[0034]** На ФИГ. 16А представлено схематичное изображение схемы иммунизации самцов геттингенских минипигов. Геттингенских минипигов внутримышечно иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели. Через три недели после последней иммунизации минипигов заражали посредством *S. aureus* в модели инфекции области хирургического вмешательства. Через восемь дней определяли
15 бактериальную нагрузку. В таблице на ФИГ. 16В представлен обзор протестированных экспериментальных групп.

[0035] На ФИГ. 16С—16D показана действенность LukAB RARPR-33 и Spa* в модели инфекции области хирургического вмешательства у минипигов. Минипигов внутримышечно иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели. Через три недели
20 после последней иммунизации минипигов заражали посредством *S. aureus* в модели инфекции области хирургического вмешательства. Через восемь дней определяли бактериальную нагрузку. Показана бактериальная нагрузка в мышце на средней глубине (ФИГ. 16С) и в мышце на большой глубине (ФИГ. 16D) через восемь дней после заражения посредством *S. aureus*. Каждой точкой представлен 1 минипиг и
25 указано среднее геометрическое. Пунктирной линией представлен предел выявления. Статистическую значимость определяли с помощью дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта для поправки на множественные сравнения, $*P < 0,05$.

[0036] На ФИГ. 17А представлено схематичное изображение схемы
30 иммунизации самцов геттингенских минипигов. Геттингенских минипигов внутримышечно иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели. Через три недели после последней иммунизации минипигов заражали посредством *S. aureus* в модели инфекции области хирургического вмешательства. Через восемь дней определяли

бактериальную нагрузку. В таблице на ФИГ. 17В представлен обзор протестированных экспериментальных групп.

5 **[0037]** На ФИГ. 17С—17D показана действенность LukAB RARPR-33 и SpA* в модели инфекции области хирургического вмешательства у минипигов. Минипигов внутримышечно иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели. Через три недели после последней иммунизации минипигов заражали посредством *S. aureus* в модели инфекции области хирургического вмешательства. Через восемь дней определяли бактериальную нагрузку. Показана бактериальная нагрузка в мышце на средней глубине (ФИГ. 17С) и в мышце на большой глубине (ФИГ. 17D) через восемь дней
10 после заражения посредством *S. aureus*. Каждой точкой представлен 1 минипиг и указано среднее геометрическое. Пунктирной линией представлен предел выявления. Статистическую значимость определяли с помощью дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта для поправки на множественные сравнения, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$.

15 **[0038]** На ФИГ. 18А-Е показана иммуногенность LukAB RARPR-33 и SpA* в комбинации с различными адъювантами. Схема эксперимента показана на ФИГ. 18А, где мышей линии Swiss Webster подкожно иммунизировали 3 раза с интервалом в 2 недели, а затем в указанные моменты времени собирали кровь. На ФИГ. 18В представлен обзор включенных групп. Специфичность антител к LukAB из СС8
20 (ФИГ. 18С), LukAB из СС45 (ФИГ. 18D) или SpA* (ФИГ. 18Е) в образцах сыворотки крови определяли методом ELISA. Показаны титры EC_{50} . Каждой точкой представлено одно животное. Показано среднее геометрическое \pm геометрическое стандартное отклонение для каждой группы. Пунктирной линией указан предел выявления, и он установлен на уровне 30. Образцы ниже данного значения цензурируются до 30.

25 **[0039]** На ФИГ. 19А и 19В показаны результаты анализов нейтрализации токсина LukAB из СС8 и СС45 соответственно, которые были проведены с образцами сыворотки крови, полученными от 5 мышей из групп 1-5 (перечисленных на фиг. 18В), выделенными через две недели после последней иммунизации. Показаны титры относительной эффективности, представляющие собой разницу в титрах IC_{50}
30 (разведение сыворотки крови, при котором наблюдали 50% цитотоксичность) между образцами сыворотки крови и эталонным моноклональным антителом к LukAB. На графике показано среднее геометрическое \pm геометрическое стандартное отклонение. Каждой точкой представлено 1 животное.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

- [0040]** Прежде чем описывать композиции и способы по настоящему изобретению, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными композициями или методологиями, поскольку они могут отличаться. Нужно также понимать, что терминология, используемая в описании, предназначена лишь для описания конкретных версий или вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема вариантов осуществления в данном документе, который будет ограничиваться лишь прилагаемой формулой изобретения.
- 5
- 10 Если не предусмотрено иное, все технические и научные термины, которые используются в данном документе, имеют такие же значения, которые обычно понятны специалисту средней квалификации в данной области. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в данном документе, могут быть применены при практическом осуществлении или тестировании
- 15 вариантов осуществления предусмотренных в данном документе вариантов осуществления, далее описаны предпочтительные способы, устройства и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как признание того, что варианты осуществления в данном документе не имеют права
- 20 предшествовать такому раскрытию в силу предшествующего изобретения.
- [0041]** Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственные числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.
- [0042]** Если не указано иное, то любые числовые значения, такие как
- 25 концентрация или диапазон концентраций, описанные в данном документе, во всех случаях следует понимать как модифицированные термином «приблизительно». Таким образом, числовое значение обычно предусматривает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл предусматривает все значения в диапазоне от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Таким же образом диапазон концентраций от 1% до 10%
- 30 (вес/об.) предусматривает диапазон от 0,9% (вес/об.) до 11% (вес/об.). Как используется в данном документе, применение числового диапазона однозначно предусматривает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, в том числе целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если в контексте явно не указано иное.

[0043] Если не указано иное, то термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду.

Специалистам в данной области будут известны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанного в данном документе, или они смогут установить их путем осуществления лишь стандартных экспериментов.

Предусматривается, что такие эквиваленты охвачены данным изобретением.

[0044] Используемые в данном документе термины «предусматривает», «предусматривающий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий»,

«содержит» или «содержащий» или любые другие их вариации будут пониматься как предусматривающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не предусматривающие исключения любого другого целого числа или группы целых чисел, и при этом имеется в виду, что они являются неисключающими или

неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, предусматривающие перечень элементов, не обязательно ограничиваются

только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не указанные или являющиеся неотъемлемой частью такой композиции, смеси, процесса, способа,

изделия или устройства. Кроме того, если явно не указано иное, то «или» относится к включающему союзу «или», а не исключающему союзу «или». Например, условию А

или В отвечает любое из следующего: А истинно (или в наличии), а В ложно (или

отсутствует), А ложно (или отсутствует), а В истинно (или в наличии), и как А, так и В истинны (или в наличии). Используемый в данном документе термин-союз «и/или»

между несколькими перечисленными элементами понимают как охватывающий как вариант с отдельными элементами, так и вариант с объединенными элементами.

Например, если два элемента соединены с помощью «и/или», первый вариант

относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант

относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант

относится к возможности применения первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимают как подпадающий под данное значение и, следовательно, удовлетворяющий требованию используемого в данном документе термина «и/или».

Возможность одновременного применения более чем одного из вариантов также

понимают как подпадающую под данное значение и, следовательно, удовлетворяющую требованию термина «и/или».

[0045] Используемый в данном документе термин «состоит из» или варианты, такие как «состоят из» или «состоящий из», используемые во всем описании или

формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но при этом дополнительное целое число или группа целых чисел не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

5 **[0046]** Используемый в данном документе термин «состоит фактически из» или вариации, такие как «состоят фактически из» или «состоящий фактически из», используемые во всем описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел и необязательное включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, которые существенным образом не меняют основные или новые свойства указанного способа, структуры или
10 композиции.

[0047] Используемый в данном документе термин «субъект» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека. Термин «млекопитающее», используемый в данном документе, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают без ограничения коров, лошадей,
15 овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. п., более предпочтительно человека.

[0048] Термины «приблизительно», «примерно», «как правило», «по сути» и подобные им термины, используемые в данном документе в отношении размера или свойства компонента предпочтительного изобретения, следует рассматривать как
20 указывающие на то, что описываемые размер/свойство не представляют собой строго установленное ограничение или параметр и не исключают небольшие отклонения от них, которые функционально являются идентичными или сходными, как это будет понятно специалисту в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, будут включать вариации, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в уровне техники (например, округление, ошибки измерения или другие систематические ошибки, допуски при
25 производстве и т. п.), не будут изменять последнюю значащую цифру.

[0049] Термины «идентичный» или процентная «идентичность» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов
30 (например, полипептидов LukA, LukB, SpA Staphylococcus и полинуклеотидов, которые их кодируют) относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или характеризуются определенным процентом аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании с обеспечением максимального

соответствия в случае измерения с помощью одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или визуального анализа.

[0050] Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность выступает в роли эталонной последовательности, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости обозначают координаты подпоследовательностей и задают параметры программы алгоритма для сравнения последовательности. Затем с помощью алгоритма сравнения последовательностей вычисляют процентное значение идентичности последовательности для исследуемой(исследуемых) последовательности(последовательностей) относительно эталонной последовательности на основе заданных параметров программы.

[0051] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии из Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с помощью алгоритма гомологического выравнивания из Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью способа поиска сходства из Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин) или с помощью визуального анализа (см. в целом *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, (1995 Supplement)).

[0052] Примерами алгоритмов, которые подходят для определения процентного значения идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402 соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным посредством Национального центра биотехнологической информации.

[0053] Помимо расчета процентного значения идентичности последовательностей алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Одним из показателей сходства, который представлен алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), выражающая вероятность случайного совпадения двух нуклеотидных или

аминокислотных последовательностей. Например, нуклеиновая кислота считается схожей с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении исследуемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее чем приблизительно 0,1, более предпочтительно менее чем

5 приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее чем приблизительно 0,001.

[0054] Дополнительным признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептидов являются по сути идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, иммунологически перекрестно реагирует с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой,

10 как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно по сути идентичен второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот являются по сути идентичными, является то, что две молекулы гибридизируются друг с другом в жестких условиях.

15 **[0055]** Используемый в данном документе термин «полинуклеотид», синонимично называемый «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК.

20 «Полинуклеотиды» предусматривают без ограничения одно- и двухниточную ДНК, при этом ДНК представляет собой смесь одно- и двухниточных областей, одно- и двухниточную РНК и РНК, представляющую собой смесь одно- и двухниточных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть однострочными или более типично двухниточными или представлять собой смесь

25 одно- и двухниточных областей. Кроме того, «полинуклеотид» относится к трехниточным областям, содержащим РНК или ДНК или как РНК, так и ДНК. Термин «полинуклеотид» также предусматривает ДНК или РНК, содержащие одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с остовами, модифицированными для стабильности или по другим причинам. «Модифицированные» основания

30 предусматривают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. ДНК и РНК могут подвергаться различным модификациям; таким образом, «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, которые обычно встречаются в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток.

«Полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

[0056] Используемый в данном документе термин «вектор» относится, например, к любому количеству нуклеиновых кислот, в которые может быть вставлена необходимая последовательность, например, путем рестрикции и лигирования, для транспортирования между генетическими средами или для экспрессии в клетке-хозяине. Векторы нуклеиновых кислот могут представлять собой ДНК или РНК. Векторы предусматривают без ограничения плазмиды, фаги, фагмиды, геномы бактерий, геномы вирусов, самоамплифицирующуюся РНК, репликоны.

[0057] Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. «Клетка-хозяин» может быть клеткой любого типа, например первичной клеткой, клеткой в культуре или клеткой из линии клеток. В одном варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную или трансдуцированную молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной или трансдуцированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным исходной клетке, например, из-за мутаций или влияния окружающей среды, которые могут происходить в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[0058] Термин «экспрессия», используемый в данном документе, относится к биосинтезу продукта гена. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывает все естественные посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессируемый полипептид может находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для роста клеточной культуры, или быть заякоренным в клеточной мембране.

[0059] Используемые в данном документе термины «пептид», «полипептид» или «белок» могут относиться к молекуле, которая состоит из аминокислот и может распознаваться специалистами в данной области техники в качестве белка. В данном документе используется обычный однобуквенный или трехбуквенный код для аминокислотных остатков. Термины «пептид», «полипептид» и «белок» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров

аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может быть прерван соединениями, отличными от аминокислот. Термины также охватывают полимер аминокислоты, который был модифицирован естественным образом или путем вмешательства; например образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгация с компонентом для мечения. Также в это определение включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, неестественные аминокислоты и т. д.), а также другие модификации, известные из уровня техники.

[0060] Полипептидные последовательности, описанные в данном документе, записаны в соответствии с общепринятой договоренностью, согласно которой N-концевая область пептида находится слева, а C-концевая область находится справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, представлена именно L-форма аминокислоты, если явно не указано иное.

[0061] Термин «выделенный» может относиться к нуклеиновой кислоте или полипептиду, которые по существу не содержат клеточный материал, бактериальный материал, вирусный материал или культуральную среду (при получении с помощью методик рекомбинантной ДНК) из источника их происхождения, или химических предшественников, или других химических веществ (при химическом синтезе). Более того, выделенный полипептид относится к полипептиду, который может быть введен субъекту в виде выделенного полипептида; другими словами, полипептид не может просто считаться «выделенным», если он прикреплен к колонке или находится в геле. Более того, «выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты» или «выделенный пептид» представляют собой фрагмент нуклеиновой кислоты или белка, который не встречается в природе в виде фрагмента и/или обычно не находится в функциональном состоянии.

[0062] Используемая в данном документе фраза «иммунный ответ» или ее эквивалент «иммунологический ответ» относятся к развитию гуморального (опосредованного антителами), клеточного (опосредованного антигенспецифическими Т-клетками или продуктами их секреции) или как гуморального, так и клеточного ответа, направленных на белок, пептид, углевод или полипептид по данному изобретению в организме субъекта-реципиента. Такой ответ может быть активным ответом, индуцированным введением иммуногена, или пассивным ответом, индуцированным введением антитела, материала, содержащего антитело, или

праймированных Т-клеток. Клеточный иммунный ответ вызывается презентацией полипептидных эпитопов в ассоциации с молекулами МНС класса I или класса II, которая активирует антигенспецифические CD4 (+) Т-хелперные клетки и/или CD8 (+) цитотоксические Т-клетки. Ответ может также предусматривать активацию моноцитов, макрофагов, NK-клеток, базофилов, дендритных клеток, астроцитов, клеток микроглии, эозинофилов или других компонентов врожденного иммунитета. Используемый в данном документе термин «активный иммунитет» относится к любому иммунитету, формирующемуся у субъекта в результате введения антигена.

[0063] Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям, подходящим для обеспечения развития иммунного ответа на *Staphylococcus aureus*. Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает полипептид белка А *Staphylococcus aureus* (SpA) и вариант полипептида лейкоцидина А (LukA) *S. aureus*. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция дополнительно содержит полипептид лейкоцидина В (LukB) *S. aureus* или соответствующий ему вариант полипептида. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает белок SpA *S. aureus* и вариант полипептида LukB *S. aureus*. Настоящее изобретение дополнительно относится к применению и способам применения иммуногенных композиций при лечении и/или предупреждении инфекции, обусловленной *S. aureus*.

[0064] Таким образом, в общем аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая:

- (i) полипептид белка А *Staphylococcus aureus* (SpA) и
- (ii) вариант полипептида LukA *Staphylococcus aureus*, при этом указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит (iii) полипептид лейкоцидина В (LukB) *S. aureus* или его вариант. В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит (iv) адъювант.

[0065] Компоненты (i), (ii), (iii) и (iv) композиции могут быть составлены в виде единого продукта, т. е. в виде единой композиции. Альтернативно, каждый из компонентов (i), (ii), (iii) и (iv) может быть составлен в виде единой композиции или в композициях, совместно содержащих комбинацию двух или более компонентов.

Соответственно, в дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена комбинация двух или более композиций, которые совместно предусматривают:

- (i) полипептид белка А *Staphylococcus aureus* (SpA) и
- (ii) вариант полипептида LukA *Staphylococcus aureus*, при этом указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

В определенных вариантах осуществления комбинация из двух или более композиций дополнительно содержит (iii) полипептид лейкоцидина В (LukB) *S. aureus* или его вариант. В определенных вариантах осуществления комбинация из двух или более композиций дополнительно содержит (iv) адьювант.

[0066] В определенных вариантах осуществления комбинацию композиций можно комбинировать в единую композицию перед применением. В других вариантах осуществления комбинацию композиций применяют в виде отдельных композиций, которые необходимо вводить в комбинации друг с другом.

Полипептиды лейкоцидина А (LukA) S. aureus иммуногенной композиции

[0067] В одном аспекте иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит вариант полипептида LukA *S. aureus*. Подходящие варианты полипептида LukA предусматривают одну или более вставок, замен и/или делеций аминокислотных остатков, которые делают двухкомпонентный комплекс LukAB, содержащий такой вариант LukA, нецитотоксичным. Вариант полипептида LukA также стабилизирует гетеродимер LukAB, повышает температуру плавления и/или увеличивает растворимость гетеродимера.

[0068] Во всех вариантах осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции может представлять собой вариант полноразмерного белка LukA, содержащий все аминокислотные остатки, соответствующие последовательности полноразмерного зрелого белка LukA. Как указано в данном документе, «зрелая» последовательность белка, представляющего собой лейкоцидин, представляет собой последовательность белка, представляющего собой лейкоцидин, лишенную сигнала секреции на аминоконце, который обычно содержит первые 27—28 аминокислотных остатков на аминоконце.

[0069] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции может представлять собой вариант, который меньше

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

10 **[0070]** Хотя иллюстративные варианты белка и полипептида LukA иммуногенной композиции, которая описана в данном документе, представляют собой варианты белка LukA из клональных комплексов CC8 (SEQ ID NO: 1) и CC45 (SEQ ID NO: 2) (см. таблицу 1 ниже), специалист в данной области техники легко поймет, что аминокислотные замены и/или делеции в LukA, идентифицированные в контексте последовательностей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, представляют собой аминокислотные остатки, являющиеся консервативными в различных клональных комплексах или в областях LukA, которые являются высококонсервативными в различных клональных комплексах. Действительно, выравнивание последовательностей белка LukA из пятнадцати различных штаммов *S. aureus* (см. ФИГ. 1) показывает, что аминокислотные остатки, идентифицированные в данном документе как остатки, которые подлежат вариации, являются остатками, которые являются консервативными во всех 15 выровненных аминокислотных последовательностях LukA. Хотя положение идентифицированного остатка, который подлежит вариации, может отличаться между отдельными последовательностями LukA, выравнивание последовательности показывает соответствие между этими положениями. Для ясности — консенсусная последовательность LukA, содержащая аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, была создана с помощью выравнивания последовательностей и использовалась для определения местоположения конкретных аминокислотных вариаций. Например, аминокислотная замена по остатку лизина 83 в последовательности под SEQ ID NO: 25 соответствует остатку лизина в положении 80 в последовательности LukA под SEQ ID NO: 1, остатку лизина в положении 81 в последовательности LukA под SEQ ID NO: 2 и остатку лизина в положении 83 в последовательностях LukA под SEQ ID NO: 26—38. Таким образом, идентифицированные аминокислотные вариации, описанные в данном документе,

могут быть универсально применены к соответствующим аминокислотным остаткам в любой аминокислотной последовательности LukA, известной сейчас или в будущем.

[0071] В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения в любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции предусматривает вставку, замену и/или делецию аминокислотного остатка по одному или более аминокислотным остаткам, соответствующим остаткам Lys83, Ser141, Val113, Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA дополнительно предусматривает аминокислотную замену или делецию по аминокислотному остатку, который соответствует Glu323 в последовательности под SEQ ID NO: 25, в дополнение к одной или более вставкам, заменам и/или делециям аминокислотных остатков, которые описаны выше. В любом варианте осуществления аминокислотная замена или делеция по Glu323 предусматривает замену глутаминовой кислоты на аланин в положении 323 (Glu323Ala) в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0072] В любом варианте осуществления аминокислотная замена в одном или более идентифицированных положениях LukA (и других белков *S. aureus*, как описано в данном документе) является консервативной заменой. Такие консервативные замены подразумевают замену одного аминокислотного остатка на другой, принадлежащий к тому же классу, который действует как функциональный эквивалент, что приводит к сайленс-изменению. То есть изменение относительно нативной последовательности не будет заметно снижать основные свойства LukA. Эти классы аминокислотных остатков предусматривают неполярные (гидрофобные) аминокислоты (например, аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин); полярные нейтральные аминокислоты (например, глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин); положительно заряженные (основные) аминокислоты (например, аргинин, лизин и гистидин) и отрицательно заряженные (кислотные) аминокислоты (например, аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту).

[0073] В других вариантах осуществления аминокислотная замена в одном или более идентифицированных положениях варианта полипептида, представляющего собой лейкоцидин или SpA, описанного в данном документе, является изменением, отличным от консервативного (т. е. заменой, которая нарушает последовательность, структуру, функцию или активность идентифицированной области). Такая замена может быть желательна в целях снижения или ослабления цитотоксичности белка. Замена, отличная от консервативной, предусматривает замену аминокислотного

остатка одного конкретного класса на аминокислотный остаток другого класса.

Например, замена неполярного (гидрофобного) аминокислотного остатка на полярную нейтральную аминокислоту или *наоборот*. В другом варианте осуществления замена,

отличная от консервативной, предусматривает замену положительно заряженного

5 (основного) аминокислотного остатка на отрицательно заряженный (кислотный)

аминокислотный остаток, такой как аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота,

или *наоборот*. Такие молекулярные изменения могут быть осуществлены способами,

хорошо известными из уровня техники, включая расширение праймера на плазмидной матрице с использованием однониточных матриц (работа Kunkel et al., *Proc. Acad. Sci.,*

10 *USA* 82:488-492 (1985), которая включена в данный документ посредством ссылки во

всей своей полноте), матриц двухниточной ДНК (работа Papworth, et al., *Strategies*

9(3):3-4 (1996), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей

своей полноте) и путем ПЦР-клонирования (работа Braman, J. (ред.), *IN VITRO*

MUTAGENESIS PROTOCOLS, 2-е издание Humana Press, Totowa, N.J. (2002), которая

15 включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0074] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA

иммуногенной композиции предусматривает замену лизина на метионин по остатку,

который соответствует лизину в положении 83 (Lys83Met) в последовательности под

SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA

20 иммуногенной композиции предусматривает замену серина на аланин по остатку,

который соответствует серину в положении 141 (Ser141Ala) в последовательности под

SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA

иммуногенной композиции предусматривает замену валина на изолейцин по остатку,

который соответствует валину в положении 113 (Val113Ile) в последовательности под

25 SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA

иммуногенной композиции предусматривает замену валина на изолейцин по остатку,

который соответствует валину в положении 193 (Val113Ile) в последовательности под

SEQ ID NO: 25.

[0075] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA

30 иммуногенной композиции предусматривает замену глутаминовой кислоты на аланин

по остатку, который соответствует остатку глутаминовой кислоты в положении 323

(Glu323Ala) в последовательности под SEQ ID NO: 25, в дополнение к любой одной

или более заменам по остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113 и Val193

в последовательности под SEQ ID NO: 25

[0076] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции предусматривает соответствующий ему белок или полипептид, которые характеризуются наличием вставки, замены и/или делеции аминокислотного остатка по двум из вышеуказанных аминокислотных остатков, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает вставку, замену и/или делецию аминокислотного остатка в трех из вышеуказанных аминокислотных остатков. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает вставку, замену и/или делецию аминокислотного остатка по всем четырем из вышеуказанных аминокислотных остатков. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены лизина на метионин, серина на аланин и валина на изолейцин по вышеуказанным аминокислотным остаткам, которые соответствуют Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile и Val193Ile в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант белка LukA или соответствующий ему полипептид дополнительно предусматривают аминокислотную замену, соответствующую Glu323Ala в последовательности под SEQ ID NO: 25, т. е. вариант LukA содержит замены, соответствующие Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0077] Иллюстративный вариант полипептида LukA иммуногенной композиции, описанной в данном документе, предусматривает аминокислотные замены, соответствующие Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант LukA из CC8, предусматривающий любую одну или более аминокислотных замен, выбранных из Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile и Glu320Ala в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант LukA из CC8, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют каждой из Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile и Glu320Ala в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления этот вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей

мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3.

[0078] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает любую одну или более аминокислотных замен, которые соответствуют Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile и Glu321Ala в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют каждой из Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile и Glu321Ala в последовательности под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления этот вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4. Другие иллюстративные варианты белка LukA включают любой из белков LukA с последовательностями под SEQ ID NO: 26—38, которые предусматривают аминокислотные замены, которые соответствуют заменам Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0079] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции, описанный в данном документе, предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В одном варианте осуществления аминокислотные замены по одному или более вышеуказанным остаткам обеспечивают введение остатков цистеина, способных образовывать дисульфидные связи для стабилизации конформации гетеродимерной структуры LukAB. Например, в одном варианте осуществления вариант полипептида LukA, описанный в данном документе, предусматривает замену тирозина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Tyr74 (Tyr74Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25, и предусматривает замену аспарагина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Asp140 (Asp140Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25. Эти остатки цистеина в положениях 74 и 140 образуют дисульфидную связь, за счет чего

повышается термостабильность варианта LukA относительно LukA дикого типа или относительно других вариантов белка и полипептида LukA, описанных в данном документе, которые не содержат спаренных остатков цистеина, способных образовывать дисульфидную связь.

- 5 **[0080]** В другом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции, описанный в данном документе, предусматривает замену глицина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Gly149 (Gly149Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25, и предусматривает замену глицина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Gly156
10 (Gly156Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25. Эти остатки цистеина, введенные в положениях 149 и 156, образуют дисульфидную связь, за счет чего повышается термостабильность варианта LukA относительно LukA дикого типа или относительно других вариантов полипептида LukA, описанных в данном документе, которые не содержат спаренных остатков цистеина, способных образовывать
15 дисульфидную связь.
- [0081]** В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте
20 осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина, как описано выше. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Tyr71, Asp137, Gly146 и Gly153 в
25 последовательности под SEQ ID NO:1. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина, как описано выше. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Tyr72, Asp138, Gly147 и Gly154 в
30 последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина, как описано выше.

[0082] В любом варианте осуществления вариант белка или полипептида LukA иммуногенной композиции предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323, в комбинации с аминокислотной заменой по одному или более

5 аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по аминокислотным остаткам, которые соответствуют остаткам Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323 и остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под

10 SEQ ID NO: 25.

[0083] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80, Ser138, Val110, Val190, Glu320, Tyr71, Asp137, Gly146 и Gly153 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте

15 осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Glu320Ala, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys и Gly153Cys в

20 последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления этот вариант полипептида LukA из CC8 предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной

25 последовательностью под SEQ ID NO: 5.

[0084] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys81, Ser139, Val111, Val191, Glu321, Tyr72, Asp138, Gly147 и Gly154 в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте

30 осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Glu321Ala, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys и Gly154Cys в

последовательности под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления этот вариант полипептида LukA из CC45 предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6.

[0085] Другие иллюстративные варианты полипептида LukA иммуногенной композиции предусматривают любой из белков LukA с последовательностями под SEQ ID NO: 26—38, которые предусматривают аминокислотные замены, которые соответствуют Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile, Glu323Ala, Tyr74Cys, Asp140Cys, Gly149Cys и Gly156Cys в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0086] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukA иммуногенной композиции, описанной в данном документе, предусматривает аминокислотную замену или делецию по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант LukA предусматривает замену по остатку, который соответствует Thr249, где замена по этому остатку представляет собой замену треонина на валин (Thr249Val).

[0087] В любом варианте осуществления вариант белка или полипептида LukA иммуногенной композиции, описанной в данном документе, предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25, в комбинации с любой из других замен аминокислотного остатка, описанных в данном документе, то есть заменами по остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323 Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления вариант белка или полипептида LukA, описанный в данном документе, предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25, в комбинации с по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью, по меньшей мере шестью, по меньшей мере семью, по меньшей мере восемью или всеми девятью другими заменами аминокислотных остатков, описанными в данном документе. В любом варианте осуществления вариант белка или полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому остатку, который

соответствует Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323 и Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0088] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, характеризующийся наличием аминокислотной замены по остатку Thr246, отдельно или в комбинации с любой одной или более аминокислотными заменами, которые соответствуют каждому из Lys80, Ser138, Val110, Val190 и Glu320 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80, Ser138, Val110, Val190, Glu320 и Thr246 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Glu320Ala и Thr246Val в последовательности под SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из вышеупомянутых положений, предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 7.

[0089] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, характеризующийся наличием аминокислотной замены по остатку Thr247, отдельно или в комбинации с любой одной или более аминокислотными заменами, которые соответствуют каждому из Lys81, Ser139, Val111, Val191 и Glu321 в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys81, Ser139, Val111, Val191, Glu321 и Thr247 в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой

вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Glu321Ala и Thr247Val в последовательности под SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из вышеупомянутых положений, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8.

[0090] Другие иллюстративные варианты белка LukA иммуногенной композиции предусматривают любой из белков LukA с последовательностями под SEQ ID NO: 26—38, которые предусматривают описанные аминокислотные замены по аминокислотным остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323 и Thr249 в последовательности под SEQ ID NO:25.

[0091] В любом варианте осуществления вариант белка или полипептида LukA иммуногенной композиции предусматривает аминокислотные замены по каждому остатку, который соответствует Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323, Thr249, Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0092] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80, Ser138, Val110, Val190, Glu320, Tyr71, Asp137, Gly146, Gly153 и Thr246 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC8, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Glu320Ala, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys и Thr246Val в последовательности под SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из вышеупомянутых положений, предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей

мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9.

[0093] В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys81, Ser139, Val111, Val191, Glu321, Tyr72, Asp138, Gly147, Gly154 и Thr247 в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA представляет собой вариант полипептида LukA из CC45, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Glu321Ala, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys и Thr247Ala в последовательности под SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukA, который предусматривает аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют каждому из вышеупомянутых положений, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10.

[0094] Другие иллюстративные варианты белка LukA иммуногенной композиции предусматривают любой из белков LukA с последовательностями под SEQ ID NO: 26—38, которые предусматривают описанные аминокислотные замены по остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323, Thr249, Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0095] В таблице 1 ниже приведены иллюстративные варианты аминокислотных последовательностей LukA иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе.

Таблица 1. Иллюстративные аминокислотные последовательности полипептида LukA

SEQ ID NO	Название	Описание
1	LukA CC8 WT	HKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRNVTKDKNSTAPD DIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPTYDK NVLVKKQGSIHNLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHV DFQVKNRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKF DSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKNNNWH VHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLEYRNTRIATVENP

SEQ ID NO	Название	Описание
		ELSFASKYRYYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFE VTYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYEV DWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG
2	LukA CC45 WT	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRNVDKDKNTPGP DDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPY DKNVLLVKKQGSIHSLKSFESHNETNASWLKYPSEY HVDFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSLGG KFDSTKGIGRTSSNSYSKSYSNQQNYDTIASGKNNNR HVHWSVVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNRRLSTVE NPELSFASKYRYYPALVRSGFNPEFLTYISNEKTNDKTR FEVYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDGQRFIVVY EVDWKNKTVKVVEKYSQNKPYKEG
3	LukA CC8 W95 E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile	HKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRNVTNKDKNSTAPD DIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYDK NVLLVKMQGSIHSLKSFESHKEEKNSNLKYPSEYHI DFQVQRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDA <u>T</u> FSYSSGGKF DSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKNNNWH VHWSIIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNRTRIA TVENP ELSFASKYRYYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFE VTYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYEV DWKNKTVKVVDKYSDDNKPYK <u>A</u> G
4	LukA CC45 W95 E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRNVDKDKNTPGP DDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPY DKNVLLVVKMQGSIHSLKSFESHNETNASWLKYPSE YHI <u>D</u> DFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDA <u>T</u> FSYSLG GKFDSTKGIGRTSSNSYSKSYSNQQNYDTIASGKNNN RHVHWSIVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNRRLSTVE NPELSFASKYRYYPALVRSGFNPEFLTYISNEKTNDKTR FEVYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDGQRFIVVY EVDWKNKTVKVVEKYSQNKPYK <u>A</u> G
5	LukA CC8 W95W72 E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	HKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRNVTNKDKNSTAPD DIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDP <u>T</u> CDK NVLLVKMQGSIHSLKSFESHKEEKNSNLKYPSEYHI DFQVQRNRKTEILDQLPKNKISTAKV <u>C</u> A <u>T</u> FSYSSG <u>C</u> KF DSTK <u>C</u> IGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKNNNWH VHWSIIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNRTRIA TVENP ELSFASKYRYYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFE VTYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYEV DWKNKTVKVVDKYSDDNKPYK <u>A</u> G
6	LukA CC45 W95W72 E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRNVDKDKNTPGP DDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDP <u>T</u> <u>C</u> DKNVLLVVKMQGSIHSLKSFESHNETNASWLKYPSE YHI <u>D</u> DFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKV <u>C</u> A <u>T</u> FSYSLG <u>C</u> KFDSTK <u>C</u> IGRTSSNSYSKSYSNQQNYDTIASGKNNN RHVHWSIVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNRRLSTVE NPELSFASKYRYYPALVRSGFNPEFLTYISNEKTNDKTR FEVYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDGQRFIVVY EVDWKNKTVKVVEKYSQNKPYK <u>A</u> G

SEQ ID NO	Название	Описание
7	LukA CC8 W97 E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Thr246Val	HKDSQDQNKKEHVDK S QQDKRNVTKDKNSTAPD DIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPTYDK NVLLVK M QGSIHNLKFESHKEEKNSNLKYPSEYH I DFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKV N A T FSYSSGGKF DSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKNNNWH VHWS I IANDLKYGGEVKNRNDPELLFYRNTRIA T VENP ELSFASKYRYPALVRSGFNPEFL V YLSNEKSNEKTQFE VTYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYEV DWKNKTVKVVDKYSDDNKPYK A G
8	LukA CC45 W97 E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val	ANKDSQDQTKKEHVDK A QQKEKRVNDKDKNTPGP DDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPTY DKNVLLVK M QGSIHNLKFESHNETNASWLKYPSE YH I DFQVQRNP K TEILDQLPKNKISTAKV D A T FSYSLG GKFDSTKGIGRTSSNSYSK S ISYNQQNYDTIASGKNNN RHVHWS I VANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTRLSTVE NPESFASKYRYPALVRSGFNPEFL V YISNEKTNDKTR FEV T YTRNQDILKNKPGIHYGQ P ILEQN K DGQRFIVVY EVDWKNKTVKVVEKYS D QNKPYK A G
9	LukA CC8 W97 W72 E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Thr246Val, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	HKDSQDQNKKEHVDK S QQDKRNVTKDKNSTAPD DIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPT C DK NVLLVK M QGSIHNLKFESHKEEKNSNLKYPSEYH I DFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKV C A T FSYSSG C KF DSTK C IGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKNNNWH VHWS I IANDLKYGGEVKNRNDPELLFYRNTRIA T VENP ELSFASKYRYPALVRSGFNPEFL V YLSNEKSNEKTQFE VTYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYEV DWKNKTVKVVDKYSDDNKPYK A G
10	LukA CC45 W97 W72 E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys	ANKDSQDQTKKEHVDK A QQKEKRVNDKDKNTPGP DDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPT C DKNVLLVK M QGSIHNLKFESHNETNASWLKYPSE YH I DFQVQRNP K TEILDQLPKNKISTAKV C A T FSYSLG C KFDSTK C IGRTSSNSYSK S ISYNQQNYDTIASGKNNN RHVHWS I VANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTRLSTVE NPESFASKYRYPALVRSGFNPEFL V YISNEKTNDKTR FEV T YTRNQDILKNKPGIHYGQ P ILEQN K DGQRFIVVY EVDWKNKTVKVVEKYS D QNKPYK A G
11	LukA CC45 W94 E321A, Lys81Leu, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile	ANKDSQDQTKKEHVDK A QQKEKRVNDKDKNTPGP DDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPTY DKNVLLVK L QGSIHNLKFESHNETNASWLKYPSEY H I DFQVQRNP K TEILDQLPKNKISTAKV D A T FSYSLGG KFDSTKGIGRTSSNSYSK S ISYNQQNYDTIASGKNNNR HVHWS I VANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTRLSTVEN PELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKTNDKTRF EV T YTRNQDILKNKPGIHYGQ P ILEQN K DGQRFIVVYE VDWKNKTVKVVEKYS D QNKPYK A G
12	LukA CC45 W96 E321A, Lys81Leu, Ser139Ala, Val111Ile,	ANKDSQDQTKKEHVDK A QQKEKRVNDKDKNTPGP DDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPTY DKNVLLVK L QGSIHNLKFESHNETNASWLKYPSEY

SEQ ID NO	Название	Описание
	Val191Ile, Thr247Val	HIIDFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDA <u>T</u> FSYSLGG KFDSTKGIGRTSSNSYSKISYNQQNYDTIASGKNNNR HVHWSI <u>V</u> ANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNLSTVEN PELSFASKYRYPALVRSGFNPEFL <u>V</u> YISNEKTNDKTRF EVTYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDQGQRFIVVYE VDWKNKTVKVVEKYSQNKPYK <u>A</u> G
13	LukA CC8 Glu320Ala	HKDSQDQNKKEHVDKSOQKDKRNVNTNKDKNSTAPD DIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPTYDK NVLLVKK <u>K</u> QGSIHNLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHV DFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKF DSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKNNNWH VHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELFLFYRNTRIAVENP ELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFE VTYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYEV DWKNKTVKVVDKYSDDNKPYK <u>A</u> G
14	LukA CC45 Glu321Ala	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGP DDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPTY DKNVLLVKKQGSIHNLKFESHNETNASWLKYPSEY HVDFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSLGG KFDSTKGIGRTSSNSYSKISYNQQNYDTIASGKNNNR HVHWSVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNLSTVE NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKTNDKTR FEVTYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDQGQRFIVVY EVDWKNKTVKVVEKYSQNKPYK <u>A</u> G
113	LukA из CC8 delta 10	HKDSQDQNKKEHVDKSOQKDKRNVNTNKDKNSTAPD DIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPTYDK NVLLVKK <u>K</u> QGSIHNLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHV DFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKF DSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKNNNWH VHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELFLFYRNTRIAVENP ELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFE VTYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYEV DWKNKTVKVVDKY
114	LukA из CC45 delta 10	ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGP DDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPTY DKNVLLVKKQGSIHNLKFESHNETNASWLKYPSEY HVDFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSLGG KFDSTKGIGRTSSNSYSKISYNQQNYDTIASGKNNNR HVHWSVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNLSTVE NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKTNDKTR FEVTYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDQGQRFIVVY EVDWKNKTVKVVEKY

Полипептиды лейкоцидина В (LukB) *S. aureus* иммуногенной композиции

[0096] В некоторых аспектах иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит белки или полипептиды лейкоцидина В (LukB) *S. aureus*. В любом варианте осуществления белок или полипептид LukB *S. aureus* представляет

собой белок или полипептид дикого типа. Подходящие полипептиды LukB включают любой из полипептидов LukB, раскрытых в данном документе, например полипептид, предусматривающий наличие любой аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей под SEQ ID NO: 15, 16 и 39—51. В любом варианте

5 осуществления полипептид LukB представляет собой полипептид LukB из CC8.

Подходящий полипептид LukB из CC8 предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления полипептид LukB представляет собой полипептид LukB из CC45. Подходящий полипептид LukB из CC45 предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

10 **[0097]** В любом варианте осуществления полипептид LukB иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе, предусматривает вариант полипептида LukB. Подходящие варианты полипептида LukB предусматривают одну или более вставок, замен и/или делеций аминокислотных остатков, которые обеспечивают улучшение стабильности LukB, тем самым способствуя стабильности анатоксина

15 LukAB. Как описано в данном документе, данные варианты белков и полипептидов LukB являются идеальными кандидатами на вакцинные антигены, которые могут быть включены в иммуногенную композицию с полипептидом SpA отдельно или в комбинации с вариантом белка или полипептида лейкоцидина A (LukA). Если иммуногенная композиция предусматривает комбинацию полипептидов LukB и LukA,

20 полученный в результате анатоксин имитирует структуру токсина LukAB *S. aureus*, тем самым обеспечивая выработку устойчивого иммунного ответа на один из наиболее эффективных токсинов *S. aureus*.

[0098] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB иммуногенной композиции представляет собой вариант полноразмерного белка LukB,

25 содержащий все аминокислотные остатки, соответствующие последовательности полноразмерного зрелого белка LukB. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант, который меньше полноразмерного зрелого белка LukB. В любом варианте осуществления длина варианта полипептида LukB составляет по меньшей мере 100 аминокислотных остатков. В любом варианте

30 осуществления длина варианта полипептида LukB составляет по меньшей мере 110, по меньшей мере 120, по меньшей мере 130, по меньшей мере 140, по меньшей мере 150, по меньшей мере 160, по меньшей мере 170, по меньшей мере 180, по меньшей мере 190, по меньшей мере 200, по меньшей мере 210, по меньшей мере 220, по меньшей мере 230, по меньшей мере 240, по меньшей мере 250, по меньшей мере 260, по

меньшей мере 270, по меньшей мере 280, по меньшей мере 290, по меньшей мере 300 аминокислотных остатков.

[0099] Хотя иллюстративные варианты белка и полипептида LukB, описанные в данном документе, представляют собой варианты белка LukB из клональных комплексов CC8 (SEQ ID NO: 15) и CC45 (SEQ ID NO: 16) (см. таблицу 2 ниже), специалист в данной области техники легко поймет, что аминокислотные замены и/или делеции в LukB, идентифицированные в контексте последовательностей SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, представляют собой аминокислотные остатки, являющиеся консервативными в различных клональных комплексах или в областях LukB, которые являются высококонсервативными в различных клональных комплексах.

Выравнивание последовательностей белка LukB из четырнадцати различных штаммов *S. aureus* (см. ФИГ. 2) показывает, что аминокислотные остатки, идентифицированные в данном документе как остатки, которые подлежат вариации, являются остатками, которые являются консервативными во всех 14 выровненных аминокислотных последовательностях LukB. Хотя положение идентифицированного остатка, который подлежит вариации, может отличаться между отдельными последовательностями LukB, выравнивание последовательности показывает соответствие между этими положениями. Для ясности — консенсусная последовательность LukB, содержащая аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, была создана с помощью выравнивания последовательностей и использовалась для определения местоположения конкретных аминокислотных вариаций. Например, аминокислотная замена по остатку глутаминовой кислоты 109 в последовательности под SEQ ID NO: 39 соответствует остатку глутаминовой кислоты в положении 109 в последовательностях LukB под SEQ ID NO: 15, 42, 44 и 46—51, остатку глутаминовой кислоты в положении 110 в последовательностях LukB под SEQ ID NO: 16, 40, 43 и 45 и остатку глутаминовой кислоты в положении 60 в последовательности LukB под SEQ ID NO: 41. Таким образом, идентифицированные аминокислотные вариации, описанные в данном документе, могут быть универсально применены к соответствующим аминокислотным остаткам в любых аминокислотных последовательностях LukB, известных сейчас или в будущем.

[0100] В любом варианте осуществления подходящий вариант полипептида LukB иммуногенных композиций, раскрытых в данном документе, предусматривает аминокислотную замену или делецию по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Val53 в последовательности под SEQ ID NO:

39. В любом варианте осуществления аминокислотная замена по Val53 предусматривает замену валина на лейцин (Val53Leu). В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB предусматривает замену, соответствующую замене Val53Leu в последовательности под SEQ ID NO: 39.

5 **[0101]** В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, характеризующийся наличием аминокислотной замены в положении аминокислоты, соответствующем положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант
10 полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, характеризующийся наличием аминокислотной замены валина на лейцин в положении, соответствующем положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления иллюстративная последовательность LukB из CC8, характеризующаяся наличием замены валина на лейцин в положении 53,
15 предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 17.

20 **[0102]** В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, характеризующийся наличием аминокислотной замены в положении аминокислоты, соответствующем положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант
25 полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, характеризующийся наличием аминокислотной замены валина на лейцин в положении, соответствующем положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 16. Иллюстративный вариант полипептида LukB, предусматривающий замену валина на лейцин, предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18
30 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 18.

[0103] Другие иллюстративные варианты белков LukB включают любой из белков LukB с последовательностями под SEQ ID NO: 40—51, которые предусматривают аминокислотную замену, соответствующую Val53Leu.

[0104] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB иммуногенной композиции, описанной в данном документе, предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления аминокислотная замена по одному или более вышеуказанным остаткам обеспечивает введение остатков цистеина, способных образовывать дисульфидную связь для стабилизации конформации гетеродимерной структуры LukAB. Например, в одном варианте осуществления вариант белка или полипептида LukB, описанный в данном документе, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Glu45 (Glu45Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39, и предусматривает замену треонина на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Thr121 (Thr121Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39. Эти остатки цистеина в положениях 45 и 121 образуют дисульфидную связь, за счет чего повышается термостабильность варианта LukB относительно LukB дикого типа или относительно других вариантов белка и полипептида LukB, описанных в данном документе, которые не содержат спаренных остатков цистеина, способных образовывать дисульфидную связь.

[0105] В любом варианте осуществления вариант белка или полипептида LukB иммуногенной композиции, описанной в данном документе, предусматривает замену глутаминовой кислоты на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Glu109 (Glu109Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39, и предусматривает замену аргинина на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Arg154 (Arg154Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39. Эти остатки цистеина, введенные в положения 109 и 154, образуют дисульфидную связь, за счет чего повышается термостабильность варианта LukB относительно LukB дикого типа или относительно других вариантов белка и полипептида LukB, описанных в данном документе, которые не содержат спаренных остатков цистеина, способных образовывать дисульфидные связи.

[0106] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukB из CC8,

предусматривающий аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина, как описано выше. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB, предусматривающий аминокислотные замены на цистеин по остаткам, соответствующим Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154, предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 21.

[0107] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB иммуногенной композиции, описанной в данном документе, предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155 в последовательности под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155 в последовательности под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина, как описано выше. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB, предусматривающий аминокислотные замены на цистеин по остаткам, соответствующим Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155, предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 22.

[0108] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе, предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует Val53 в последовательности под SEQ ID NO: 39, в комбинации с заменой аминокислотного остатка по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Val53, Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Val53Leu, Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB из CC8 предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 19.

[0109] В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Val53, Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155 в последовательности под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления вариант полипептида LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, предусматривающий аминокислотную замену по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Val53Leu, Glu45Cys, Glu110Cys, Thr123Cys и Arg155Cys в последовательности под SEQ ID NO: 16. В любом варианте осуществления иллюстративный вариант полипептида LukB из CC45 предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей

мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20.

[0110] Другие иллюстративные варианты полипептида LukB иммуногенной композиции предусматривают любой из белков LukB с последовательностями под SEQ ID NO: 40—51, которые предусматривают описанные аминокислотные замены остатков, которые соответствуют Val53, Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39.

[0111] В таблице 2 ниже приведены иллюстративные варианты аминокислотных последовательностей LukB иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе.

Таблица 2. Иллюстративные аминокислотные последовательности полипептида LukB

SEQ ID NO	Название	Описание
15	LukB CC8 WT	KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSL QFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNS TLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRE VKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQ PSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINMGGHDHTRQL TNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVT VSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEF KIDWNRHGFWGYWGENHVVDKKEEKLSALYEVDW KTHNVKFKVLNDNEKK
16	LukB CC45 WT	EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSL QFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLKILNPNGYWNS TLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRE VKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKEKNYSETISYQ QPSYRTLIDQPTTNKGVAVKVEAHSINMGGHDHTRQ LTNDSDDR VKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPV TVSEGFNPEFLAVMSHDKNDKGSRFIVHYKRSMDD FKLDWNKHGFWGYWGENHVVDQKKEEKLSALYEVD WKTHDVKLIKTFNDKEKK
17	LukB CC8 Val53Leu	KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSL QFNFLTEPNYDKETLFIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNS TLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRE VKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQ PSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINMGGHDHTRQL TNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVT VSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEF KIDWNRHGFWGYWGENHVVDKKEEKLSALYEVDW KTHNVKFKVLNDNEKK
18	LukB CC45 Val53Leu	EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSL QFNFLTEPNYDKETLFIKAKGTIGSGLKILNPNGYWNS

SEQ ID NO	Название	Описание
		TLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKEKNYSETISYQQPSYRTLIDQPTTNKGVAVKVEAHSINNMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKNDK GKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKLSALYEVDWKTHDVKLIKTFNDKEKK
19	LukB CC8 Val53Leu, Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys	KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLT <u>C</u> PNYDKET <u>L</u> FIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDCSREVKYTYGYK <u>C</u> GGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSY <u>C</u> TLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNR TKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHNVKFKVLNDNEKK
20	LukB CC45 Val53Leu, Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys	EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSLQFNFLT <u>C</u> PNYDKET <u>L</u> FIKAKGTIGSGLKILNPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDCSR EVKYTYGYK <u>C</u> GGDFSINRGGLTGNITKEKNYSETISYQQPSY <u>C</u> TLLDQPTTNKGVAVKVEAHSINNMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKNDK GKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKLSALYEVDWKTHDVKLIKTFNDKEKK
21	Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys LukB из CC8	KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLT <u>C</u> PNYDKET <u>V</u> FIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDCSREVKYTYGYK <u>C</u> GGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSY <u>C</u> TLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNR TKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKTHNVKFKVLNDNEKK
22	LukB CC45 Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys	EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSLQFNFLT <u>C</u> PNYDKET <u>V</u> FIKAKGTIGSGLKILNPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDCSR EVKYTYGYK <u>C</u> GGDFSINRGGLTGNITKEKNYSETISYQQPSY <u>C</u> TLLDQPTTNKGVAVKVEAHSINNMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKNDK GKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKLSALYEVDWKTHDVKLIKTFNDKEKK

Стафилококковые полипептиды белка А (SpA) иммуногенной композиции

[0112] Иммуногенная композиция, описанная в данном документе, содержит полипептид белка А *S. aureus*. Термины «белок А» или «SpA» используют в данном документе взаимозаменяемо, и они относятся к заякоренному в клеточной стенку

5 поверхностному белку *S. aureus*, функция которого заключается в обеспечении уклонения бактерий от врожденного и приобретенного иммунных ответов у инфицируемого хозяина. Белок А может связывать иммуноглобулины в их Fc-части, может взаимодействовать с доменом V_{H3} рецепторов В-клеток, ненадлежащим образом стимулируя пролиферацию и апоптоз В-клеток, может связывать домены фактора А1 фон Виллебранда, активируя внутриклеточное свертывание, а также может связываться

10 с рецептором-1 TNF, внося свой вклад в патогенез стафилококковой пневмонии.

[0113] У большинства штаммов *S. aureus* экспрессируется структурный ген белка А (SpA), хорошо охарактеризованного фактора вирулентности, продукт которого, представляющий собой заякоренный в клеточной стенке поверхностный

15 белок (SpA), охватывает пять высокомолекулярных иммуноглобулинсвязывающих доменов, обозначенных E, D, A, B и C. Иммуноглобулиновые домены, которые характеризуются ~80% идентичностью на аминокислотном уровне, имеют длину от 56 до 61 остатка и организованы в виде tandemных повторов. Каждый из иммуноглобулинсвязывающих доменов состоит из антипараллельных α-спиралей,

20 которые собираются в трехспиральный пучок и связывают Fc-домен иммуноглобулина G (IgG), тяжелую цепь V_{H3} (Fab) IgM, фактор фон Виллебранда в его домене А1 и рецептор 1 фактора некроза опухоли α (TNF-α) (TNFR1).

[0114] SpA препятствует фагоцитозу стафилококков нейтрофилами за счет связывания Fc-компонента IgG. Кроме того, SpA способен активировать

25 внутрисосудистое свертывание путем связывания с доменами фактора А1 фон Виллебранда. Белки плазмы крови, такие как фибриноген и фибронектин, выполняют роль мостиков между стафилококками (ClfA и ClfB) и интегрином GPIIb/IIIa тромбоцитов, активность которого дополняется за счет ассоциации SpA посредством vWF А1, что позволяет стафилококкам захватывать тромбоциты с помощью

30 рецептора GPIIb-α тромбоцита. SpA также связывает TNFR1, и это взаимодействие вносит свой вклад в патогенез стафилококковой пневмонии. SpA активирует передачу провоспалительных сигналов посредством TNFR1-опосредованной активации TRAF2, киназы p38/c-Jun, митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) и Rel-транскрипционного фактора NF-κB. Связывание SpA дополнительно индуцирует

выделение TNFR1, активной молекулы, которая, по-видимому, нуждается в участии TNF-конвертирующего фермента (TACE). Каждая из раскрытых активностей опосредована пятью IgG-связывающими доменами и может быть нарушена посредством тех же аминокислотных замен, которые были первоначально определены в качестве необходимых для взаимодействия между белком А и IgG1 человека (Cedergren et al., (1993)).

[0115] SpA также играет роль суперантигена В-клеток, захватывая Fab-область V_H3-содержащего IgM, рецептора В-клеток. После внутривенного заражения при наличии мутаций в стафилококковом SpA демонстрируется снижение стафилококковой нагрузки в тканях органов и резкое снижение способности образовывать абсцессы.

[0116] В любом варианте осуществления полипептид SpA иммуногенной композиции представляет собой полипептид SpA дикого типа (не являющийся вариантом). В любом варианте осуществления полипептид SpA предусматривает по меньшей мере один предназначенный для IgG домен SpA – А, В, С, D или Е. В любом варианте осуществления полипептид SpA предусматривает по меньшей мере домен А из SpA. В любом варианте осуществления домен А из SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 55 или 48. В любом варианте осуществления полипептид SpA предусматривает по меньшей мере домен В из SpA. В любом варианте осуществления домен В из SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 56 или 49. В любом варианте осуществления полипептид SpA предусматривает по меньшей мере домен С из SpA. В любом варианте осуществления домен С из SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57 или 50. В любом варианте осуществления полипептид SpA предусматривает по меньшей мере домен D из SpA. В любом варианте осуществления домен D из SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 58 или 51. В любом варианте осуществления полипептид SpA предусматривает по меньшей мере домен Е из SpA. В любом варианте осуществления домен Е из SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59 или 52. В любом варианте осуществления полипептид SpA предусматривает по меньшей мере два предназначенные для IgG домена SpA, по меньшей мере три предназначенные для IgG домена SpA, по меньшей мере четыре предназначенные для IgG домена SpA или все пять предназначенных для IgG доменов SpA. В любом варианте осуществления полипептид SpA

предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 53 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 53. Иллюстративные домены из SpA и полноразмерные последовательности представлены в приведенной ниже таблице 3.

[0117] В любом варианте осуществления полипептид SpA иммуногенной композиции представляет собой вариант полипептида SpA. Как упоминается в данном документе, термины «вариант белка А», «вариант SpA», «вариант полипептида белка А» и «вариант полипептида SpA» относятся к полипептиду, содержащему предназначенный для IgG домен из SpA, предусматривающий наличие по меньшей мере одной аминокислотной замены, которая нарушает связывание с Fc и V_{H3}. В определенных вариантах осуществления вариант полипептида SpA предусматривает вариант домена А, вариант домена В, вариант домена С, вариант домена D и/или вариант домена Е. Подходящие варианты полипептидов SpA включают те варианты и их фрагменты, которые не токсичны и стимулируют иммунный ответ на белок А бактерий рода *Staphylococcus* и белки, подобные белку А, и/или бактерии, которые их экспрессируют.

[0118] В данном документе описаны варианты полипептида SpA, которые не связываются с иммуноглобулинами и, следовательно, представляют собой нецитотоксические варианты полипептида SpA дикого типа. Варианты полипептида SpA не токсичны и стимулируют гуморальные иммунные ответы для защиты от стафилококковой инфекции и стафилококкового заболевания.

[0119] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции представляет собой полноразмерный вариант SpA, содержащий по меньшей мере один вариант домена Е, D, А, В или С. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:60 или 61. В любом варианте осуществления

вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:54.

[0120] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает фрагмент полноразмерного полипептида SpA. Фрагмент варианта полипептида SpA может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или более IgG-связывающих доменов. IgG-связывающие домены могут, например, представлять собой 1, 2, 3, 4, 5 или более вариантов доменов A, B, C, D и/или E.

[0121] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает 1, 2, 3, 4, 5 или более вариантов домена A. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает 1, 2, 3, 4, 5 или более вариантов домена B. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает 1, 2, 3, 4, 5 или более вариантов домена C. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает 1, 2, 3, 4, 5 или более вариантов домена D. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает 1, 2, 3, 4, 5 или более вариантов домена E.

[0122] В любом варианте осуществления вариант домена A полипептида SpA, например, предусматривает одну или более аминокислотных замен в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 55 или 48. Вариант домена B, например, предусматривает одну или более аминокислотных замен в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 56 или 49. Вариант домена C, например, предусматривает одну или более аминокислотных замен в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 57 или 50. Вариант домена D, например, предусматривает одну или более аминокислотных замен в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 58 или 51. Вариант домена E, например, предусматривает одну или более аминокислотных замен в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 59 или 52.

[0123] В определенных вариантах осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает варианты доменов E, D, A, B и/или C, которые предусматривают аминокислотную последовательность, характеризующуюся 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%

идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO:59 или 52, SEQ ID NO:58 или 51, SEQ ID NO:55 или 48, SEQ ID NO:56 или 49 и SEQ ID NO:57 или 50 соответственно.

[0124] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает вариант домена E, предусматривающий замену в аминокислотном положении 6, 7, 33 и/или 34 в последовательности под SEQ ID NO: 59. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает вариант домена D, предусматривающий замену в аминокислотном положении 9, 10, 36 и/или 37 в последовательности под SEQ ID NO:58. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает вариант домена A, предусматривающий замену в аминокислотном положении 7, 8, 34 и/или 35 в последовательности под SEQ ID NO:55. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает вариант домена B, предусматривающий замену в аминокислотном положении 7, 8, 34 и/или 35 в последовательности под SEQ ID NO:56. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает вариант домена C, предусматривающий замену в аминокислотном положении 7, 8, 34 и/или 35 в последовательности под SEQ ID NO:57. Аминокислотные замены в вариантах доменов E, D, A, B и/или C описаны в WO2011/005341 и WO2020232471, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0125] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает одну или более аминокислотных замен в связывающемся с Fc IgG субдомене домена D из SpA и/или по соответствующим аминокислотным положениям в других доменах IgG. Одна или более аминокислотных замен могут препятствовать связыванию варианта полипептида SpA с Fc IgG или уменьшать таковое. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA дополнительно предусматривает одну или более аминокислотных замен в связывающемся с V_{H3} субдомене домена D из SpA и/или по соответствующим аминокислотным положениям в других предназначенных для IgG доменах. Одна или более аминокислотных замен могут препятствовать связыванию с V_{H3} или уменьшать таковое.

[0126] Вышеупомянутые аминокислотные замены в домене D из SpA (т. е. замены в области субдомена, связывающегося с Fc IgG, или области субдомена, связывающейся с V_{H3}) могут быть включены в домены A, B, C и/или E из SpA по соответствующим положениям каждого домена. Соответствующие положения

определяют путем выравнивания домена D из SpA с доменами A, B, C и/или E из SpA для определения того, какие остатки доменов A, B, C и/или E из SpA соответствуют остаткам варианта D из SpA. Например, аминокислотная замена по остатку глутамина в положении 9 в последовательности под SEQ ID NO: 58 домена D из SpA

5 соответствует остатку глутамина в положении 7 в последовательности под SEQ ID NO: 55 домена A из SpA, остатку глутамина в положении 7 в последовательности под SEQ ID NO: 56 домена B из SpA, остатку глутамина в положении 7 в последовательности под SEQ ID NO: 57 домена C из SpA и остатку глутамина в положении 6 в последовательности под SEQ ID NO: 59 домена E из SpA. Таким

10 образом, описанные в данном документе идентифицированные аминокислотные вариации можно применять универсально в отношении соответствующих аминокислотных остатков любой аминокислотной последовательности домена из SpA, которая известная на данный момент или будет известна в будущем.

[0127] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA

15 иммуногенной композиции предусматривает (a) одну или более аминокислотных замен в связывающемся с Fc IgG субдомене домена D из SpA и/или по соответствующим аминокислотным положениям других предназначенных для IgG доменов; и (b) одну или более аминокислотных замен в связывающемся с V_{H3}

субдомене домена D из SpA и/или по соответствующим аминокислотным положениям

20 других предназначенных для IgG доменов. Одна или более аминокислотных замен снижают связывание варианта полипептида SpA с Fc и V_{H3} IgG таким образом, что вариант полипептида SpA характеризуется сниженной токсичностью в организме хозяина или таковая устраняется.

[0128] В любом варианте осуществления аминокислотные остатки F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 и/или K35 связывающегося с Fc IgG субдомена домена D из SpA под SEQ ID NO: 58 модифицированы или заменены таким образом, что

25 обеспечивается снижение или устранение связывания с Fc IgG. В любом варианте осуществления соответствующие модификации включены в домены A, B, C и/или E из SpA. Соответствующие положения определяются путем выравнивания домена D из SpA с доменами A, B, C и/или E из SpA для определения остатков в доменах A, B, C

30 и/или E из SpA, которые соответствуют представляющим интерес остаткам в домене D из SpA.

[0129] В любом варианте осуществления аминокислотные остатки Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43 и/или E47 связывающегося с V_{H3} субдомена домена D

из SpA под SEQ ID NO: 58 модифицированы или заменены таким образом, что обеспечивается снижение или устранение связывания с V_{H3}. Соответствующие модификации могут быть включены в домены A, B, C и/или E из SpA.

[0130] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более вариантов домена D. Варианты домена D могут предусматривать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более замен или модификаций аминокислотных остатков. Замены или модификации аминокислотных остатков могут, например, иметь место по аминокислотным остаткам F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 и/или K35 связывающегося с Fc IgG субдомена домена D из SpA (SEQ ID NO: 58) и/или по аминокислотным остаткам Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43 и/или E47 связывающегося с V_{H3} субдомена домена D из SpA (SEQ ID NO: 58). В любом варианте осуществления замена или модификация аминокислотного остатка приходится на аминокислотные остатки Q9 и Q10 в последовательности под SEQ ID NO: 58. В любом варианте осуществления замена или модификация аминокислотного остатка приходится на аминокислотные остатки D36 и D37 в последовательности под SEQ ID NO: 58. Аминокислотные замены в вариантах домена A, B, C, D и/или E описаны в WO2011/005341, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0131] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% (но не 100%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 53 или 72. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью с последовательностью под ID NO: 53 или 72, или фрагмент из по меньшей мере n последовательных аминокислот из последовательности под SEQ ID NO: 53 или 72, где n составляет по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225, по меньшей мере 250, по меньшей мере 275, по меньшей мере 300, по меньшей мере 325, по меньшей мере 350, по меньшей мере 375, по меньшей мере 400 или по

меньшей мере 425 аминокислот. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA может предусматривать делецию одной или более аминокислот с карбокси (С)-конца (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 35 аминокислот) и/или делецию одной или более аминокислот с амино (N)-конца (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, или 35 аминокислот) последовательности под SEQ ID NO: 72. В любом варианте осуществления удалены конечные 35 С-концевых аминокислот. В определенных вариантах осуществления удалены первые 36 N-концевых аминокислот. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотные остатки 37-327 из последовательности под SEQ ID NO: 72.

[0132] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает все пять IgG-связывающих доменов SpA, которые будучи расположены от N-конца к С-концу предусматривают по порядку домен E, домен D, домен A, домен B и домен C. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает последовательно домены E, D, A, B и C из SpA. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает 1, 2, 3, 4, или 5 природных доменов E, D, A, B и/или C. В вариантах осуществления, в которых удалены 1, 2, 3, 4 или 5 природных доменов, вариант полипептида SpA может предупреждать чрезмерное размножение и апоптоз В-клеток, которые могут произойти, если SpA выполняет роль В-клеточного суперантигена. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает только домен E из SpA. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает только домен D из SpA. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает только домен A из SpA. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает только домен B из SpA. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает только домен C из SpA.

[0133] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает мутации по меньшей мере одного из одиннадцати (11) дипептидных повторов последовательности относительно последовательности под SEQ ID NO: 72 (например, дипептидного повтора QQ и/или дипептидного повтора DD). В качестве примера, вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:73, где дипептидные повторы XX в аминокислотных положениях 7 и 8, 34 и 35, 60 и 61, 68 и 69, 95 и 96, 126 и 127, 153 и 154, 184 и 185, 211 и 212, 242 и 243 и в 269 и 270

заменены для снижения аффинности варианта полипептида SpA к иммуноглобулинам. Применимые дипептидные замены для дипептида Gln-Gln (QQ) могут включать без ограничения дипептид Lys-Lys (KK), Arg-Arg (RR), Arg-Lys (RK), Lys-Arg (KR), Ala-Ala (AA), Ser-Ser (SS), Ser-Thr (ST) и Thr-Thr (TT).

5 Предпочтительно дипептид QQ заменен дипептидом KR. Пригодные дипептидные замены для дипептида Asp-Asp (DD) могут включать без ограничения дипептиды Ala-Ala (AA), Lys-Lys (KK), Arg-Arg (RR), Lys-Arg (KR), His-His (HH) и Val-Val (VV). Дипептидные замены могут, например, снижать аффинность варианта полипептида SpA к Fc-части IgG человека и Fab-части VH3-содержащих рецепторов В-клеток человека.

10 **[0134]** Таким образом, в любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции может содержать последовательность под SEQ ID NO:78, где один или более, предпочтительно все 11 из дипептидных повторов XX заменены аминокислотами, которые отличаются от соответствующих дипептидов под

15 SEQ ID NO:72. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает последовательность под SEQ ID NO:79, где дублет аминокислот в положениях 60 и 61 представляет собой Lys и Arg (K и R) соответственно. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает

20 последовательность под SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 81. В определенных вариантах осуществления вариант полипептида SpA предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 75, где предпочтительным примером последовательности под SEQ ID NO: 75 является последовательность под SEQ ID NO: 76 или SEQ ID NO: 77 (SEQ ID NO: 77 представляет собой SEQ ID NO: 76 с N-концевым метионином).

25 **[0135]** В любом варианте осуществления N-конец варианта полипептида SpA содержит делецию первых 36 аминокислот из последовательности под SEQ ID NO:72, а С-конец содержит делецию последних 35 аминокислот из последовательности под SEQ ID NO:72. Вариант полипептида SpA, предусматривающий N-концевую делецию 36 аминокислот из последовательности под SEQ ID NO:72 и С-концевую делецию 35

30 аминокислот из последовательности под SEQ ID NO:72, может дополнительно предусматривать делецию пятого Ig-связывающего домена (т. е. ниже Lys-327 в последовательности под SEQ ID NO:72). Данный вариант SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:73, где дипептиды XX могут быть заменены аминокислотами, так чтобы аминокислоты отличались от

соответствующих дипептидных последовательностей в последовательности под SEQ ID NO:72. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает последовательность под SEQ ID NO:74.

[0136] В любом варианте осуществления, как отмечено выше, вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает 1, 2, 3 или 4 природных домена A, B, C, D и/или E. Например, вариант полипептида SpA может содержать только домен E из SpA, но не домены D, A, B или C. Таким образом, вариант полипептида SpA может содержать вариант домена E из SpA, при этом домен E из SpA предусматривает замену по меньшей мере одному аминокислотному остатку в последовательности под SEQ ID NO: 83. Замена может иметь место, например, по аминокислотным положениям 60 и 61 в последовательности под SEQ ID NO: 83. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA может содержать последовательность под SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO:81 или SEQ ID NO:82. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA может предусматривать последовательность под SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81 или SEQ ID NO:82 с по меньшей мере одной аминокислотной заменой. Варианты полипептида SpA описаны в WO2015/144653, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0137] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает аминокислотную замену по аминокислотам 43Q, 44Q, 96Q, 97Q, 162Q, 163Q, 220Q, 221Q, 278Q и 279Q в последовательности под SEQ ID NO:84. Аминокислотная замена по аминокислотам 43Q, 44Q, 96Q, 97Q, 162Q, 163Q, 220Q, 221Q, 278Q и 279Q в последовательности под SEQ ID NO:84 может представлять собой, например, замену на лизин (K) или аргинин (R). В определенных вариантах осуществления вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную замену по аминокислотам 70D, 71D, 131D, 132D, 189D, 190D, 247D, 248D, 305D и 306D в последовательности под SEQ ID NO:84. Аминокислотная замена по аминокислотам 70D, 71D, 131D, 132D, 189D, 190D, 247D, 248D, 305D и 306D в последовательности под SEQ ID NO:84 может представлять собой, например, замену на аланин (A) или валин (V). В определенных вариантах осуществления вариант полипептида SpA может быть выбран из последовательностей под SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:87 и SEQ ID NO: 100. Варианты полипептида SpA описаны в US2016/0304566, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0138] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает вариант домена A, например вариант домена A, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62, 67, 88 или 93 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 62, 67, 88 или 93. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает вариант домена B, например вариант домена B, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63, 68, 89 или 94 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 63, 68, 89 или 94. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает вариант домена C, например вариант домена C, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, 69, 90 или 95 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 64, 69, 90 или 95. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает вариант домена D, например вариант домена D, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66, 71, 91 или 96 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 66, 71, 91 или 96. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает вариант домена E, например вариант домена E, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65, 70, 92 или 97 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 65, 70, 92 или 97.

[0139] В любом варианте осуществления вариант домена A из варианта полипептида SpA иммуногенной композиции может, например, предусматривать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:62. Вариант домена B может, например, предусматривать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:63. Вариант домена C может, например, предусматривать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:64. Вариант домена D может, например, предусматривать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:66. Вариант

домена E может, например, предусматривать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:65.

[0140] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции может предусматривает вариант домена A, B, C, D и E, который может предусматривать аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO:62 или 67, SEQ ID NO:63 или 68, SEQ ID NO:64 или 69, SEQ ID NO:66 или 71 и SEQ ID NO:65 или 70 соответственно.

[0141] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции может предусматривать вариант домена A, B, C, D и E, который может предусматривать аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO:88 или 93, SEQ ID NO:89 или 94, SEQ ID NO:90 или 95, SEQ ID NO:91 или 96 и SEQ ID NO:92 или 97 соответственно.

[0142] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает вариант домена D, где вариант домена D предусматривает замену по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9, 10 и/или 33 в последовательности под SEQ ID NO:58.

[0143] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает (i) замены остатков аминокислоты глутамин на лизин в каждом из доменов A-E из SpA по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 домена D из SpA (SEQ ID NO:58); и (ii) замену остатка аминокислоты серин на глутамат в каждом из доменов A-E из SpA по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 домена D из SpA (SEQ ID NO:58). Вариант полипептида SpA, по сравнению с отрицательным контролем, не обеспечивает выявляемого сшивания IgG и IgE в крови и/или не

активирует базофилы. По причине отсутствия выявляемого перекрестного сшивания IgG и IgE в крови и/или активации базофилов вариант полипептида SpA не создает значительной проблемы в плане безопасности или токсичности для пациентов-людей и/или не создает значительного риска анафилактического шока у пациента-человека.

5 **[0144]** В любом варианте осуществления представленная в виде K_A аффинность связывания описанного в данном документе варианта полипептида SpA с V_{H3} из IgG человека снижена по сравнению с таковой у варианта полипептида SpA (SpA_{KKAA}), предусматривающего замены остатков глутамина на лизин в каждом из доменов A-E из SpA, соответствующие положениям 9 и 10 домена D из SpA (SEQ ID NO:58), и замены аспарагиновой кислоты на аланин в доменах A-E из SpA, соответствующие положениям 36 и 37 домена D из SpA (SEQ ID NO:58). Вариант полипептида SpA, предусматривающий замены глутамина на лизин в каждом из доменов A-E по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 домена D (SEQ ID NO: 58), и замены аспарагиновой кислоты на аланин в каждом из доменов A-E по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 36 и 37 домена D, в каждом случае используется в качестве компаратора и называется SpA_{KKAA} . Вариант полипептида SpA_{KKAA} характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:54. В определенных вариантах осуществления вариант полипептида SpA характеризуется представленной в виде K_A аффинностью связывания с V_{H3} из IgG человека, которая снижена в по меньшей мере два раза (в 2 раза) по сравнению с таковой у SpA_{KKAA} . В определенных вариантах осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции характеризуется представленной в виде K_A аффинностью связывания с V_{H3} из IgG человека, которая снижена в по меньшей мере 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3 или более раз или в любое промежуточное значение раз по сравнению с таковой SpA_{KKAA} . В определенных вариантах осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции характеризуется представленной в виде K_A аффинностью связывания с V_{H3} из IgG человека, которая снижена на по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300% или более или на любое промежуточное значение по сравнению с таковой SpA_{KKAA} . В определенных вариантах осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции характеризуется представленной в виде K_A аффинностью связывания с V_{H3} из IgG человека, которая составляет менее приблизительно $1 \times 10^5 M^{-1}$. В

определенных вариантах осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции характеризуется представленной в виде K_A аффинностью связывания с V_{H3} из IgG человека, которая составляет 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, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или $0,1 \times 10^5 M^{-1}$ или любое промежуточное значение. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции не предусматривает наличие замен ни в одном из доменов A-E из SpA, соответствующих положениям 36 и 37 домена D из SpA (SEQ ID NO: 58).

[0145] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает (i) замены остатков аминокислоты глутамин на лизин в каждом из доменов A-E из SpA в положениях, соответствующих положениям 9 и 10 домена D из SpA (SEQ ID NO:58); и (ii) замену остатка аминокислоты серин на глутамат в каждом из доменов A-E из SpA в положениях, соответствующих положению 33 домена D из SpA (SEQ ID NO:58). В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает домен E из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 65. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает домен D из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 66. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает домен A из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%

идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 62. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает домен В из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 63. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает домен С из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 64. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 60. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60.

[0146] В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает (i) замены остатков аминокислоты глутамин на лизин в каждом из доменов А-Е из SpA в положениях, соответствующих положениям 9 и 10 домена D из SpA (SEQ ID NO:58); и (ii) замену остатка аминокислоты серин на треонин в каждом из доменов А-Е из SpA в положениях, соответствующих положению 33 домена D из SpA (SEQ ID NO:58). В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает домен Е из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 70 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%,

по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 70. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции

5 предусматривает домен D из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 71 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%

10 идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 71. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает домен A из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 67 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по

15 меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 67. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции

20 предусматривает домен B из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 68 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 68. В любом варианте

25 осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает домен C из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 69 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по

30 меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 69. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции

предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере по

5 меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 61. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA иммуногенной композиции предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61.

10 **[0147]** Вариант полипептида SpA, по сравнению с отрицательным контролем, не обеспечивает выявляемого сшивания IgG и IgE в крови и/или не активирует базофилы. По причине отсутствия выявляемого перекрестного сшивания IgG и IgE в крови и/или активации базофилов вариант полипептида SpA не создает значительной проблемы в плане безопасности или токсичности для пациентов-людей или не создает значительного риска анафилактического шока у пациента-человека. Варианты полипептида SpA, подходящие для применения в композициях и способах, раскрытых в данном документе, описаны в WO 2020232471, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

15 **[0148]** В представленной ниже таблице 3 приведены иллюстративные аминокислотные последовательности полипептида SpA иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе.

20 **Таблица 3. Иллюстративные аминокислотные последовательности полипептида SpA**

SEQ ID NO	Название	Описание
48	Длинный домен А из SpA WT	ADNNFNKEQQ NAFYEILNMPNLNEEQRNGF IQSLKDDPSQ SANLLSEAKKLNESQAPK
49	Длинный домен В из SpA WT	ADNKFNKEQQ NAFYEILHLPNLNEEQRNGF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKKLNDAQAPK
50	Длинный домен С из SpA WT	ADNKFNKEQQ NAFYEILHLPNLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKEILAEAKKLNDAQAPK
51	Длинный домен D из SpA WT	ADAQQNFNK DQQSAFYEILNMPNLNEAQR NGFIQSLKDD PSQSTNVLGEAKKLNESQAPK
52	Длинный домен Е из SpA WT	AQHDEAQQNA FYQVLNMPNLNADQRNGFIQ SLKDDPSQSA NVLGEAQKLNDSQAPK
53	Полноразмерный SpA WT	AQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSA NVLGEAQKLNDSQAPKADAQQNFNKDDQQSAFYEILNMP NLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAQQLNESQAPKAD

SEQ ID NO	Название	Описание
		NNFNKEKKNAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAQQLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAQQLNDAQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDDAQAPK
54	Полноразмерный SpA _{KKAA}	AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVLGEAQKLNDNSQAPKADAQQNNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEKKNAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLAEAQQLNDAQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAEAKKLNDDAQAPK
55	Домен А из SpA WT	NNFNKEQQNAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNES
56	Домен В из SpA WT	NKFNKEQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAQKLND
57	Домен С из SpA WT	NKFNKEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLND
58	Домен D из SpA WT	QQNNFNKDDQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNES
59	Домен E из SpA WT	QHDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLND
60	SpAS33E	AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQELKDDPSQSANVLGEAQKLNDNSQAPKADAQQNNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQELKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEKKNAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQELKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQELKDDPSQSANLLAEAQKLNDDAQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQELKDDPSVSKEILAEAKKLNDDAQAPK
61	SpAS33T	AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQTLKDDPSQSANVLGEAQKLNDNSQAPKADAQQNNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQTLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEKKNAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQTLKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQTLKDDPSQSANLLAEAQKLNDDAQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQTLKDDPSVSKEILAEAKKLNDDAQAPK
62	Домен А из SpA _{S33E}	NNFNKEKKNAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQELKDDPSQSANLLSEAKKLNES
63	Домен В из SpA _{S33E}	NKFNKEKKNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQELKDDPSQSANLLAEAQKLND
64	Домен С из SpA _{S33E}	NKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQELKDDPSVSKEILAEAKKLND
65	Домен E из SpA _{S33E}	QHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQELKDDPSQSANVLGEAQKLND
66	Домен D из	QQNNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQELKDDPSQS

SEQ ID NO	Название	Описание
	SpA _{S33E}	TNVLGEAKKLNES
67	Домен А из SpA _{S33T}	NNFNKEKKNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQTLKDDPSQSANLLSEAKKLNES
68	Домен В из SpA _{S33T}	NKFNKEKKNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQTLKDDPSQSANLLAEAKKLNDA
69	Домен С из SpA _{S33T}	NKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQTLKDDPSVSKEILAEAKKLNDA
70	Домен Е из SpA _{S33T}	QHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQTLKDDPSQSANVLGEAQKLNDS
71	Домен D из SpA _{S33T}	QQNNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQTLKDDPSQSTNVLGEAKKLNES
72	Длинный SpA	MKKKNIYSIRKLGVGIASVTLGTLLISGGVTPAANAQHQDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQLNDSQAPKADAQQNNFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDAQAPKEEDNKNKPGKEDNKNKPGKEDNKNKPGKEDNKNKPGKEDGNKPGKEDNKKPGKEDGNKPGKEDGNKPGKEDGNVHVVKPGDVTNDIAKANGTTADKIAADNKLADKNMIKPGQELVVDKKQAPANHADANKAQALETGEENPFIGTTVFGLSLALGAALLAGRREL
73	SpAXX	AQHDEAXXNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKXXPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAQQNNFNKDXSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKXXPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEXXNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKXXPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEXXNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKXXPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKFNKEXXNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKXXPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK
74	SpAkkAA	AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAQQNNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEKKNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK
75	SpAkr	AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAXNPNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEKKNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK

SEQ ID NO	Название	Описание
76	SpAkR	AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVNLGEAQKLNDSQAPKADAKRNNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADN FNKEKKNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLL SEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLNEEQRN GFIQSLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPKADNKFNKEKK NAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAEAKKLN DAQAPK
77	SpAkR	MAQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQ SANVNLGEAQKLNDSQAPKADAKRNNFNKDKKSAFYEILNM PNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKAD NNFNKEKKNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSAN LLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLNEEQ RNFQIQLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPKADNKFNKE KKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAEAKK LNDAAQAPK
78	SpAkR	AQHDEAXXNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKXXPSQSA NVLGEAQKLNDSQAPKADAXXNNFNKDXXSAFYEILNMPN LNEAQRNGFIQSLKXXPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNN FNKEXXNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKXXPSQSANLL SEAKKLNESQAPKADNKFNKEEXXNAFYEILHLPNLNEEQRN GFIQSLKXXPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPKADNKFNKEEX NAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKXXPSVSKEILAEAKKLN DAQAPK
79	Домен E из SpAkR	AQHDEAXXNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKXXPSQSA NVLGEAQKLNDSQAPKADAXXNNFNKD
80	Домен E из SpAkR	AQHDEAXXNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKXXPSQSA NVLGEAQKLNDSQAPKADAKRNNFNKD
81	Домен E из SpAkR	AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSA NVLGEAQKLNDSQAPKADAKRNNFNKD
82	Домен E из SpA	MAQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQ SANVNLGEAQKLNDSQAPKADAKRNNFNKD
83	Домен E из SpA	AQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSA NVLGEAQKLNDSQAPKADAQQNNFNKD
84	SpA 252	MKKKNIIYSIRKLG VGIASVTLGTLLISGGVTPAANA AQHDE AQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVNLGE AQKLNDSQAPKADAQQNKFNKDQQSAFYEILNMPNLNEEQ RNFQIQLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEQ QNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKK LNESQAPKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQS LKDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPKADNKFNKEQQNAFYE ILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDAAQAP KEEDNNKPGKEDNNKPGKEDGNKPGKEDNKKPGKEDGNK PGKEDNKKPGKEDGNKPGKEDGNKPGKEDGNKPGKEDGN KPGKEDGNKPGKEDGNVHVVKPGD TVNDIAKANGTTAD KIAADNKLADKNMIKPGQELVVDKKQ PANHADANKA QAL PETGEENPFIGTTVFGGLSLALGAALLAGRREL
85	SpA5	GPLGSAQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAA

SEQ ID NO	Название	Описание
	(ККАА)	PSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAKKNKFNKDQQSAFYEI LNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAP KADNNFNKEKKNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQ SANLLAEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLN EEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKF NKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAE AKKLNDAQAPK
100	SpA5 (RRAA)	GPLGSAQHDEARRNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAA PSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADARRNKFNKDQQSAFYEI LNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAP KADNNFNKERRNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQ SANLLAEAKKLNESQAPKADNKFNKERRNAFYEILHLPNLN EEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKF NKERRNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAE AKKLNDAQAPK
86	SpA5 (KKVV)	GPLGSAQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKVV PSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAKKNKFNKDQQSAFYEI LNMPNLNEEQRNGFIQSLKVVPSQSTNVLGEAKKLNESQAP KADNNFNKEKKNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKVVPSQ SANLLAEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLN EEQRNGFIQSLKVVPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKF NKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKVVPSVSKEILAE AKKLNDAQAPK
87	SpA5 (RRVV)	GPLGSAQHDEARRNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKVV PSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADARRNKFNKDQQSAFYEI LNMPNLNEEQRNGFIQSLKVVPSQSTNVLGEAKKLNESQAP KADNNFNKERRNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKVVPSQ SANLLAEAKKLNESQAPKADNKFNKERRNAFYEILHLPNLN EEQRNGFIQSLKVVPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKF NKERRNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKVVPSVSKEILAE AKKLNDAQAPK
88	Длинный домен А из SpA _{S33E}	ADNNFNKEKKNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQELKDDPSQS ANLLSEAKKLNESQAPK
89	Длинный домен В из SpA _{S33E}	ADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQELKDDPSQS ANLLAEAKKLNDAQAPK
90	Длинный домен С из SpA _{S33E}	ADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQELKDDPSVS KEILAEAKKLNDAQAPK
91	Длинный домен D из SpA _{S33E}	ADAQQNNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQELKDD PSQSTNVLGE AKKLNESQAPK
92	Длинный домен Е из SpA _{S33E}	AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQELKDDPSQSA NVLGEAQKLNDSQAPK
93	Длинный домен А из	ADNNFNKEKKNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQTLKDDPSQS ANLLSEAKKLNESQAPK

SEQ ID NO	Название	Описание
	SpA _{S33T}	
94	Длинный домен В из SpA _{S33T}	ADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQTLKDDPSQS ANLLAEAKKLNDAQAPK
95	Длинный домен С из SpA _{S33T}	ADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQTLKDDPSVS KEILAEAKKLNDAQAPK
96	Длинный домен D из SpA _{S33T}	ADAQQNNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQTLKDD PSQSTNVLGE AKKLNESQAPK
97	Длинный домен E из SpA _{S33T}	AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQTLKDDPSQSA NVLGEAQKLNDSQAPK

[0149] В соответствии со всеми аспектами настоящего изобретения вариант полипептида LukA, полипептид LukB и полипептид SpA иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе, могут дополнительно содержать одну или более гетерологичных аминокислотных последовательностей. Подходящие гетерологичные аминокислотные последовательности включают без ограничения последовательности меток, иммуногены, сигнальные последовательности и т. д. Подходящие последовательности меток включают без ограничения полигистидиновую метку, полиаргининовую метку, FLAG-метку, Step-метку II, убиквитиновую метку, NusA-метку, хитинсвязывающий домен, кальмодулинсвязывающий пептид, целлюлозосвязывающий домен, Nat-метку, S-метку, SBP, мальтозосвязывающий белок, глутатион-S-трансферазу (см. работу Terpe K., «Overview of Tag Protein Fusions: From Molecular and Biochemical Fundamentals to Commercial Systems», *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:523-33 (2003), которая включена в данный документ посредством ссылки). Подходящие иммуногены включают без ограничения Т-клеточный эпитоп, В-клеточный эпитоп. Подходящие сигнальные последовательности включают без ограничения сигнальную последовательность PelB, сигнальную последовательность Sec, сигнальную последовательность Tat, сигнальную последовательность AmyE (см. работу Freudl R., «Signal Peptides for Recombinant Protein Secretion in Bacterial Expression Systems», *Microbial Cell Factories* 17:52 (2018), которая включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления полипептидов LukA, LukB и SpA, описанные в данном документе, содержат последовательность PelB

(MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAHA; SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления полипептиды LukA, LukB и SpA, описанные в данном документе, содержат His-метку (например, NSAHNNHHHGS; SEQ ID NO: 24). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полипептиды LukA и/или LukB, описанные в данном документе, содержат как вышеупомянутую последовательность PelB, так и His-метку.

Полинуклеотиды и конструкции LukA, LukB и SpA *S. aureus*

[0150] Другой аспект настоящего изобретения относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим варианты полипептидов LukA, полипептиды LukB и полипептиды SpA, которые описаны в данном документе, а также иммуногенные композиции, содержащие одну или более из данных молекул нуклеиновой кислоты. Молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в данном документе, предусматривают выделенные полинуклеотиды, рекомбинантные полинуклеотидные последовательности, части векторов экспрессии или части линейных последовательностей ДНК, включая линейные последовательности ДНК, используемые для транскрипции/трансляции *in vitro* или *in vivo*, и векторы, совместимые с экспрессией и секрецией прокариотическими и эукариотическими клетками вариантов полипептидов LukA и LukB и SpA, описанных в данном документе. Полинуклеотиды по данному изобретению могут быть получены с помощью химического синтеза, такого как твердофазный синтез полинуклеотидов на автоматическом синтезаторе полинуклеотидов, и собраны в полные однострочные или двухстрочные молекулы. Альтернативно полинуклеотиды по данному изобретению могут быть получены с помощью других методик, таких как ПЦР, с последующим стандартным клонированием. Методики продуцирования или получения полинуклеотидов заданной последовательности хорошо известны из уровня техники.

[0151] В любом варианте осуществления иммуногенная композиция, раскрытая в данном документе, содержит полинуклеотид, кодирующий вариант полипептида LukA. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант LukA, предусматривающий замену лизина на метионин по остатку, который соответствует лизину в положении 83 (Lys83Met) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий замену серина на аланин по остатку, который соответствует серину в положении 141

(Ser141Ala) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий замену валина на изолейцин по остатку, который соответствует валину в положении 113 (Val113Ile) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид LukA, предусматривающий замену валина на изолейцин по остатку, который соответствует валину в положении 193 (Val193Ile) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует соответствующий ему вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотные замены лизина на метионин, серина на аланин и валина на изолейцин по остаткам, которые соответствуют вышеупомянутым аминокислотным остаткам, т. е. Lys803Met, Ser141Ala, Val113Ile и Val193Ile в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует соответствующий ему вариант полипептида LukA, дополнительно предусматривающий аминокислотную замену, которая соответствует Glu323Ala, т. е. полинуклеотид кодирует вариант LukA, предусматривающий замены, которые соответствуют заменам Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0152] В одном варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA из CC8, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 1, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile и Glu320Ala в последовательности под SEQ ID NO: 1. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая LukA из CC8, представлена в данном документе под SEQ ID NO: 101. Соответственно, в любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вариант под SEQ ID NO: 101, где указанный вариант предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 101.

[0153] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты иммуногенной композиции представляет собой молекулу

нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 3 (Glu320Ala, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile LukA из CC8) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 103. В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 103.

[0154] В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA из CC45, например кодирующую вариант под SEQ ID NO: 2, предусматривающий аминокислотные замены, которые соответствуют Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile и Glu321Ala в последовательности под SEQ ID NO: 2. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая LukA из CC45, представлена в данном документе под SEQ ID NO: 102. Соответственно, в любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вариант под SEQ ID NO: 102, где указанный вариант предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 102.

[0155] В другом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты иммуногенной композиции представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 4 (Glu321Ala, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile LukA из CC45) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC45, предусматривает нуклеотидную последовательность,

характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 104. В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 104.

[0156] В любом варианте осуществления один или более полинуклеотидов иммуногенной композиции кодируют вариант белка или полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида LukA, предусматривающий замену тирозина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Tyr74 (Tyr74Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25, и предусматривающий замену аспарагина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Asp140 (Asp140Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида LukA, предусматривающий замену глицина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Gly149 (Gly149Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25, и предусматривающий замену глицина на цистеин по аминокислотному остатку, который соответствует Gly156 (Gly156Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида LukA, предусматривающий аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления аминокислотная замена по каждому из этих аминокислотных остатков представляет собой остаток цистеина, как описано выше.

[0157] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует вариант белка или полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323, в комбинации с аминокислотной заменой по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида LukA, предусматривающий

аминокислотные замены по аминокислотным остаткам, которые соответствуют остаткам Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323 и остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 5 (Glu320Ala, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys LukA из CC8) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 6 (LukA из CC45 с Glu321Ala, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6.

[0158] В любом варианте осуществления один или более полинуклеотидов иммуногенной композиции кодируют вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную замену или делецию по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант LukA, предусматривающий замену треонина на валин по этому остатку, который соответствует положению 249 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную замену в положении, соответствующем Thr249, в комбинации с любой или всеми аминокислотными заменами по остаткам, которые соответствуют Lys83, Ser141, Val113, Val193, Glu323, Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 7 (LukA из CC8 с Glu320Ala, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile и

Thr246Val) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 7. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 8 (LukA из CC45 с Glu321Ala, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8.

[0159] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 9 (LukA из CC8 с Glu320Ala, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Thr246Val, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys и Gly153Cys) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 9, содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 105. В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 105.

[0160] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант последовательности LukA под SEQ ID NO: 10 (LukA из CC45 с Glu321Ala, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys и Gly154Cys) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством

последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10. В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 10, содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 106. В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 106.

10 **[0161]** В любом варианте осуществления один или более полинуклеотидов иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе, дополнительно кодируют полипептид LukB, который раскрыт в данном документе. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует полипептид LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая LukB из CC8, представлена в данном документе под SEQ ID NO: 107. Соответственно, в любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вариант под SEQ ID NO: 107, где указанный вариант предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 107.

20 **[0162]** В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует полипептид LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая LukB из CC45, представлена в данном документе под SEQ ID NO: 108. Соответственно, в любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вариант под SEQ ID NO: 108, где указанный вариант предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по 30 меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 108.

[0163] В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида LukB, предусматривающий аминокислотную замену или делецию по

аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Val53 в последовательности под SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления аминокислотная замена по Val53 предусматривает замену валина на лейцин (Val53Leu).

- 5 **[0164]** В любом варианте осуществления иллюстративный полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант белка или полипептида LukB под SEQ ID NO: 17 (LukB CC8 V53L) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с
- 10 аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 17. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukB CC8 V53L, предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 109.
- 15 В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC8, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:109.

- [0165]** В любом варианте осуществления иллюстративный полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант белка или полипептида LukB под SEQ ID NO: 18 (LukB CC45 V53L) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с
- 20 аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 18. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukB CC45 V53L, предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 110.
- 25 В любом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот вариант LukA из CC45, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 110.
- 30

[0166] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует вариант белка или полипептида LukB, предусматривающий аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в

последовательности под SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления аминокислотная замена по одному или более вышеуказанным остаткам обеспечивает введение одного или более остатков цистеина, способных образовывать дисульфидную связь для стабилизации конформации гетеродимерной структуры

5 LukAB. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида LukB, предусматривающий замену глутаминовой кислоты на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Glu45 (Glu45Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39, и предусматривающий замену треонина на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Thr121 (Thr121Cys) в

10 последовательности под SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида LukB, предусматривающий замену глутаминовой кислоты на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Glu109 (Glu109Cys) в последовательности под SEQ ID NO: 39, и замену аргинина на цистеин по аминокислотному остатку, соответствующему Arg154

15 (Arg154Cys) в последовательности под SEQ ID NO:39.

[0167] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует вариант белка или полипептида LukB, предусматривающий аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в

20 последовательности под SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления аминокислотные замены по каждому из этих аминокислотных остатков предусматривают введение остатка цистеина, как описано выше. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21 (LukB из CC8 с Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID

25 NO: 21. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22 (LukB из CC45 с Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей

30

мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 22.

[0168] В любом варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует вариант белка и полипептида LukB, предусматривающий

5 аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует Val53 в последовательности под SEQ ID NO: 39, в комбинации с заменой аминокислотного остатка по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 39. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида

10 LukB, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19 (LukB из CC8 с Val53Leu, Glu45Cys, Glu109Cys, Thr121Cys и Arg154Cys) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID

15 NO: 19. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант белка или полипептида LukB, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20 (LukB из CC45 с Val53Leu, Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys) или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей

20 мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20.

[0169] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты иммуногенной композиции, которая описана в данном документе, кодирует вариант последовательности LukA из CC45 под SEQ ID NO: 4 и

25 последовательность LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB (RARPR-15), содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под

30 SEQ ID NO: 104 (вариант LukA из CC45), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 108 (LukB из CC45). Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая

этот гетеродимер LukAB, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 104, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 108.

[0170] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA из CC45 под SEQ ID NO: 4 и вариант последовательности LukB из CC45 под SEQ ID NO: 18. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB (RARPR-30), содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 104 (вариант LukA из CC45), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 110 (вариант LukB из CC45). Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 104, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 110.

[0171] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA из CC8 под SEQ ID NO: 3 и последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB (RARPR-32), содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 103 (вариант LukA из CC8), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 107 (LukB из CC8). Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID

NO: 103, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 107.

[0172] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA из CC8 под SEQ ID NO: 3 и вариант последовательности LukB из CC45 под SEQ ID NO: 18. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB (RARPR-33), содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 103 (вариант LukA из CC8), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 110 (вариант LukB из CC45). Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 103, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 110.

[0173] В любом варианте осуществления иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует вариант последовательности LukA из CC8 под SEQ ID NO: 3 и вариант последовательности LukB из CC8 под SEQ ID NO: 17. Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB (RARPR-34), содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 103 (вариант LukA из CC8), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 109 (вариант LukB из CC8). Иллюстративная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая этот гетеродимер LukAB, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 103, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 109.

[0174] Иллюстративные последовательности молекул нуклеиновой кислоты LukA и LukB по настоящему изобретению представлены ниже в таблице 4.

Таблица 4. Иллюстративные полинуклеотидные последовательности LukA и LukB

Название конструкции	SEQ ID NO:	Последовательность ДНК
CC8 LukA ^{wt}	101	GCT CAC AAA GAT TCT CAG GAT CAA AAT AAG AAG GAG CAC GTC GAC AAG TCT CAG CAG AAA GAC AAG CGT AAT GTT ACA AAC AAG GAC AAA AAC AGC ACT GCT CCA GAC GAC ATT GGA AAA AAC GGT AAG ATT ACT AAA CGC ACC GAA ACG GTA TAT GAC GAA AAA ACG AAC ATT TTG CAA AAC TTG CAG TTC GAT TTC ATT GAC GAC CCC ACT TAT GAC AAG AAT GTC CTT CTG GTG AAG AAG CAG GGC AGC ATT CAC TCA AAC TTG AAA TTT GAG TCT CAC AAG GAG GAG AAG AAC TCC AAT TGG CTG AAA TAC CCA TCA GAG TAC CAC GTT GAT TTT CAA GTG AAA CGT AAC CGC AAA ACG GAA ATT TTG GAC CAA TTG CCG AAA AAC AAG ATC TCC ACC GCG AAA GTA GAC TCA ACA TTC AGT TAC TCT TCC GGC GGA AAG TTC GAC AGC ACT AAG GGG ATC GGG CGC ACT TCT TCC AAT TCG TAC TCG AAA ACG ATT TCT TAC AAT CAG CAG AAT TAT GAC ACT ATC GCA TCT GGT AAA AAT AAT AAC TGG CAC GTG CAT TGG TCG GTG ATT GCT AAT GAT TTA AAG TAT GGA GGT GAG GTA AAA AAT CGT AAT GAC GAG CTG CTG TTT TAC CGT AAC ACT CGC ATC GCA ACC GTT GAA AAC CCG GAA TTG TCC TTT GCC TCG AAA TAC CGC TAC CCT GCA TTA GTT CGT TCA GGC TTT AAT CCC GAG TTT TTG ACT TAT CTT TCC AAT GAA AAA TCG AAC GAG AAG ACT CAG TTC GAG GTT ACG TAC ACC CGC AAT CAG GAC ATT TTG AAG AAC CGT CCG GGA ATT CAC TAT GCG CCT CCC ATC TTA GAG AAG AAT AAG GAT GGA CAA CGT TTG ATC GTT ACA TAT GAA GTT GAC TGG AAA AAT AAG ACC GTA AAG GTT GTG GAT AAG TAT TCG GAT GAT AAT AAG CCC TAT AAA GAA GGG
CC45 LukA ^{wt}	102	GCG AAC AAA GAT TCT CAG GAC CAG ACC AAA AAG GAG CAC GTA GAC AAG GCC CAG CAA AAA GAG AAG CGT AAT GTG AAC GAC AAA GAT AAG AAT ACT CCG GGG CCA GAT GAT ATC GGC AAG AAC GGT AAA GTC ACG AAG CGT ACA GTG TCT GAG TAT GAC AAA GAA ACA AAC ATC CTG CAG AAC TTA CAA TTC GAC TTT ATT GAT GAT CCA ACT TAC GAT AAG AAT GTG TTG CTG GTT AAG AAA CAA GGT TCA ATC CAT TCT AAC TTG AAG TTC GAG TCA CAC CGT AAC GAA ACG AAC GCG TCG TGG TTG AAA TAT CCG TCA GAG TAT CAT GTT GAT TTT CAA GTA CAA CGT AAT CCC AAA ACG GAA ATT TTG GAC CAA TTA CCT AAA AAT AAG ATT AGC ACC GCC AAG GTT GAC TCA ACT TTC TCC TAC TCA TTA GGA GGA

		<p>AAG TTC GAT TCG ACA AAA GGG ATC GGG CGT ACA TCT TCG AAT AGC TAC AGT AAG AGC ATT AGC TAT AAC CAG CAG AAC TAT GAT ACG ATT GCT TCA GGG AAA AAT AAC AAC CGT CAC GTA CAT TGG TCA GTG GTT GCG AAC GAT CTT AAA TAT GGA AAC GAG ATT AAG AAT CGT AAC GAC GAA TTT TTG TTT TAC CGC AAT ACA CGC CTT AGT ACC GTG GAA AAT CCC GAG CTG TCC TTC GCG TCG AAG TAT CGC TAT CCG GCC CTT GTG CGT TCG GGT TTC AAT CCC GAG TTC TTA ACA TAT ATT TCC AAT GAG AAA ACT AAC GAC AAG ACT CGC TTC GAA GTC ACC TAC ACT CGC AAC CAG GAC ATT CTG AAA AAC AAG CCT GGA ATT CAT TAC GGG CAA CCA ATT TTA GAG CAG AAT AAG GAT GGA CAG CGC TTT ATT GTG GTA TAT GAG GTG GAC TGG AAG AAT AAG ACA GTA AAA GTT GTG GAA AAG TAC TCT GAC CAG AAT AAG CCC TAT AAA GAA GGA</p>
CC8 LukAΔ10C	111	<p>GCT CAC AAA GAT TCT CAG GAT CAA AAT AAG AAG GAG CAC GTC GAC AAG TCT CAG CAG AAA GAC AAG CGT AAT GTT ACA AAC AAG GAC AAA AAC AGC ACT GCT CCA GAC GAC ATT GGA AAA AAC GGT AAG ATT ACT AAA CGC ACC GAA ACG GTA TAT GAC GAA AAA ACG AAC ATT TTG CAA AAC TTG CAG TTC GAT TTC ATT GAC GAC CCC ACT TAT GAC AAG AAT GTC CTT CTG GTG AAG AAG CAG GGC AGC ATT CAC TCA AAC TTG AAA TTT GAG TCT CAC AAG GAG GAG AAG AAC TCC AAT TGG CTG AAA TAC CCA TCA GAG TAC CAC GTT GAT TTT CAA GTG AAA CGT AAC CGC AAA ACG GAA ATT TTG GAC CAA TTG CCG AAA AAC AAG ATC TCC ACC GCG AAA GTA GAC TCA ACA TTC AGT TAC TCT TCC GGC GGA AAG TTC GAC AGC ACT AAG GGG ATC GGG CGC ACT TCT TCC AAT TCG TAC TCG AAA ACG ATT TCT TAC AAT CAG CAG AAT TAT GAC ACT ATC GCA TCT GGT AAA AAT AAT AAC TGG CAC GTG CAT TGG TCG GTG ATT GCT AAT GAT TTA AAG TAT GGA GGT GAG GTA AAA AAT CGT AAT GAC GAG CTG CTG TTT TAC CGT AAC ACT CGC ATC GCA ACC GTT GAA AAC CCG GAA TTG TCC TTT GCC TCG AAA TAC CGC TAC CCT GCA TTA GTT CGT TCA GGC TTT AAT CCC GAG TTT TTG ACT TAT CTT TCC AAT GAA AAA TCG AAC GAG AAG ACT CAG TTC GAG GTT ACG TAC ACC CGC AAT CAG GAC ATT TTG AAG AAC CGT CCG GGA ATT CAC TAT GCG CCT CCC ATC TTA GAG AAG AAT AAG GAT GGA CAA CGT TTG ATC GTT ACA TAT GAA GTT GAC TGG AAA AAT AAG ACC GTA AAG GTT GTG GAT AAG TAT</p>
CC45 LukAΔ10C	112	<p>GCAAATAAAGACTCTCAAGATCAGACTAAAAAGGAACAT GTTGATAAGGCGCAACAAAAAGAAAAGCGTAATGTCAAT GATAAGGACAAGAATACTCCGGGACCCGACGACATTGGC AAGAACGAAAGGTGACAAAGCGTACCGTTAGTGAGTAC GACAAGGAAACAAATATCCTGCAGAACTTACAGTTTCGAT TTTATTGACGATCCTACCTATGACAAGAATGTCTTGTGG</p>

		<p>TGAAGAAACAGGGCAGCATTTCATTCCAATTTAAAATTTG AAAGCCATCGTAACGAAACAAATGCATCTTGGCTTAAAT ACCCTTCTGAGTACCACGTAGATTTTCAGGTACAACGCAA CCAAAAACCGAAATTCTGGATCAACTGCCCAAGAATAA AATTTCTACGGCTAAAGTTGACAGTACATTTAGCTACAGT TTAGGGGGAAAGTTTGATAGTACAAAAGGAATTGGTCGT ACTTCCAGTAACTCCTATTTCGAAATCTATTTCTATAATC AACAGAATTACGACACCATCGCATCCGGTAAAAACAATA ATCGCCACGTACATTGGAGTGTGTCGCGAATGACTTAAA GTACGGTAACGAAATCAAGAACCGCAACGACGAATTCTT ATTCTATCGTAACACGCGTTTAAGCACCGTCGAGAACCC GAGTTATCCTTTGCTAGCAAATATCGCTATCCTGCGTTAG TACGCTCAGGGTTCAATCCTGAGTTCTTAACCTACATCTC CAACGAGAAAATAATGATAAGACACGCTTCGAGGTGAC CTACACCCGTAATCAGGATATCCTTAAAAATAAACCGGG TATTCATTACGGGCAACCCATTTTAGAACAGAATAAGGA CGGCCAACGTTTTATCGTGGTCTATGAGGTTGATTGGAAG ACAAGACAGTGAAAGTGGTTGAAAAGTAT</p>
CC8 LukA W95	103	<p>CATAAAGATTTCGCAGGATCAAATAAGAAGGAGCATGTT GACAAGAGCCAGCAGAAAGACAAGCGCAATGTTACAAA CAAAGATAAGAACTCTACAGCGCCCGATGACATTGGTAA GAACGGCAAGATAACTAAGCGGACGGAAACCGTGTATGA CGAGAAAATAACATTCTGCAAAATTTGCAATTTGACTTT ATCGACGATCCAACCTATGACAAGAATGTCTTGCTTGTC AAATGCAAGGTTGATTCATTCAAACCTTAAATTTGAATC CCACAAAGAGGAGAAAACTCTAATTGGTTAAAGTATCC TTCAGAATATCACATAGATTTCCAGGTAAAGAGAAACCG TAAAACGGAGATACTGGATCAACTGCCTAAAAACAAGAT CTCGACAGCTAAGGTGGACGCTACGTTCTCGTACTCGTCT GGTGGGAAGTTCGACTCGACCAAAGGCATTGGGCGTACA TCATCAAATAGCTATTCAAAGACTATTAGCTATAATCAGC AGAACTATGATACGATAGCTTCGGGTAAAGAATAACA GGCACGTTTCATTGGTCGATCATTGCAAATGACTTGAAGTA TGGCGGAGAGGTAAGAATCGCAACGATGAGCTGTTATT CTATCGCAATACGAGAATTGCGACTGTAGAGAACCCGGA ATTGTCTTTTGCTCCAAATATCGGTACCCGGCATTGGTA CGCTCTGGTTTCAATCCTGAGTTTTTAACTTACCTTTCAA CGAAAAGAGTAATGAGAAGACCCAATTTGAGGTTACCTA CACCCGTAACCAGGATATTTTGAAGAATCGGCCGGGCAT CCATTATGCCCCACCAATCCTGGAGAAAAATAAAGACGG TCAGCGGCTTATTGTGACTTACGAGGTCGATTGGAAAAAT AAGACGGTCAAGGTAGTGGACAAATATTCTGATGACAAT AAACCGTACAAAGCTGGC</p>
CC45 LukA W95	104	<p>GCTAATAAGGACTCCCAGGACCAGACAAAGAAGGAACA CGTCGACAAAGCCCAGCAAAAAGAAAAACGCAACGTAA ACGATAAGGACAAGAACACCCAGGACCCGATGATATTG GGAAGAACGGTAAAGTCACAAAACGCACAGTGAGCGAG TACGATAAAGAAACAAATATCCTGCAAAATCTGCAATTT GACTTCATCGATGACCCTACCTATGATAAGAATGTGTTGT TGGTTAAGATGCAGGGAAGTATTCATTCCAACCTTGAATT</p>

		<p>CGAGAGCCACCGTAACGAAACGAATGCGAGTTGGTTAAA GTACCCTTCAGAATACCACATTGATTTTCAGGTGCAGCGT AACCCGAAAACCGAAATCTTAGACCAGCTGCCTAAAAC AAGATTTCTACGGCCAAGGTGGACGCAACTTTCAGTTATA GTCTTGGAGGAAAGTTCGACAGTACCAAAGGTATCGGCC GCACATCCTCAAACAGCTATTCGAAATCCATTTCTTACAA CCAGCAAATTATGACACGATCGCCTCAGGTAAGAACAA CAATCGTCATGTGCATTGGAGCATCGTGGCTAACGATTTG AAATATGGTAACGAAATCAAAAATCGCAATGACGAGTTC TTGTTTTACCGCAATACTCGCCTTTCTACGGTAGAGAATC CTGAGCTTAGCTTTGCGAGCAAGTATCGTTACCCTGCTCT TGTACGTTCTGGGTTTCAACCCAGAGTTCCTTACTTATATC TCCAATGAGAAGACGAACGATAAAACCCGTTTTGAAGTT ACATACACGCGTAATCAGGACATCTTAAAGAATAAACCG GGGATTCATTATGGGCAGCCGATCTTAGAGCAAATAAG GATGGACAGCGTTTCATTGTAGTGTATGAGGTTGACTGGA AGAACAAGACGGTAAAAGTAGTTGAAAAGTATTCCGACC AAAACAAGCCTTATAAGGCGGGT</p>
CC8 LukA W97 W72	105	<p>CACAAAGACAGCCAGGATCAAAACAAGAAAGAGCACGT GGACAAGAGCCAGCAAAGGATAAACGTAACGTTACCA ACAAGGACAAAACAGCACCGCGCCGGACGATATCGGC AAGAACGGCAAATTACCAAGCGTACCGAGACCGTGTAC GATGAAAAAACCAACATCCTGCAGAACCTGCAATTCGAC TTTATTGACGATCCGACCTGCGATAAAAACGTGCTGCTGG TTAAGATGCAGGGCAGCATCCACAGCAACCTGAAATTCG AAAGCCACAAAGAGGAAAAGAACAGCAACTGGCTGAAG TACCCGAGCGAGTATCACATTGACTTTCAGGTGAAACGT AACCGTAAGACCGAAATCCTGGATCAACTGCCGAAGAAC AAAATTAGCACCGCGAAGGTTTGC GCGACCTTCAGCTAC AGCAGCGGTTGCAAATTTGACAGCACCAAGTGCATCGGC CGTACCAGCAGCAACAGCTATAGCAAAACCATCAGCTAC AACCAGCAAACTATGATACCATTGCGAGCGGCAAGAAC ACAACCTGGCACGTGCACTGGAGCATCATTGCGAACGAC CTGAAATACGGTGGCGAGGTTAAGAACCGTAACGATGAA CTGCTGTTCTATCGTAACACCCGTATCGCGACCGTGGAGA ACCCGGA ACTGAGCTTTGCGAGCAAATACCGTTATCCGG CGCTGGTGC GTAGCGGTTTCAACCCGGAGTTTCTGGTTTA CCTGAGCAACGAGAAAAGCAACGAAAAGACCCAGTTCG AAGTTACCTACACCCGTAACCAAGACATCTGAAGAACC GTCCGGGTATCCACTATGCTCCGCGATTCTGGAGAAGA ACAAAGATGGCCAACGTCTGATTGTGACCTATGAAGTTG ACTGGAAGAACAACCGTTAAAGTGGTTGATAAGTACA GCGACGATAACAACCGTATAAGGCGGGT</p>
CC45 LukA W97 W72	106	<p>GCAAACAAGACTCACAAGATCAGACAAAGAAAGAGCA TGTAGACAAAGCTCAACAGAAGGAAAAGCGCAATGTGA ACGACAAGGATAAAAATACTCCTGGTCCAGATGACATTG GTAAGAATGGTAAAGTTACTAAGCGGACCGTCTCTGAAT ATGATAAGGAGACAAATATTCTCCAGAATTTGCAATTCG ATTTCAATTGATGATCCGACGTGCGATAAGAACGTATTGCT CGTAAAATGCAGGGCTCCATCCATTGCAATCTCAAGTTC</p>

		<p>GAATCCCATCGCAACGAGACAAACGCTTCCTGGCTCAAA TATCCTAGCGAGTATCATATCGACTTCCAAGTTCAACGGA ACCCTAAAACCTGAAATCCTTGATCAACTCCCTAAGAACA AAATCTCAACTGCCAAGGTCTGTGCCACATTTTCTTATTC TCTTGGCTGCAAATTCGATTCAACAAAGTGTATTGGTCGT ACATCAAGTAATAGCTATAGTAAAAGCATCAGTTATAAC CAGCAAACTATGATACAATCGCGTCAGGCAAAAACAAT AATCGTCATGTCCATTGGTCCATTGTGCGGAACGACCTTA AGTACGGTAACGAAATTAAGAATCGGAACGATGAGTTTT TGTTCTATCGCAACACCCGTCTGTCTACTGTGCGAAAACCC GGAGTTGTCCTTCGCAAGTAAATATCGCTATCCTGCTTTG GTACGTTCTGGGTTTAACCCGGAATTTCTCGTCTACATCA GCAACGAGAAAACAAATGACAAAACGCGCTTTGAAGTCA CGTACACACGTAATCAGGACATCTTAAAAAATAAACAG GGATTCACTATGGTCAGCCAATCTTGGAGCAGAATAAAG ACGGCCAGCGTTTCATTGTGCTTTATGAAGTGGACTGGAA AAACAAAACCTGTTAAGGTGGTTGAGAAATATTCCGACCA AAACAAACCGTATAAGGCCGGT</p>
CC8 LukB ^{wt}	107	<p>AAAATCAATTCTGAAATTAAGCAAGTGTCCGAAAAAAT TTGGATGGAGACACGAAGATGTATACGCGTACTGCTACG ACGTCAGACTCCCAGAAGAACATTACACAGAGTCTGCAA TTTAATTTTCTGACAGAACCAAACCTATGACAAGGAACT GTCTTTATTAAGGCTAAAGGGACTATCGGAAGCGGCTTA CGCATTTTAGACCCCAACGGTTATTGGAATAGCACGCTGC GCTGGCCGGGCAGTTACTCAGTATCAATCCAAAATGTCG ATGATAACAATAACACCAATGTTACCGATTTGCCCCCAA GAACCAGGATGAATCGCGCGAGGTTAAATACACATACGG CTACAAGACAGGCGGTGACTTTAGCATCAACCGTGGGGG CTTGACAGGGAATATTACTAAGGAATCAAATTATAGTGA GACTATCTCTTATCAACAACCGTCCTATCGTACCTTATTA GACCAGAGTACCTCCCACAAAGGTGTAGGGTGGAAAGTT GAAGCGCACCTGATTAATAATATGGGTACGATCACACA CGCCAACCTGACCAACGACAGTGACAACCGCACAAAAGT GAAATTTTATGCTTACCCGTAACGGAAATCTGTGGGCCA AAGACAATTTTACACCGAAAGATAAGATGCCGGTCACTG TATCTGAGGGGTTCAATCCCGAGTTTTTATGACAGTAATGTC GCATGACAAAAGGACAAAGGGAAATCCCAGTTTGTGTTGT CCACTATAAGCGTAGCATGGATGAATTCAAATCGACTG GAACCGTCACGGTTTCTGGGGTACTGGTCAGGTGAGAA CCACGTAGACAAGAAAGAGGAGAACTGAGCGCATTATA TGAGGTTGATTGAAAACGCACAATGTGAAATTTGTTAA AGTCCTGAATGACAACGAGAAAAAG</p>
CC45 LukB ^{wt}	108	<p>GAAATTAAGTCTAAGATCACAACAGTATCGGAGAAAAAC CTGGATGGCGATACTAAGATGTATACACGCACCGCCACT ACTTCGGACACGGAGAAGAAGATCTCACAATCGTTACAG TTTAATTTTCTTACAGAACCGAACTACGACAAAGAGACC GTCTTCATTAAAGCTAAAGGTACGATTGGTTCGGGATTAA AAATTCTGAATCCGAATGGCTATTGGAACAGTACCTTACG TTGGCCGGGGTCATATTCTGTATCCATTCAAACGTGGAC GACAATAACAACAGCACCAATGTGACAGATTTGCTCCA</p>

		<p>AAGAATCAGGATGAGTCCC GCGAGGTGAAATATACCTAT GGGTACAAAACAGGAGGTGACTTTAGCATTAAACCGTGGT GGCTTGACTGGTAATATCACGAAGGAAAAAATTACTCT GAGACTATTTCTACCAACAGCCGTCGTATCGCACCTTGA TCGACCAACCAACGACTAACAAAGGGGTCGCGTGGAAG TTGAGGCCACAGTATTAACAATATGGGCCACGATCACA CTCGTCAGCTTACTAACGATTCGGATGACCGCGTCAAGTC GGAAATTTTCAGCCTGACGCGTAACGGAAATTTGTGGGC TAAAGACAATTTCACTCCTAAGAACAAGATGCCCGTGAC TGTTTCCGAAGGCTTTAATCCCGAATTCTTAGCGGTGATG TCTCATGATAAAAATGATAAAGGAAAATCGCGCTTCATT GTGCATTATAAGCGTTCTATGGACGACTTCAAATTGGATT GGAATAAGCACGGATTCTGGGGGTACTGGTCCGGGGAAA ATCACGTAGATCAAAGGAAGAGAAGTTGTCCGCTTTGT ATGAAGTGGACTGGAAGACTCACGACGTTAAGTTGATCA AGACCTTCAATGACAAAGAGAAGAAA</p>
CC8 LukB Val53Leu	109	<p>AAGATCAATTCGGAAATTAACAGGTAAGTGAGAAAAAT TTGGATGGCGATACCAAAATGTACACCCGCACCGCTACC ACGTCAGATTCACAAAAAATATTACACAGTCCTTGCAG TTCAATTTCTTGACAGAACCGAATTACGACAAGGAGACT TTGTTCAATTAAGCCAAGGGAACCATCGGGTCCGGATTG CGTATCTTGGACCCGAACGGATATTGGAACCTGACCTTAC GTTGGCCGGGGTCTTACAGTGTTAGTATCCAAAACGTAG ATGATAACAATAACACAAACGTGACAGATTTTGCACCTA AAAACCAGGACGAAAGCCGCGAGGTAAAGTACACATAT GGGTATAAACAGGGGGGGACTTTTCCATCAACCGTGGT GGTTTGACCGGGAACATCACCAAGAGTCAAATTACAGT GAGACCATCAGTTATCAGCAGCCGTCCTATCGTACATTAT TGGATCAGTCGACTTCACATAAAGGGGTCGGATGGAAAG TAGAGGCTCATTTGATCAACAACATGGGTCACGATCATA CACGTCAGTTAACGAACGATAGCGATAATCGCACGAAGT CAGAAATCTTTAGTCTGACTCGTAACGGTAACTTGTGGGC CAAGGACAATTTACGCCAAAGATAAGATGCCTGTGAC GGTATCGGAGGGGTTCAATCCAGAATTCCTTGCTGTAATG TCCCATGACAAAAAAGACAAGGGCAAATCGCAATTTGTA GTCCACTATAAGCGTTCTATGGACGAGTTCAAGATTGACT GGAACCGCCACGGCTTCTGGGGGTACTGGAGTGGTGAGA ATCATGTGGATAAAAAGGAGGAGAACTTAGCGCCCTGT ATGAGGTAGATTGGAACACACAATGTCAAGTTTCGTGA AAGTTCTTAATGACAACGAAAAAAA</p>
CC45 LukB Val53Leu	110	<p>GAGATCAAGAGCAAATTAACACCGTGAGCGAAAAGAA CCTGGACGGTGATACCAAAATGTATACCCGTACCGCGAC CACCAGCGACACCGAGAAGAAAATTAGCCAGAGCCTGCA ATTCAACTTTCTGACCGAGCCGAACACTACGATAAGGAAAC CCTGTTTCATCAAGGCGAAAGGCACCATTGGTAGCGGCCT GAAAATCCTGAACCCGAACGGTTATTGGAACAGCACCCCT GCGTTGGCCGGGTAGCTACAGCGTGAGCATCCAGAACGT TGACGATAACAACAACAGCACCAACGTGACCGACTTCGC GCCGAAGAACCAAGATGAGAGCCGTGAAGTTAAATACAC CTATGGTTACAAAACCGGTGGCGACTTTAGCATTAAACCGT</p>

		GGTGGCCTGACCGGCAACATCACCAAGGAGAAAACTAT AGCGAAACCATTAGCTATCAGCAACCGAGCTACCGTACC CTGATCGATCAGCCGACCACCAACAAGGGTGTGGCGTGG AAAGTTGAGGCGCACAGCATTAACAACATGGGCCACGAC CACACCCGTCAACTGACCAACGATAGCGACGATCGTGTG AAGAGCGAAATCTTCAGCCTGACCCGTAACGGTAACCTG TGGGCGAAAGACAACCTTTACCCCGAAGAACAATAATGCCG GTGACCGTTAGCGAGGGTTTCAACCCGGAATTTCTGGCG GTGATGAGCCACGACAAGAACGATAAGGGCAAAAGCCG TTTCATTGTTCACTACAACGATAGCATGGACGATTTCAAG CTGGACTGGAACAAACACGGTTTTTGGGGCTATTGGAGC GGCGAGAACCACGTTGATCAGAAAGAGGAGAAACTGAG CGCGCTGTACGAAGTGGACTGGAAGACCCACGATGTAA GCTGATCAAAACCTTTAACGATAAAGAAAAGAAA
--	--	--

[0175] В любом варианте осуществления иммуногенная композиция, раскрытая в данном документе, содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид SpA. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует полипептид SpA

5 дикого типа, который не является вариантом. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует домен А из SpA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 55 или 48. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует домен В из SpA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 56 или 49. В любом варианте осуществления

10 полинуклеотид кодирует домен С из SpA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57 или 50. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует домен D из SpA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 58 или 51. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует домен E из SpA, предусматривающий аминокислотную

15 последовательность под SEQ ID NO: 59 или 52. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует полипептид SpA, который содержит по меньшей мере два предназначенные для IgG домена SpA, по меньшей мере три предназначенные для IgG домена SpA, по меньшей мере четыре предназначенные для IgG домена SpA или все пять предназначенных для IgG доменов SpA. В любом варианте осуществления

20 полинуклеотид кодирует полипептид SpA предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 53 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96%, по

меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 53.

[0176] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует варианты доменов E, D, A, B и/или C, которые
5 предусматривают аминокислотную последовательность, характеризующуюся 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO:55 или 48, SEQ ID NO:56 или 49, SEQ ID NO:57 или 50, SEQ ID NO:58 или 51 и SEQ ID NO:59 или 52 соответственно. Иллюстративные варианты доменов E, D, A, B и C из SpA описаны
10 *выше*.

[0177] В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, содержащий вариант домена E, который предусматривает замену по аминокислотному положению 6, 7, 33 и/или 34 в последовательности под SEQ ID NO: 59. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант
15 полипептида SpA, содержащий вариант домена D, который предусматривает замену по аминокислотному положению 9, 10, 36 и/или 37 в последовательности под SEQ ID NO:58. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, содержащий вариант домена A, который предусматривает замену по аминокислотному положению 7, 8, 34 и/или 35 в последовательности под SEQ ID
20 NO: 55. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, содержащий вариант домена B, который предусматривает замену по аминокислотному положению 7, 8, 34 и/или 35 в последовательности под SEQ ID NO:56. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, содержащий вариант домена C, который предусматривает замену
25 по аминокислотному положению 7, 8, 34 и/или 35 в последовательности под SEQ ID NO:57.

[0178] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенных композиций кодирует вариант полипептида SpA, предусматривающий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 75%,
30 по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% (но не 100%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 53 или 72. В любом варианте осуществления вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 53 или 72 или ее фрагментом.

[0179] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует вариант полипептида SpA, предусматривающий одну или более аминокислотных замен в домене D из SpA или по соответствующему аминокислотному положению в других доменах SpA, где одна или более аминокислотных замен препятствуют связыванию варианта полипептида SpA с Fc IgG или уменьшают таковое. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, дополнительно предусматривающий одну или более аминокислотных замен в связывающемся с V_{H3} субдомене домена D или по соответствующему аминокислотному положению других предназначенных для IgG доменов, которые препятствуют связыванию с V_{H3} или уменьшают таковое.

[0180] В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, предусматривающий вариант домена A, например вариант домена A, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62, 67, 88 или 93. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, который предусматривает наличие варианта домена B, например варианта домена B, предусматривающего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63, 68, 89 или 94. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, который предусматривает наличие варианта домена C, например варианта домена C, предусматривающего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, 69, 90 или 95. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, который предусматривает наличие варианта домена D, например варианта домена D, предусматривающего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66, 71, 91 или 96. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, который предусматривает наличие варианта домена E, например варианта домена E, предусматривающего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65, 70, 92 или 97.

[0181] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует вариант полипептида SpA, который предусматривает наличие варианта домена A, B, C, D и E, предусматривающего аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по

меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO:62 или 67, SEQ ID NO:63 или 68, SEQ ID NO:64 или 69, SEQ ID NO:66 или 71 и SEQ ID NO:65 или 70

соответственно.

[0182] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует вариант полипептида SpA, который предусматривает наличие варианта домена A, B, C, D и E, предусматривающего аминокислотную

последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO:88 или 93, SEQ ID NO:89 или 94, SEQ ID NO:90 или 95, SEQ ID NO:91 или 96 и SEQ ID NO:92 или 97 соответственно.

[0183] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует вариант полипептида SpA, предусматривающий вариант домена D, где вариант домена D предусматривает замену по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9, 10 и/или 33 в последовательности под SEQ ID NO:58.

[0184] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует вариант полипептида SpA, который предусматривает (i) замены остатков аминокислоты глутамин на лизин в каждом из доменов A-E из SpA по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 домена D из SpA (SEQ ID NO:58); и (ii) замену остатка аминокислоты серин на глутамат в каждом из доменов A-E из SpA по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 домена D из SpA (SEQ ID NO:58). В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует домен E из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65. В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует домен D из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует домен A из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62. В любом варианте

осуществления полинуклеотид кодирует домен В из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует домен С из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64. В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенных композиций кодирует вариант полипептида SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60.

[0185] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует вариант полипептида SpA, который предусматривает (i) замены остатков аминокислоты глутамин на лизин в каждом из доменов А-Е из SpA по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 домена D из SpA (SEQ ID NO:58); и (ii) замену остатка аминокислоты серин на треонин в каждом из доменов А-Е из SpA по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 домена D из SpA (SEQ ID NO:58). В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует домен Е из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 70. В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует домен D из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 71. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует домен А из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 67. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует домен В из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 68. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует домен С из SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 69. В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенных композиций кодирует вариант полипептида SpA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61.

[0186] В любом варианте осуществления полинуклеотид иммуногенной композиции кодирует вариант полипептида SpA, предусматривающий вариант домена А, В, С, D и/или Е. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, предусматривающий аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере

96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:60 или 61. В любом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вариант полипептида SpA, предусматривающий аминокислотную последовательность, которая является на по
5 меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:54.

10 **[0187]** В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид *S. aureus*, описанный в данном документе, представляют собой кодоны, оптимизированные для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно в клетках человека. Способы оптимизации кодонов известны и были описаны ранее (например, публикация международной заявки на патент
15 № WO1996/09378 по авторству Seed, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Последовательность считается оптимизированной по кодонам, если по меньшей мере один кодон, не являющийся предпочтительным, по сравнению с последовательностью дикого типа замещен кодоном, который является более предпочтительным. В данном документе кодон, не
20 являющийся предпочтительным, представляет собой кодон, который используется в организме с меньшей частотой, чем другой кодон, кодирующий такую же аминокислоту, и кодон, являющийся более предпочтительным, представляет собой кодон, который используется в организме более часто, чем кодон, не являющийся предпочтительным. Частоту использования кодонов для конкретного организма
25 можно найти в таблицах частоты использования кодонов, которые хорошо известны и доступны в данной области. Предпочтительно более одного кодона, не являющегося предпочтительным, например более 10%, 40%, 60%>, 80%> кодонов, не являющихся предпочтительными, предпочтительно большинство (например, по меньшей мере 90%) или все кодоны, не являющиеся предпочтительными, замещены кодонами,
30 которые являются более предпочтительными. Предпочтительно в оптимизированной по кодонам последовательности используют кодоны, наиболее часто используемые в организме. Как правило, замещение предпочтительными кодонами приводит к более высокой экспрессии.

[0188] Полинуклеотидные последовательности по настоящему изобретению можно клонировать с помощью стандартных методик молекулярной биологии или получать de novo путем синтеза ДНК, который можно осуществлять с помощью стандартных процедур с участием компаний, предоставляющих услуги в области синтеза ДНК и/или молекулярного клонирования (например, GeneArt, GenScript, Invitrogen, Eurofins).

[0189] В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутые молекулы нуклеиновой кислоты вставлены в вектор, например, вектор экспрессии для применения в иммуногенной композиции, описанной в данном документе.

Альтернативно, данные молекулы нуклеиновой кислоты могут быть вставлены в вектор экспрессии, который посредством трансформации или трансфекции вводят в соответствующую клетку-хозяина для экспрессии и выделения кодируемого полипептида SpA, варианта полипептида LukA, белка LukB или комплекса LukAB (в виде стабильного гетеродимера), которые раскрыты в данном документе.

[0190] В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды *S. aureus*, описанные в данном документе, могут быть включены в любой вектор экспрессии, способный обеспечить экспрессию полипептидов, кодируемых конструкцией на основе последовательности нуклеиновой кислоты. Подходящие векторы экспрессии содержат элементы последовательности нуклеиновой кислоты, которые контролируют, регулируют, обуславливают или делают возможной экспрессию полипептидов, кодируемых таким вектором. Такие элементы могут включать сайты связывания энхансеров транскрипции, сайты инициации РНК-полимеразы, сайты связывания рибосом и другие сайты, которые облегчают экспрессию кодируемых полипептидов в данной системе экспрессии. Подходящие векторы включают без ограничения ДНК-векторы, плазмидные векторы, линейную нуклеиновую кислоту и вирусный вектор, например аденовирусные векторы.

[0191] В одном варианте осуществления вектор экспрессии представляет собой кольцевую плазмиду (см., например, работу Muthumani et al., «Optimized and Enhanced DNA Plasmid Vector Based In vivo Construction of a Neutralizing anti-HIV-1 Envelope Glycoprotein Fab», *Hum. Vaccin. Immunother.* 9: 2253-2262 (2013), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Плазмиды могут трансформировать клетку-мишень путем интеграции в клеточный геном или существовать внехромосомно (например, автономно реплицирующаяся плаزمида с

точной начала репликации). Иллюстративные плазмидные векторы предусматривают без ограничения pCER4, pREP4, pVAX, pcDNA3.0, pprovaх или любой другой плазмидный вектор экспрессии, способный обеспечить экспрессию вариантов белков или полипептидов LukA и/или LukB, кодируемых рекомбинантной конструкцией на основе последовательности нуклеиновой кислоты.

[0192] В другом варианте осуществления вектор экспрессии представляет собой линейную кассету экспрессии («LEC»). LEC можно эффективно доставлять субъекту с помощью электропорации для экспрессии полипептидов SpA, LukA и/или LukB, кодируемых рекомбинантными молекулами нуклеиновой кислоты, описанными в данном документе. LEC может быть любой линейной ДНК, лишенной фосфатного остова. В одном варианте осуществления LEC не содержит никаких генов устойчивости к антибиотикам и/или фосфатного остова. В другом варианте осуществления LEC не содержит других последовательностей нуклеиновой кислоты, не связанных с экспрессией необходимого гена.

[0193] LEC может быть получена из любой плазмиды, способной к линейаризации. Плазмида может быть способна обеспечивать экспрессию полипептидов, кодируемых рекомбинантными молекулами нуклеиновой кислоты, описанными в данном документе. Иллюстративные плазмиды включают без ограничения pNP (Пуэрто-Рико/34), pM2 (Новая Каледония/99), WLV009, pVAX, pcDNA3.0 или pprovaх или любой другой вектор экспрессии, способный обеспечивать экспрессию полипептидов, кодируемых рекомбинантной конструкцией на основе последовательности нуклеиновой кислоты.

[0194] В другом варианте осуществления вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор. Подходящие вирусные векторы, способные обеспечить экспрессию полипептидов, включают, например, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (см., например, работы Krause et al., «Delivery of Antigens by Viral Vectors for Vaccination», *Ther. Deliv.* 2(1):51-70 (2011); Ura et al., «Developments in Viral Vector-Based Vaccines», *Vaccines* 2: 624-641 (2014); Buning et al., «Recent Developments in Adeno-associated Virus Vector Technology», *J. Gene Med.* 10:717-733 (2008), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), лентивирусный вектор (см., например, работы Ura et al., «Developments in Viral Vector-Based Vaccines», *Vaccines* 2: 624-641 (2014) и Hu et al., «Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infection Diseases», *Immunol. Rev.* 239: 45-61 (2011), каждая из которых включена в данный документ

посредством ссылки во всей своей полноте), ретровирусный вектор (см., например, работу Ura et al., «Developments in Viral Vector-Based Vaccines», *Vaccines* 2: 624-641 (2014), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), вирус коровьей оспы, вектор на основе дефектного по репликации аденовируса и аденовирусный «выпотрошенный» вектор (см., например, патент США № 5872005, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Способы получения и выделения аденоассоциированных вирусов (AAV), пригодных для применения в качестве векторов, известны из уровня техники (см., например, работы Grieger & Samulski, «Adeno-associated Virus as a Gene Therapy Vector: Vector Development, Production and Clinical Applications», *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145 (2005); Buning et al, «Recent Developments in Adeno-associated Virus Vector Technology», *J. Gene Med.* 10:717-733 (2008), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0195] Полинуклеотиды, кодирующие полипептиды SpA, LukA и/или LukB, описанные в данном документе, обычно комбинируют с последовательностями промотора, инициации трансляции, 3'-нетранслируемой области, полиаденилирования и терминации транскрипции в конструкциях вектора экспрессии для достижения максимальной экспрессии. Промоторные последовательности, подходящие для запуска экспрессии описанных в данном документе полипептидов, включают без ограничения промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1a), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор немедленно-раннего гена цитомегаловируса (CMV), химерный промотор, специфичный для печени (LSP), энхансер цитомегаловируса/промотор бета-актина кур (CAG), тетрациклин-чувствительный промотор (TRE), промотор транстиретина (TTR), промотор обезьяньего вируса 40 (SV40) и промотор СК6. Другие промоторы, подходящие для запуска экспрессии генов в клетках-хозяевах, известные из уровня техники, также являются подходящими для включения в конструкции экспрессии, раскрытые в данном документе.

[0196] Другой аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, которая содержит молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие описанные в данном документе полипептиды *S. aureus*, или вектор, содержащий данные полинуклеотиды. С использованием конструкций экспрессии, кодирующих белки или полипептиды SpA, LukA и LukB, описанные в данном документе, можно осуществлять котрансфекцию, серийную трансфекцию клеток-хозяев или трансфицировать клетки-хозяева ими отдельно. Подходящие клетки-хозяева включают без ограничения

первичные клетки, клетки из линии клеток, смешанной линии клеток, иммортализованной популяции клеток или клональной популяции иммортализованных клеток, как хорошо известно из уровня техники (см., например, Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2001); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y. (1997-2001), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Такие клетки-хозяева могут быть эукариотическими клетками, бактериальными клетками, растительными клетками или клетками архей.

[0197] В некоторых вариантах осуществления подходящая клетка-хозяин для описываемых в данном документе полинуклеотидов *S. aureus* представляет собой бактериальную клетку. Подходящие бактериальные клетки-хозяева включают без ограничения клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Escherichia*, клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Pseudomonas*, клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Staphylococcus*, клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Streptomyces*, клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Mycobacterium*, и клетки-хозяева, которые являются бактериями из рода *Bacillus*. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина, которая представляет собой *Escherichia coli*. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина, которая представляет собой *S. aureus*.

[0198] В некоторых вариантах осуществления подходящая клетка-хозяин для описываемых в данном документе полинуклеотидов *S. aureus* представляет собой эукариотическую клетку. Иллюстративные эукариотические клетки могут происходить от млекопитающих, насекомых, птиц или других животных. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные линии клеток, такие как гибридомы или линии клеток миеломы, такие как линии мышечных клеток SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), Манассас, Вирджиния, США, CRL-1581), NSO (Европейская коллекция культур клеток (ECACC), Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Иллюстративной линией клеток миеломы

человека является U266 (ATTC CRL-TIB-196). Другие применимые линии клеток включают линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), такие как CHO-K1SV (Lonza Biologics, Уолкерсвилл, Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

5 **[0199]** Полипептиды SpA, LukA и LukB, описанные в данном документе, могут быть получены с помощью любой из множества методик с использованием выделенных полинуклеотидов, векторов и клеток-хозяев, описанных *выше*. В целом белки получают с помощью стандартных методик клонирования и культивирования клеток, которые обычно используются для получения рекомбинантного вектора
10 экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и восстановления белков или полипептидов из культуральной среды. Трансфекция клетки-хозяина может быть осуществлена с помощью различных методик, обычно используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, с помощью электропорации,
15 осаждения с фосфатом кальция, трансфекции с использованием DEAE-декстрана и тому подобного.

[0200] Описанные в данном документе полипептиды могут быть посттрансляционно модифицированы с помощью таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или ковалентная модификация,
20 которая не встречается в природе, такая как добавление фрагментов полиэтиленгликоля (PEG) (пегилирование) и липидирование. Такие модификации могут происходить *in vivo* или *in vitro*.

[0201] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды и/или полипептиды SpA, LukA и LukB, описанные в данном документе, предпочтительно являются «выделенными» полинуклеотидами и/или полипептидами. Термин «выделенный» при использовании для описания полинуклеотидов и/или полипептидов, раскрытых в данном документе, означает, что полинуклеотид или полипептид были идентифицированы, отделены и/или извлечены из компонента среды их продуцирования. Предпочтительно выделенный полинуклеотид или
25 полипептид не характеризуется ассоциацией с другими компонентами среды их продуцирования. Компоненты среды их продуцирования, представляющие собой контаминанты, такие как происходящие из клеток, которые были трансфицированы рекомбинантными нуклеиновыми кислотами, представляют собой материалы, которые обычно могут мешать фармацевтическому применению, и могут включать

30

ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Полинуклеотиды или полипептиды извлекают и очищают из культур клеток, полученных с применением рекомбинации, с помощью известных способов, включая без ограничения очистку с использованием белка А, осаждение с сульфатом аммония или этанолом, кислотную экстракцию, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, хроматографию гидрофобного взаимодействия, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите и лектиновую хроматографию. Высокоэффективная жидкостная хроматография («HPLC») также может быть использована для очистки.

10 **Адьюванты иммуногенной композиции**

[0202] Используемый в данном документе термин «адьювант» относится к соединению, которое при введении вместе с иммуногенной композицией, описанной в данном документе, или в качестве ее части повышает, усиливает и/или стимулирует иммунный ответ на полипептиды SpA, полипептиды LukA, полипептиды LukB и/или полинуклеотиды, которые их кодируют. Однако, если соединение, представляющее собой адьювант, вводят отдельно, оно не обеспечивает выработки иммунного ответа на вышеупомянутые полипептиды или полинуклеотиды. Адьюванты могут обеспечить усиление иммунного ответа за счет нескольких механизмов, включая, *например*, вовлечение лимфоцитов, стимуляцию В- и/или Т-клеток и стимуляцию антигенпрезентирующих клеток.

[0203] Иммуногенные композиции, описанные в данном документе, содержащие полипептиды SpA, LukA и LukB и/или полинуклеотиды, кодирующие их, содержат адьювант или вводятся в комбинации с адьювантом. Адьювант для введения в комбинации с иммуногенной композицией по данному изобретению можно вводить до, одновременно или после введения иммуногенных композиций.

[0204] Конкретные примеры адьювантов включают без ограничения соли алюминия (квасцы) (такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия и оксид алюминия, включая наночастицы, содержащие квасцы или наноквасцовые составы), фосфат кальция (*например*, работа Masson JD et al, Expert Rev Vaccines 16: 289-299 (2017), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), монофосфориллипид А (MPL) или 3-дез-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL) (*см.*, *например*, патент Объединенного Королевства Великобритании GB2220211, EP0971739, EP1194166, US6491919, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей

полноте), AS01, AS02, AS03 и AS04 (см., например, EP1126876, US7357936 для AS04, EP0671948, EP0761231, US5750110 для AS02, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), имидазопиридиновые соединения (см. WO2007/109812, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), имидазохиноксалиновые соединения (см. WO2007/109813, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), дельта-инулин (например, работа Petrovsky N and PD Cooper, Vaccine 33: 5920-5926 (2015), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), STING-активирующие синтетические циклические динуклеотиды (например, US20150056224, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте), комбинации гомополимеров лецитина и карбомера (например, US6676958) и сапонины, такие как Quil A и QS21 (см., например, работу Zhu D and W Tuo, 2016, Nat Prod Chem Res 3: e113 (doi:10.4172/2329-6836.1000e113), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), необязательно в комбинации с QS7 (см. работу Kensil et al., в Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5057540, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В любом варианте осуществления адъювант представляет собой адъювант Фрейнда (полный или неполный). В любом варианте осуществления адъювант содержит Quil-A, такой как, например, коммерчески доступный от Brenntag (сейчас Croda) или Invivogen. QuilA содержит экстрагируемую водой фракцию сапонинов из дерева *Quillaja saponaria* Molina. Эти сапонины принадлежат к группе тритерпеноидных сапонинов, которые имеют общую структуру тритерпеноидного остова. Известно, что сапонины индуцируют сильный адъювантный ответ как на T-зависимые, так и на T-независимые антигены, а также сильные цитотоксические ответы CD8⁺-лимфоцитов и потенцируют ответ на антигены в слизистых оболочках. Они также могут комбинироваться с холестерином и фосфолипидами с образованием иммуностимулирующих комплексов (ISCOM), в которых адъювант QuilA может активировать как антителоопосредованный, так и клеточноопосредованный иммунные ответы на широкий спектр антигенов из различных источников. В определенных вариантах осуществления адъювант представляет собой AS01, например AS01B. AS01 представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL (3-О-дезацил-4'-монофосфориллипид А), QS21 (*Quillaja saponaria* Molina, фракция 21) и липосомы. В определенных вариантах осуществления AS01 коммерчески доступен

или может быть получен, как описано в WO 96/33739, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Определенные адъюванты предусматривают эмульсии, которые представляют собой смеси двух несмешивающихся жидкостей, например масла и воды, одна из которых взвешена в виде мелких капель внутри другой и стабилизирована за счет поверхностно-активных веществ. В эмульсиях типа масло в воде вода образует непрерывную фазу, окружая небольшие капли масла, в то время как в эмульсиях типа вода в масле масло образует непрерывную фазу. Определенные эмульсии типа масло в воде содержат сквален (метаболизируемое масло). Определенные адъюванты содержат блок-сополимеры, которые представляют собой сополимеры, которые образуются, когда два мономера вместе формируют кластер и образуют блоки повторяющихся единиц. Примером эмульсии типа вода в масле, содержащей блок-сополимер, сквален и стабилизатор микрочастиц, является TiterMax®, которую можно коммерчески получить от Sigma-Aldrich.

[0205] Необязательно эмульсии можно комбинировать с дополнительными иммуностимулирующими компонентами, например, агонистом TLR4, или они могут содержать их. Подходящие, но не ограничивающие примеры комбинаций адъювантов для применения в композициях, раскрытых в данном документе, предусматривают эмульсии типа масло в воде (такие как сквален или арахисовое масло), также применяемые в MF59 (см., например, EP0399843, US 6299884, US6451325) и AS03, необязательно в комбинации со стимуляторами иммунитета, такими как монофосфорил-липид А и/или QS21, как в AS02 (см. работу Stoute et al., 1997, N. Engl. J. Med. 336, 86-91, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Дополнительными примерами адъювантов являются липосомы, содержащие иммуностимуляторы, такие как MPL и QS21, такие как в AS01E и AS01B (например, US 2011/0206758, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Другими примерами адъювантов являются CpG и имидазохинолины (такие как имиквимод и R848) (см., например, работу Reed G, et al., 2013, Nature Med, 19: 1597-1608, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных предпочтительных вариантах осуществления согласно настоящему изобретению адъювант представляет собой адъювант Th1.

[0206] В любом варианте осуществления адъювант содержит сапонины, предпочтительно экстрагируемую водой фракцию сапонинов, полученную из

Quillaja saponaria. В определенных вариантах осуществления адъювант содержит QS-21.

[0207] В любом варианте осуществления адъювант иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе, содержит агонист toll-подобного рецептора 4 (TLR4) отдельно или в комбинации с другим адъювантом. Агонисты TLR4 хорошо известны из уровня техники, см., например, работу Ireton GC and SG Reed, 2013, Expert Rev Vaccines 12: 793-807, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В любом варианте осуществления адъювант представляет собой агонист TLR4, предусматривающий липид А или его аналог или производное.

[0208] Используемый в данном документе термин «липид А» относится к гидрофобному липидному фрагменту молекулы LPS, который содержит глюкозамин и связан с кетодезоксиоктулозоном во внутреннем ядре молекулы LPS кетозидной связью, которая заякоривает молекулу LPS в наружном листке наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Липид А, как используется в данном документе, предусматривает встречающийся в природе липид А, его смеси, аналоги, производные и предшественники. Термин предусматривает моносахариды, например предшественник липида А, называемый липидом X; дисахарид липида А; гептаацил липида А; гексаацил липида А; пентаацил липида А; тетраацил липида А, например тетраацильный предшественник липида А, называемый липидом IVA; дефосфорилированный липид А; монофосфорил липида А; дифосфорил липида А, такой как липид А из *Escherichia coli* и *Rhodobacter sphaeroides*. Некоторые иммуноактивирующие структуры на основе липида А содержат 6 ацильных цепей. Четыре первичные ацильные цепи, присоединенные непосредственно к сахарам глюкозамина, представляют собой 3-гидроксиацильные цепи, обычно имеющие длину от 10 до 16 атомов углерода. Две дополнительные ацильные цепи часто присоединены к 3-гидрокси группам первичных ацильных цепей. В качестве примера липид А *E. coli* обычно содержит четыре 3-гидроксиацильные цепи C14, присоединенные к сахарам, и одну C12 и одну C14, присоединенные к 3-гидрокси группам первичных ацильных цепей в положениях 2' и 3' соответственно.

[0209] Используемый в данном документе термин «аналог или производное липида А» относится к молекуле, которая по структуре и иммунологической активности напоминает активность липида А, но которая не обязательно естественным образом встречается в природе. Аналоги или производные липида А можно модифицировать из обеспечением их укорачивания или конденсации и/или для

того, чтобы их остатки глюкозамина были замещены другим остатком аминсахара, например остатками галактозамина, чтобы на восстанавливаемом конце содержался 2-дезоксид-2-аминоглюконат вместо глюкозамин-1-фосфата, чтобы в положении 4' находился фрагмент галактуроновой кислоты вместо фосфата. Аналоги или производные липида А могут быть получены из липида А, выделенного из бактерии, например, путем химического получения или химического синтеза, например путем первоначального определения структуры предпочтительного липида А и осуществления синтеза его аналогов или производных. Аналоги или производные липида А также являются применимыми в качестве адъювантов, являющихся агонистами TLR4 (см., например, работу Gregg KA et al, 2017, MBio 8, eDD492-17, doi: 10.1128/mBio.00492-17, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0210] Например, аналог или производное липида А можно получить деацилированием молекулы липида А дикого типа, например, путем обработки щелочью. Аналоги или производные липида А могут быть получены, например, из липида А, выделенного из бактерий. Такие молекулы также могут быть синтезированы химическим путем. Другим примером аналогов или производных липида А являются молекулы липида А, выделенные из бактериальных клеток, несущих мутации, или делеции или вставки в ферментах, вовлеченных в биосинтез липида А и/или модификацию липида А.

[0211] MPL и 3D-MPL представляют собой аналоги или производные липида А, которые были модифицированы для обеспечения аттенуации токсичности липида А. Липид А, MPL и 3D-MPL содержат сахарный остов, к которому присоединены длинные цепи жирных кислот, где остов содержит два 6-углеродных остатка сахара в гликозидной связи и фосфорильный фрагмент в положении 4. Как правило, от пяти до восьми длинноцепочечных жирных кислот (обычно по 12—14 атомов углерода) присоединены к сахарному остову. Вследствие происхождения из естественных источников MPL или 3D-MPL могут присутствовать в виде композиции или смеси из целого ряда паттернов замещения жирных кислот, например гептаацила, гексаацила, пентаацила и т. д., с различной длиной жирных кислот. Это также верно для некоторых других аналогов или производных липида А, описанных в данном документе, однако синтетические варианты липида А также могут быть определенными и однотипными. MPL и его изготовление описаны, например, в US 4436727, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей

полноте. 3D-MPL описан, например, в US 4912094B1 (который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и отличается от MPL селективным удалением остатка ацильного сложного эфира 3-гидроксимиристиновой кислоты, который посредством сложноэфирной связи связан с глюкозамином на восстанавливающем конце в положении 3. Примеры липида А (аналоги, производные), подходящие для включения в иммуногенные композиции, описанные в данном документе, предусматривают MPL, 3D-MPL, RC529 (например, EP1385541, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), РЕТ-липид А, GLA (гликопиранозиллипидный адъювант, синтетический гликолипид на основе дисахарида; см., например, US20100310602 и US8722064, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), SLA (см., например, работу Carter D et al, 2016, Clin. Transl. Immunology. 5: e108 (doi:10.1038/cti.2016.63), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, в которой описывается структурно-функциональный подход к оптимизации лигандов TLR4 для вакцин для людей), PHAD (фосфорилированный гексаацилдисахарид, структура которого такая же, как у GLA), 3D-PHAD, 3D-(6-ацил)-PHAD (3D(6A)-PHAD) (PHAD, 3D-PHAD и 3D(6A)PHAD являются синтетическими вариантами липида А, которые также обеспечивают структуры данных молекул), E6020 (номер CAS 287180-63-6), ONO4007, OM-174 и т. п. В определенных предпочтительных вариантах осуществления адъювант, являющийся агонистом TLR4, предусматривает аналог или производное липида А, выбранное из 3D-MPL, GLA или SLA. В некоторых вариантах осуществления аналог или производное липида А содержится в липосомах.

[0212] Адъювант, предпочтительно предусматривающий агонист TLR4, может быть составлен различными способами, например в эмульсиях, таких как эмульсии типа вода в масле (w/o) или эмульсии типа масло в воде (o/w) (примерами являются MF59, AS03), стабильные (нано-)эмульсии (SE), липидные суспензии, липосомы, (полимерные) наночастицы, виросомы, адсорбированные квасцы, водные составы (AF) и т. п., которые представляют различные системы доставки для иммуномодулирующих молекул в адъюванте и/или для иммуногенов (см., например, Reed et al, 2013, *выше*; и Alving CR et al, 2012, Curr Opin Immunol 24: 310-315, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0213] В любом варианте осуществления иммуностимулирующий агонист TLR4 может быть необязательно комбинирован с другими иммуномодулирующими

компонентами, такими как скваленовая эмульсия типа масло в воде (*например*, MF59; AS03); сапонины (*например*, QuilA, QS7, QS21, Matrix M, Iscoms, Iscomatrix и т. д.); соли алюминия, активаторы для других TLR (*например*, имидазохинолины, флагеллин, аналоги dsRNA, агонисты TLR9, такие как CpG и т. д.) и т. п. (*см.*,
 5 *например*, Reed et al, 2013, *выше*).

[0214] В любом варианте осуществления адъювант иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе, представляет собой комбинацию агониста TLR4, *например* GLA, составленного в виде стабильной эмульсии (*т. е.* GLA-SE).

Стабильная эмульсия, применяемая в GLA-SE, представляет собой эмульсию типа
 10 масло в воде, в которой масло представляет собой сквален (*см.*, *например*, WO2013/119856). В любом варианте осуществления адъювант иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе, представляет собой комбинацию агониста TLR4, *например* GLA, в комбинации с сапонином (*например*, GLA-QS21). В любом варианте осуществления вышеупомянутые адъюванты могут быть составлены
 15 в виде липосом. Таким образом, иллюстративный адъювант также предусматривает GLA-LSQ, который содержит синтетический агонист TLR4 (*например*, MPL [GLA]) и сапонин (*например*, QS21), составленные в виде липосом.

[0215] Дополнительные иллюстративные адъюванты для применения в иммуногенных композициях, описанных в данном документе, предусматривающие
 20 аналог или производное липида А, включают SLA-SE (синтетический MPL [SLA], скваленовая эмульсия типа масло в воде), SLA-наноквасцы (синтетический MPL [SLA], соль алюминия), GLA-наноквасцы (синтетический MPL [GLA], соль алюминия), SLA-AF (синтетический MPL [SLA], водная суспензия), GLA-AF (синтетический MPL [GLA], водная суспензия), SLA-квасцы (синтетический MPL [SLA], соль алюминия), GLA-квасцы (синтетический MPL [GLA], соль алюминия), AS01 (MPL, QS21, липосомы), AS02 (MPL, QS21, эмульсия типа масло в воде), AS25 (MPL, эмульсия типа масло в воде), AS04 (MPL, соль алюминия) и AS15 (MPL, QS21, CpG, липосомы). *См.*, *например*, WO2008/153541; WO2010/141861; WO2013/119856; WO2019/051149; WO 2013/119856; WO 2006/116423; патент США № 4987237; патент
 25 США № 4436727; патент США № 4877611; патент США № 4866034; патент США № 4912094; патент США № 4987237; патент США № 5191072; патент США № 5593969; патент США № 6759241; патент США № 9017698; патент США № 9149521; патент США № 9149522; патент США № 9415097; патент США № 9415101; патент США № 9504743; Reed G, et al., 2013, *выше*, Johnson et al., 1999, J

Med Chem, 42:4640-4649 и Ulrich and Myers, 1995, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach; Powell and Newman, Eds.; Plenum: New York, 495-524, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Иммуногенные композиции против *S. aureus* и способы их применения

5 [0216] В одном аспекте иммуногенные композиции, раскрытые в данном документе, содержат любой один или более из полипептидов SpA и вариантов полипептидов LukA, описанных в данном документе, или одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды, описанные в данном документе. В другом аспекте иммуногенные композиции, раскрытые в данном документе, содержат
10 любой один или более из полипептидов SpA и вариантов полипептидов LukB, описанных в данном документе, или одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды, описанные в данном документе. В другом аспекте иммуногенные композиции, раскрытые в данном документе, содержат любой один или более из полипептидов SpA, вариантов полипептидов LukA и полипептидов
15 LukB, описанных в данном документе, или одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды, описанные в данном документе.

[0217] В любом варианте осуществления иммуногенная композиция предусматривает один или более полипептидов SpA (которые являются или не являются вариантами), вариантов полипептидов LukA из CC45, полипептидов LukB
20 из CC45 (которые являются или не являются вариантами) или полинуклеотидов, кодирующих их. Например, иммуногенная композиция по настоящему изобретению может содержать вариант полипептида SpA, вариант полипептида LukA из CC45, полипептид LukB из CC45, который не является вариантом, или полинуклеотиды, кодирующие их, которые описаны в данном документе. Иллюстративная
25 иммуногенная композиция в соответствии с данным вариантом осуществления содержит вариант полипептида SpA, предусматривающий по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и замен на глутамат по
30 аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58. Иллюстративный вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей

мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60. Данная композиция дополнительно содержит вариант полипептида LukA из CC45, предусматривающий наличие замены лизина на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 81 в

5 последовательности под SEQ ID NO: 2, замены серина на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 139 в последовательности под SEQ ID NO: 2, замен валина на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 111 и 191 в последовательности под SEQ ID NO: 2, и замены глутаминовой кислоты на аланин по аминокислотному положению,

10 соответствующему положению 321 в последовательности под SEQ ID NO: 2. В любом варианте осуществления этот вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99%

15 сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4. Данная композиция дополнительно содержит полипептид LukB из CC45, такой как полипептид под SEQ ID NO: 16, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством

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

[0218] Другая иллюстративная иммуногенная композиция в соответствии с вышеупомянутым вариантом осуществления содержит вариант полипептида SpA, вариант полипептида LukA из CC45, вариант полипептида LukB из CC45 или полинуклеотиды, кодирующие их, которые описаны в данном документе.

25 Иллюстративная иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA, предусматривающий по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному

30 положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58. Иллюстративный вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством

последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60. Данная композиция дополнительно содержит вариант полипептида LukA из CC45, предусматривающий наличие замены лизина на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 81 в последовательности под SEQ ID NO: 2, замены серина на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 139 в последовательности под SEQ ID NO: 2, замены валина на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 111 и 191 в последовательности под SEQ ID NO: 2, и замены глутаминовой кислоты на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 321 в последовательности под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления этот вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4. Данная композиция дополнительно содержит вариант полипептида LukB из CC45, предусматривающий аминокислотную замену, соответствующую Val53Leu в последовательности под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления этот вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 18.

[0219] Другие иммуногенные композиции согласно данному варианту осуществления содержат вариант полипептида SpA, предусматривающий последовательность под SEQ ID NO: 60 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 2 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или вариантом последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления вариант последовательности LukB из CC45

предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 4 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, например вариантом последовательности LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 6 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, например вариантом последовательности LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 8 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, например вариантом LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 10 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, например вариантом LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 11 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, например вариантом LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 12 в комбинации с последовательностью LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее

вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, например вариантом LukB из CC45, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, в комбинации с LukB из CC45, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 11, в комбинации с LukB из CC45, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 12, в комбинации с LukB из CC45, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 8, в комбинации с LukB из CC45, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, в комбинации с вариантом LukB из CC45, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

[0220] В другом варианте осуществления иммуногенная композиция предусматривает полипептид SpA, вариант полипептида LukA из CC8 и полипептид LukB из CC8 (который является или не является вариантом) или полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, которые раскрыты в данном документе. Например, иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA, вариант полипептида LukA из CC8 и полипептид LukB из CC8 или полинуклеотиды, кодирующие их, которые описаны в данном документе. Иллюстративная композиция предусматривает вариант полипептида SpA, предусматривающий по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и

замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58. Иллюстративный вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60. Данная композиция дополнительно содержит вариант полипептида LukA из CC8, предусматривающий наличие замены лизина на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 80 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замены серина на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 138 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замен валина на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 110 и 190 в последовательности под SEQ ID NO: 1, и замены глутаминовой кислоты на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 320 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления данный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3. Данная композиция дополнительно содержит полипептид LukB из CC8, такой как полипептид под SEQ ID NO: 15, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 15.

[0221] Другая иммуногенная композиция в соответствии с данным вариантом осуществления содержит вариант полипептид SpA, вариант полипептида LukA из CC8, вариант полипептида LukB из CC8 или полинуклеотид, кодирующий их, которые раскрыты в данном документе. Иллюстративная иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA, предусматривающий по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению

33 в последовательности под SEQ ID NO: 58. Иллюстративный вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60. Данная композиция дополнительно содержит вариант полипептида LukA из CC8, предусматривающий наличие замены лизина на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 80 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замены серина на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 138 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замен валина на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 110 и 190 в последовательности под SEQ ID NO: 1, и замены глутаминовой кислоты на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 320 в последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления данный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3. Данная композиция дополнительно содержит вариант полипептида LukB из CC8, предусматривающий наличие аминокислотной замены валина на лейцин по аминокислотному положению, соответствующему положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления данный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 17.

[0222] Другие иммуногенные композиции согласно данному варианту осуществления содержат вариант полипептида SpA, предусматривающий последовательность под SEQ ID NO: 60 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 1 в

комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или вариантом последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 15. В других вариантах осуществления последовательность варианта последовательности LukB из CC8 предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 3 и последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, который характеризуется 85% или большей идентичностью последовательности с LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариант последовательности LukB из CC8, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 5 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариантом, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариантом последовательности LukB из CC8, выбранным из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 7 и последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариант последовательности LukB из CC8, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 9 и последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариант последовательности LukB из CC8, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21.

[0223] В другом варианте осуществления иммуногенная композиция предусматривает полипептид SpA (который является или не является вариантом), вариант полипептида LukA из CC8 и полипептид LukB из CC45 (который является

или не является вариантом) или полинуклеотиды, кодирующие их, которые описаны в данном документе. Например, композиция предусматривает вариант полипептида SpA, вариант полипептида LukA из CC8 и полипептид LukB из CC45 или полинуклеотид, кодирующий их. Иллюстративная иммуногенная композиция

5 согласно данному варианту осуществления содержит вариант полипептида SpA, предусматривающий по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в

10 последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58. Иллюстративный вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством

15 последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60. Данная композиция дополнительно содержит вариант полипептида LukA из CC8, предусматривающий наличие замены лизина на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 80 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замены серина на аланин по аминокислотному положению, соответствующему

20 положению 138 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замен валина на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 110 и 190 в последовательности под SEQ ID NO: 1, и замены глутаминовой кислоты на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 320 в

25 последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления данный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с

30 аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3. Данная композиция дополнительно содержит полипептид LukB из CC45, такой как полипептид под SEQ ID NO: 16, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

[0224] Другая иммуногенная композиция согласно данному варианту осуществления содержит вариант полипептид SpA, вариант полипептида LukA из CC8 и вариант полипептида LukB из CC45 или полинуклеотиды, кодирующие их, которые раскрыты в данном документе. Иллюстративная иммуногенная композиция

5 согласно данному варианту осуществления содержит вариант полипептида SpA, предусматривающий по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в

10 последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58. Иллюстративный вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством

15 последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60. Данная композиция дополнительно содержит вариант полипептида LukA из CC8, предусматривающий наличие замены лизина на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 80 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замены серина на аланин по аминокислотному положению, соответствующему

20 положению 138 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замен валина на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 110 и 190 в последовательности под SEQ ID NO: 1, и замены глутаминовой кислоты на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 320 в

25 последовательности под SEQ ID NO: 1. В любом варианте осуществления данный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с

30 аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3. Данная композиция дополнительно содержит вариант полипептида LukB из CC45, предусматривающий аминокислотную замену, соответствующую Val53Leu в последовательности под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления этот вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%,

по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 18.

[0225] Другие иммуногенные композиции согласно данному варианту осуществления содержат вариант полипептида SpA, предусматривающий последовательность под SEQ ID NO: 60 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 1 и последовательность LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления вариант последовательности LukB из CC45 предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 3 и последовательность LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариант последовательности LukB из CC45, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 5 и последовательность LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариант последовательности LukB из CC45, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 7 и последовательность LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариант последовательности LukB из CC45, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В некоторых вариантах

осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8 под SEQ ID NO: 9 и последовательность LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с LukB из CC45 под SEQ ID NO: 16, *например* вариант последовательности LukB из CC45, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 20 и 22. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и вариант LukB из CC45, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и вариант LukB из CC45, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и вариант LukB из CC45, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC8, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и вариант LukB из CC45, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

[0226] В другом варианте осуществления иммуногенная композиция предусматривает полипептид SpA (который является или не является вариантом), вариант полипептида LukA из CC45 и полипептид LukB из CC8 (который является или не является вариантом) или полинуклеотиды, кодирующие их, которые описаны в данном документе. Например, иммуногенная композиция по настоящему изобретению может содержать вариант полипептида SpA, вариант полипептида LukA из CC45 и полипептид LukB из CC8. Иллюстративная иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA, предусматривающий по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению

33 в последовательности под SEQ ID NO: 58. Иллюстративный вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60. Данная композиция дополнительно содержит вариант полипептида LukA из CC45, предусматривающий наличие замены лизина на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 81 в последовательности под SEQ ID NO: 2, замены серина на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 139 в последовательности под SEQ ID NO: 2, замены валина на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 111 и 191 в последовательности под SEQ ID NO: 2, и замены глутаминовой кислоты на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 321 в последовательности под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления этот вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4. Данная композиция дополнительно содержит полипептид LukB из CC8, например полипептид LukB под SEQ ID NO: 15, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 15. Альтернативно композиция дополнительно содержит вариант полипептида LukB из CC8, предусматривающий аминокислотную замену валина на лейцин по аминокислотному положению, соответствующему положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 15. В любом варианте осуществления данный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 17.

[0227] Другие иммуногенные композиции согласно данному варианту осуществления содержат вариант полипептида SpA, предусматривающий последовательность под SEQ ID NO: 60 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO:2 в комбинации с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или вариантом последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления вариант последовательности LukB из CC8 предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 4 и последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариант последовательности, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 6 и последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариант последовательности, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 8 и последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариант последовательности, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 9 и последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью

LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариант последовательности, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 10 и

5 последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариант последовательности, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида

10 SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 11 и последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариант последовательности, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В некоторых вариантах

15 осуществления иммуногенная композиция предусматривает вариант полипептида SpA под SEQ ID NO: 60, вариант LukA из CC45 под SEQ ID NO: 12 и последовательность LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, который характеризуется >85% идентичностью последовательности с последовательностью LukB из CC8 под SEQ ID NO: 15, *например* вариант последовательности, выбранный из последовательностей под SEQ ID NO: 17, 19 и 21.

20

[0228] Другой аспект настоящего изобретения относится к иммуногенной композиции, содержащей полипептид SpA, который описан в данном документе, и любой из вариантов белков или полипептидов LukB, которые описаны в данном документе, или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты SpA и LukB,

25 которые описаны в данном документе. В частности, вариант белка или полипептида LukB в иммуногенной композиции предусматривает одну или более вставок, замен и/или делеций аминокислотных остатков, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция предусматривает вариант полипептида SpA, предусматривающий последовательность под SEQ ID NO: 60 или

30 последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 60, и вариант LukB под SEQ ID NO: 15 (CC8). Иллюстративные варианты LukB из CC8 предусматривают без ограничения варианты LukB под SEQ ID NO: 17, 19 и 21. В некоторых вариантах

осуществления композиция предусматривает вариант полипептида SpA, предусматривающий последовательность под SEQ ID NO: 60 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 60, и вариант LukB под SEQ ID NO: 16 (CC45). Иллюстративные варианты LukB из CC45 предусматривают без ограничения варианты LukB под SEQ ID NO: 18, 20 и 22.

[0229] Иммуногенная композиция в соответствии с данным вариантом осуществления может дополнительно содержать белок или полипептид LukA.

10 Например, композиция, содержащая вариант SpA и вариант LukB, которые описаны в предыдущем абзаце, дополнительно содержит последовательность LukA из CC8 под SEQ ID NO: 1 или вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 1.

15 Альтернативно иммуногенная композиция, содержащая вариант SpA и вариант LukB, которые описаны в предыдущем абзаце, дополнительно содержит последовательность LukA из CC45 под SEQ ID NO: 2 или вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 2.

[0230] Иммуногенные композиции, которые описаны в данном документе, могут дополнительно содержать один или более дополнительных антигенов *S. aureus*.

Подходящий антиген *S. aureus* включает без ограничения антиген, представляющий собой полисахарид серотипа 336, фактор комкования А, фактор комкования В, фибриногенсвязывающий белок, коллагенсвязывающий белок, эластинсвязывающий белок, белок-аналог МНС, полисахарид внутриклеточной адгезии, бета-гемолизин, дельта-гемолизин, лейкоцидин Пантона-Валентайна, лейкоцидин М, эксфолиативный токсин А, эксфолиативный токсин В, протеазу V8, гиалуронатлиазу, липазу, стафилокиназу, энтеротоксин, суперантиген, представляющий собой энтеротоксин SEА, суперантиген, представляющий собой энтеротоксин SAB, токсин-1 синдрома токсического шока, поли-N-сукцинил-бета-1→6 глюкозамин, каталазу, бета-лактамазу, тейхоевую кислоту, пептидогликан, пенициллинсвязывающий белок, белок, ингибирующий хемотаксис, ингибитор комплемента, Sbi, антиген типа 5, антиген типа 8 и липотейхоевую кислоту. Другие подходящие антигены *S. aureus* для

включения в иммуногенную композицию включают без ограничения CP5, CP8, Ear, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, EsxAB (слитый продукт), IsdA, IsdB, IsdC, MntC, rTSST-1, rTSST-1v, TSST-1, SasF, vWbp, vWh, витронектинсвязывающий белок, Aaa, Aap, Ant, аутолизинглюкозаминидазу, аутолизинамидазу, Can, коллагенсвязывающий белок, Csa1A, EFB, эластинсвязывающий белок, EPB, FbpA, фибриногенсвязывающий белок, фибронектинсвязывающий белок, FhuD, FhuD2, FnbA, FnbB, GehD, HarA, HBP, иммунодоминантный транспортер ABC, IsaA/PisA, рецептор ламинина, липазу GehD, MAP, транспортер Mg²⁺, аналог МНС II, MRPII, NP-азу, RNA III-активирующий белок (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, экзотоксины, представляющие собой SEA, экзотоксины, представляющие собой SEB, mSEB, SitC, транспортер Ni ABC, SitC/MntC/связывающий белок слюны, SsaA, SSP-1, SSP-2, Spa5, SpAKKAA, SpAkR, Sta006 и Sta011.

[0231] Иммуногенные композиции по настоящему изобретению получают путем составления полипептидов SpA, LukA и/или LukB, описанных в данном документе, с фармацевтически приемлемым носителем и необязательно фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом. Используемые в данном документе термины «фармацевтически приемлемый носитель» и «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» (например, добавки, такие как разбавители, иммуностимуляторы, адьюванты, антиоксиданты, консерванты и солибилизаторы) являются нетоксичными для субъекта, которому вводится композиция в используемых дозах и концентрациях. Примеры фармацевтически приемлемых носителей предусматривают воду, например забуференную фосфатом, цитратом или другой органической кислотой. Типичные примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, которые могут быть полезны в настоящем изобретении, предусматривают антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества.

[0232] Состав фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известен из уровня техники, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21-е издание (2005) и любые последующие издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают буферы, разбавители, растворители, средства для регулирования тонуса, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие средства. Один или более фармацевтически приемлемых носителей можно применять при составлении фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

[0233] В любом варианте осуществления иммуногенная композиция, описанная в данном документе, представляет собой жидкую композицию. Предпочтительным примером жидкой композиции является водный состав, т. е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может предусматривать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т. п. Водный состав обычно содержит по меньшей мере 50% вес/вес воды, или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, или по меньшей мере 95% вес/вес воды.

[0234] В любом варианте осуществления иммуногенная композиция может быть составлена в виде препарата для инъекций, который можно вводить, например, посредством устройства для инъекций (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекция может доставляться, например, внутримышечно, внутрибрюшинно, интравитреально или внутривенно.

[0235] Иммуногенная композиция по настоящему изобретению может быть составлена для парентерального введения. Растворы, суспензии или эмульсии композиции можно получать в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также можно получать в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях в маслах. Иллюстративными маслами являются масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло или минеральное масло. В общем вода, физиологический раствор, водный раствор декстрозы и соответствующего сахара и гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, являются предпочтительными жидкими носителями, особенно для растворов для инъекций. При обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предупреждения роста микроорганизмов.

[0236] Фармацевтические иммуногенные композиции, пригодные для применения путем инъекции, предусматривают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального получения стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), их подходящие смеси и растительные масла.

[0237] В любом варианте осуществления иммуногенная композиция, описанная в данном документе, представляет собой твердый состав, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть или к которой врач или пациент добавляют растворители и/или разбавители перед использованием. Твердые лекарственные формы могут предусматривать таблетки, такие как прессованные таблетки и/или покрытые оболочкой таблетки, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Иммуногенная композиция также может быть, например, в форме пакетиков, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для растворения.

[0238] Лекарственные формы иммуногенной композиции могут характеризоваться немедленным высвобождением, в этом случае они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут характеризоваться отсроченным высвобождением, длительным высвобождением или модифицированным высвобождением, в этом случае они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

[0239] В других вариантах осуществления иммуногенная композиция может доставляться интраназально, интрабуккально или сублингвально.

[0240] Уровень pH в водном составе иммуногенной композиции может находиться в диапазоне от pH 3 до pH 10. В одном варианте осуществления pH иммуногенной композиции составляет от приблизительно 7,0 до приблизительно 9,5. В другом варианте осуществления pH иммуногенной композиции составляет от приблизительно 3,0 до приблизительно 7,0.

[0241] Другой аспект настоящего изобретения относится к способам применения иммуногенной композиции, описанной в данном документе.

Соответственно, один аспект относится к способу лечения или предупреждения инфекции, обусловленной бактерией рода *Staphylococcus*, у нуждающегося в этом

5 субъекта, который предусматривает введение эффективного количества иммуногенной композиции, описанной в данном документе. Другой аспект относится к способу обеспечения развития иммунного ответа на бактерию рода *Staphylococcus* у нуждающегося в этом субъекта, который предусматривает введение эффективного количества иммуногенной композиции, описанной в данном документе. Другой

10 аспект относится к способу обеспечения деколонизации или предупреждения колонизации или повторной колонизации бактерией рода *Staphylococcus* у нуждающегося в этом субъекта, который предусматривает введение эффективного количества иммуногенной композиции, описанной в данном документе. В соответствии с данным аспектом описанные в данном документе способы подходят

15 для предупреждения краткосрочной и стойкой колонизации или повторной колонизации бактерией рода *Staphylococcus* у нуждающегося в этом субъекта.

[0242] Способы по настоящему изобретению предусматривают введение любой из описанных *выше* иммуногенных композиций. Подходящим субъектом для лечения в соответствии с данными аспектами настоящего изобретения является

20 субъект, подверженный риску развития инфекции, обусловленной *S. aureus*, субъект, подверженный риску контакта с бактерией *S. aureus*, и/или субъект, подвергшийся контакту с бактерией *S. aureus*.

[0243] В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения субъекту вводят профилактически эффективное количество иммуногенной композиции для

25 обеспечения выработки иммунного ответа на инфекцию, обусловленную *S. aureus*. Профилактически эффективное количество представляет собой количество, необходимое для обеспечения выработки или вызова гуморального (т. е. антителоопосредованного) и клеточного (с участием Т-клеток) иммунного ответа. Вызванный гуморальный ответ является достаточным для предупреждения или по

30 меньшей мере уменьшения степени развития инфекции, обусловленной *S. aureus*, которая в противном случае развилась бы при отсутствии такого ответа. Предпочтительно введение профилактически эффективного количества иммуногенной композиции, описанной в данном документе, индуцирует нейтрализующий иммунный ответ на *S. aureus* у субъекта. Для обеспечения

эффективного иммунного ответа у субъекта композиция может дополнительно содержать один или более дополнительных антигенов *S. aureus* или адъювант, описанные выше. В альтернативном варианте осуществления адъювант вводят субъекту отдельно от композиции — до введения композиции по настоящему изобретению, после этого либо одновременно с этим.

[0244] Для целей этого аспекта настоящего изобретения «субъект»-мишень охватывает любое животное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека. В контексте введения иммуногенной композиции с целью предупреждения, ингибирования или уменьшения тяжести инфекции, обусловленной *S. aureus*, и степени колонизации *S. aureus* у субъекта субъект-мишень охватывает любого субъекта, который подвержен риску инфицирования *S. aureus*. Особенно восприимчивые субъекты включают младенцев, подростков, взрослых и пожилых людей с ослабленным иммунитетом. Однако любого младенца, подростка, взрослого или пожилого человека, подверженных риску инфицирования *S. aureus*, можно лечить в соответствии со способами и иммуногенной композицией? описанными в данном документе. Особенно подходящие субъекты включают тех, кто подвержен риску инфицирования метициллинрезистентным *S. aureus* (MRSA) или метициллинчувствительным *S. aureus* (MSSA). Другие подходящие субъекты включают тех субъектов, которые могут иметь или подвержены риску развития состояния, возникающего в результате инфекции, обусловленной *S. aureus*, *m. e.* состояния, ассоциированного с *S. aureus*, такого как, например, раны и инфекции кожи, абсцессы тканей, фолликулит, остеомиелит, пневмония, синдром ошпаренной кожи, септицемия, септический артрит, миокардит, эндокардит и синдром токсического шока.

[0245] В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет по меньшей мере или не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 85 или 90 лет (или находится в любом диапазоне, который можно получить в пределах указанного выше). В определенных вариантах осуществления субъект или пациент, описанный в данном документе, например субъект, представляющий собой человека, является субъектом-ребенком. Субъект-ребенок является субъектом, возраст которого определяется как менее 18 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта-ребенка составляет 2 года или менее. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта-ребенка составляет

менее 1 года. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта-ребенка составляет менее 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта-ребенка составляет 2 месяца или менее. В некоторых вариантах осуществления возраст пациента-человека составляет 65 лет или более. В некоторых вариантах осуществления человек-пациент является медицинским работником. В некоторых вариантах осуществления пациент является пациентом, которому предстоит хирургическая процедура.

[0246] Многочисленные другие факторы также могут быть учтены при введении иммуногенной композиции в условиях, эффективных для индуцирования устойчивого иммунного ответа. Эти факторы предусматривают, например и без ограничения, концентрацию активных средств в композиции, способ и частоту введения, а также данные о субъекте, такие как возраст, вес и общее состояние здоровья и иммунитета. Общее руководство можно найти, например, в публикациях Международной конференции по гармонизации и в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company 1990), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Клиницист может вводить иммуногенную композицию, описанную в данном документе, до достижения дозы, которая обеспечивает необходимый или требуемый профилактический эффект, например необходимые титры антител. В случае профилактики мониторинг развития ответа можно легко осуществлять с помощью обычных анализов.

[0247] В одном варианте осуществления настоящего изобретения иммуногенную композицию, описанную в данном документе, вводят с профилактической целью для предупреждения, задержки или ингибирования развития инфекции, обусловленной *S. aureus*, у субъекта, подверженного риску инфицирования *S. aureus* или риску развития ассоциированного состояния. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения профилактическое введение иммуногенной композиции эффективно для полного предупреждения инфекции, обусловленной *S. aureus*, у индивидуума. В других вариантах осуществления профилактическое введение эффективно для предупреждения полного развития инфекции, которая в противном случае развилась бы в отсутствие такого введения, т. е. по сути оно предупреждает или подавляет инфекцию, обусловленную *S. aureus*, у индивидуума.

[0248] В контексте применения профилактических композиций для предупреждения инфекции, обусловленной *S. aureus*, доза композиции является достаточной для обеспечения выработки титра антител, с помощью которых можно

нейтрализовать цитотоксичность, опосредованную LukAB *S. aureus*, и вирулентную активность, опосредованную SpA, а также достичь уменьшения ряда симптомов, уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома, или задержки дальнейшего прогрессирования по меньшей мере одного симптома, или даже общего ослабления инфекции.

[0249] Профилактически эффективные количества иммуногенных композиций, описанных в данном документе, будут зависеть от того, вводится ли совместно адъювант, при этом в отсутствие адъюванта требуются более высокие дозы.

Количество полипептидов SpA, LukA и LukB и/или кодирующих их полинуклеотидов для введения может варьировать от 1 мкг до 500 мкг на пациента. В некоторых вариантах осуществления для каждой инъекции для человека используется 5, 10, 20, 25, 50 или 100 мкг. Иногда используется более высокая доза, составляющая 1—50 мг на инъекцию. В некоторых вариантах осуществления для каждой инъекции для человека используется приблизительно 10, 20, 30, 40 или 50 мг. Время введения инъекций может значительно варьироваться и составляет от одного раза в год до одного раза в десять лет. Как правило, мониторинг для установления эффективной дозы можно осуществлять путем получения образца жидкости от субъекта, как правило образца сыворотки крови, и определения титра антител, которые образовались в ответ на SpA, LukA, LukB или LukAB, с применением способов, хорошо известных из уровня техники и легко адаптируемых к конкретному антигену, подлежащему измерению. В идеале образец отбирают до первоначального введения дозы, а последующие образцы отбирают и титруют после каждой иммунизации. Как правило, желательными являются доза или схема введения доз, которые обеспечивают титр, поддающийся выявлению, который по меньшей мере в четыре раза превышает контрольные или «фоновые» уровни при разведении сыворотки крови в соотношении 1:100, где фоновый уровень определяется относительно контрольной сыворотки крови или относительно фонового уровня для планшета в ELISA-анализах.

[0250] Иммуногенную композицию по настоящему изобретению можно вводить парентерально, местно, внутривенно, перорально, внутрибрюшинно, интраназально или внутримышечно для профилактического лечения.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0251] В настоящем изобретении также предусмотрены следующие неограничивающие варианты осуществления.

[0252] В варианте осуществления 1 предусмотрена иммуногенная композиция, содержащая:

- (i) полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) и
- (ii) вариант полипептида LukA *S. aureus*, при этом указанный вариант

5 полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

[0253] В варианте осуществления 2 предусмотрена комбинация двух или более иммуногенных композиций, которые совместно содержат:

- 10
- (i) полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) и
 - (ii) вариант полипептида LukA *S. aureus*, при этом указанный вариант

полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

15 **[0254]** В варианте осуществления 3 предусмотрена иммуногенная композиция по варианту осуществления 1 или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 2, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует Glu323 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

20 **[0255]** В варианте осуществления 4 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 1—3, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

25 **[0256]** В варианте осуществления 5 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 4, где аминокислотные замены предусматривают Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala.

30 **[0257]** В варианте осуществления 6 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 1—5, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3, или

аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4.

5 **[0258]** В варианте осуществления 7 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 1—6, где указанный вариант полипептида LukA дополнительно предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

10 **[0259]** В варианте осуществления 8 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 7, где аминокислотные замены предусматривают Tyr74Cys, Asp140Cys, Gly149Cys и Gly156Cys.

15 **[0260]** В варианте осуществления 9 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по вариантам осуществления 7 или 8, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6.

20 **[0261]** В варианте осуществления 10 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 1—9, где указанный вариант белка или полипептида LukA дополнительно предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

25 **[0262]** В варианте осуществления 11 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 10, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 7, аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ

ID NO: 8, аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10.

[0263] В варианте осуществления 12 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 1—11, где полипептид SpA представляет собой вариант полипептида SpA.

[0264] В варианте осуществления 13 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 12, где вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая нарушает связывание Fc, и по меньшей мере вторую аминокислотную замену, которая нарушает связывание VH3.

[0265] В варианте осуществления 14 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по вариантам осуществления 12 или 13, где вариант полипептида SpA предусматривает наличие домена D из SpA, при этом указанный домен D из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 58.

[0266] В варианте осуществления 15 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 14, где вариант полипептида SpA дополнительно предусматривает наличие домена E, A, B и/или C из SpA.

[0267] В варианте осуществления 16 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 15, где домен E из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:59, домен A из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:55, домен B из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:56; домен C из SpA предусматривает

аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:57.

[0268] В варианте осуществления 17 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 12 или 13, где вариант полипептида SpA предусматривает домен E, D, A, B или C из SpA, где домен E из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:52, где домен D из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:51, домен A из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:48, домен B из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:49; домен C из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:50.

[0269] В варианте осуществления 18 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 12—17, где вариант полипептида SpA предусматривает последовательно домены E, D, A, B и C из SpA.

[0270] В варианте осуществления 19 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 18, где вариант полипептида SpA предусматривает домены E, D, A, B и C и содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:53.

[0271] В варианте осуществления 20 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 12—17, где каждый из доменов E, D, A, B и C из SpA предусматривает наличие аминокислотной замены по одному или обоим аминокислотным положениям, соответствующим аминокислотным положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58.

[0272] В варианте осуществления 21 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 20, где аминокислотная замена по одному или обоим аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, представляет собой замену остатка глутамина на остаток лизина.

[0273] В варианте осуществления 22 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 21, где вариант полипептида SpA предусматривает домены E, D, A, B и C и содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:54.

[0274] В варианте осуществления 23 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 12—22, где вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен характеризуется наличием (i) замены на лизин по остаткам глутамина, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и (ii) замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58.

[0275] В варианте осуществления 24 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 23, где домен E из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:65, где домен D из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:66, домен A из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:62, домен B из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:63; домен C из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:64.

[0276] В варианте осуществления 25 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 23, где домен E из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:92, где домен D из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:91, домен A из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:88, домен B из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:89; домен C из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:90.

[0277] В варианте осуществления 26 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 23, где вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60.

[0278] В варианте осуществления 27 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 12—22, где вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен характеризуется наличием (i) замены на лизин по остаткам глутамина, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и (ii) замены на треонин по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58.

[0279] В варианте осуществления 28 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 27, где домен E из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:70, где домен D из SpA предусматривает

аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:71, домен А из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:67, домен В из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:68, домен С из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:69.

[0280] В варианте осуществления 29 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 27, где домен Е из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:97, где домен D из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:96, домен А из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:93, домен В из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:94, и домен С из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:95.

[0281] В варианте осуществления 30 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 27, где вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 61.

[0282] В варианте осуществления 31 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 12—22, где вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен

A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен предусматривает наличие (i) замены на лизин по остаткам глутамина, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и (ii) аминокислотной замены по аминокислотному положению, соответствующему положению 29 в последовательности под SEQ ID NO: 58.

[0283] В варианте осуществления 32 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 1—31, где указанные композиции дополнительно содержат полипептид лейкоцидина В (LukB) *S. aureus* или его вариант.

10 **[0284]** В варианте осуществления 33 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 32, где полипептид LukB представляет собой полипептид LukB под SEQ ID NO: 15 или полипептид LukB под SEQ ID NO: SEQ ID NO: 16.

15 **[0285]** В варианте осуществления 34 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 32, где полипептид LukB представляет собой вариант полипептида LukB.

20 **[0286]** В варианте осуществления 35 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 34, где вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:15, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

25 **[0287]** В варианте осуществления 36 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 35, где вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному положению, соответствующему положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

30 **[0288]** В варианте осуществления 37 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 36, где аминокислотная замена представляет собой замену валина на лейцин.

[0289] В варианте осуществления 38 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 34—37, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную

замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в последовательности под SEQ ID NO: 15.

[0290] В варианте осуществления 38 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 34—37, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155 в последовательности под SEQ ID NO: 16.

[0291] В варианте осуществления 40 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 34—39, где вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей под SEQ ID NO: 17—22.

[0292] В варианте осуществления 41 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 32, где указанная композиция предусматривает вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 4, и полипептид LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 16.

[0293] В варианте осуществления 42 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 32, где указанная композиция предусматривает вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 3, и полипептид LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по

меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 15.

[0294] В варианте осуществления 43 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 32, где
5 указанная композиция предусматривает вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 3, и полипептид LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ
10 ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 18.

[0295] В варианте осуществления 44 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления
15 41—43, где полипептид SpA представляет собой вариант полипептида SpA.

[0296] В варианте осуществления 45 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 44, где вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен предусматривает наличие (i) замены
20 на лизин по остаткам глутамина, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и (ii) замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58.

[0297] В варианте осуществления 46 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 32, где (i)
25 вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному
30 положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58; (ii) вариант полипептида LukA предусматривает вариант полипептида LukA из CC8, предусматривающий наличие замены на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 80 в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, замены на аланин по аминокислотному положению,

соответствующему положению 138 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замен на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 110 и 190 в последовательности под SEQ ID NO:1, и замены на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 320 в последовательности под SEQ ID NO: 1; и (iii) полипептид LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, предусматривающий замену на лейцин по аминокислотному положению, соответствующему положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 16.

[0298] В варианте осуществления 47 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 46, где вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60; вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3; и вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:18.

[0299] В варианте осуществления 48 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 32, где (i) вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58; (ii) вариант полипептида LukA предусматривает вариант полипептида LukA из CC8, предусматривающий наличие замены на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 80 в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, замены на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 138 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замен на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 110 и 190 в последовательности под SEQ ID NO:1, и замены на аланин по аминокислотному

положению, соответствующему положению 320 в последовательности под SEQ ID NO: 1; и (iii) полипептид LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC8, предусматривающий замену на лейцин по аминокислотному положению, соответствующему положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 15.

5 **[0300]** В варианте осуществления 49 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 48, где вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной
10 последовательностью под SEQ ID NO: 60; вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3; и вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную
15 последовательность под SEQ ID NO: 17 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 17.

[0301] В варианте осуществления 50 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 32, где (i)
20 вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO:
25 58; (ii) вариант полипептида LukA предусматривает вариант полипептида LukA из CC8, предусматривающий наличие замены на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 80 в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, замены на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 138 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замен на
30 изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 110 и 190 в последовательности под SEQ ID NO: 1, и замены на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 320 в последовательности под SEQ ID NO: 1; и (iii) полипептид LukB представляет собой полипептид LukB из CC8, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15.

[0302] В варианте осуществления 51 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 50, где вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60; вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3; и полипептид LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:15.

[0303] В варианте осуществления 52 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 32, где (i) вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58; (ii) вариант полипептида LukA предусматривает вариант полипептида LukA из CC45, предусматривающий наличие замены на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 81 в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, замены на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 139 в последовательности под SEQ ID NO: 2, замен на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 111 и 191 в последовательности под SEQ ID NO:2, и замены на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 321 в последовательности под SEQ ID NO: 2; и (iii) полипептид LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, предусматривающий замену на лейцин по аминокислотному положению, соответствующему положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 16.

[0304] В варианте осуществления 53 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 52, где вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под

SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60; вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или

5 аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; и вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с

10 аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:18.

[0305] В варианте осуществления 54 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 32, где (i) вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на

15 лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58; (ii) вариант полипептида LukA предусматривает вариант полипептида LukA из CC45, предусматривающий наличие замены на метионин по аминокислотному

20 положению, соответствующему положению 81 в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, замены на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 139 в последовательности под SEQ ID NO: 2, замен на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 111 и 191 в последовательности под SEQ ID NO:2, и замены на аланин по аминокислотному

25 положению, соответствующему положению 321 в последовательности под SEQ ID NO: 2; и (iii) полипептид LukB представляет собой полипептид LukB из CC45, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

[0306] В варианте осуществления 55 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 54, где

30 вариант полипептида SpA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60; вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или

аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; и полипептид LukB предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:16.

[0307] В варианте осуществления 56 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 1—55, дополнительно содержащие адьювант.

[0308] В варианте осуществления 57 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 56, где адьювант предусматривает соли алюминия, такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия и оксид алюминия.

[0309] В варианте осуществления 58 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 56, где адьювант предусматривает гидроксид алюминия или фосфат алюминия.

[0310] В варианте осуществления 59 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 56, где адьювант предусматривает стабильную эмульсию типа масло в воде.

[0311] В варианте осуществления 60 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 56, где адьювант предусматривает сапонин.

[0312] В варианте осуществления 61 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 60, где сапонин предусматривает QS21.

[0313] В варианте осуществления 62 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 56, где адьювант предусматривает агонист TLR4.

[0314] В варианте осуществления 63 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 62, где агонист TLR4 представляет собой липид А или его аналог или производное.

[0315] В варианте осуществления 64 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 62, где

агонист TLR4 предусматривает MPL, 3D-MPL, RC529, GLA, SLA, E6020, PЕТ-липид А, PHAD, 3D-PHAD, 3D-(6-ацил)-PHAD, ONO4007 или OM-174.

[0316] В варианте осуществления 65 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 62, где
5 агонист TLR4 представляет собой гликопиранозиллипидный адъювант (GLA).

[0317] В варианте осуществления 66 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 62, где адъювант предусматривает агониста TLR4 в комбинации со стабильной эмульсией типа масло в воде.

10 **[0318]** В варианте осуществления 67 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 62, где адъювант предусматривает агониста TLR4, составленного в стабильной эмульсии типа масло в воде.

[0319] В варианте осуществления 68 предусмотрена иммуногенная композиция
15 или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 65, где адъювант предусматривает GLA-SE.

[0320] В варианте осуществления 69 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 62, где адъювант предусматривает агониста TLR-4 в комбинации с сапонином.

20 **[0321]** В варианте осуществления 70 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 65, где адъювант предусматривает GLA-LSQ.

[0322] В варианте осуществления 71 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций, где указанные композиции содержат
25 одну или более выделенных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид белка А *Staphylococcus aureus* (SpA) или его вариант, вариант полипептида LukA и полипептид LukB или его вариант из иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 1—55.

[0323] В варианте осуществления 72 предусмотрена иммуногенная композиция
30 или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 71, где указанные композиции содержат одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид белка А *Staphylococcus aureus* (SpA) или его вариант, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетеродимер LukAB (RARPR-15), где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гетеродимер LukAB, предусматривает

нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 104, которая функционально связана с нуклеотидной

5 последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 108.

[0324] В варианте осуществления 73 предусмотрена иммуногенная композиция
10 или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 71, где указанные композиции содержат одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) или его вариант, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетеродимер LukAB (RARPR-30), где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гетеродимер LukAB, предусматривает
15 нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 104, которая функционально связана с нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 85%, по меньшей мере
20 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 110.

[0325] В варианте осуществления 74 предусмотрена иммуногенная композиция
25 или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 71, где указанные композиции содержат одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) или его вариант, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетеродимер LukAB (RARPR-32), где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гетеродимер LukAB, предусматривает
30 нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 103, которая функционально связана с нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 85%, по меньшей мере
90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99%

сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 107.

[0326] В варианте осуществления 75 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 71, где
5 указанные композиции содержат одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) или его вариант, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетеродимер LukAB (RARPR-33), где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гетеродимер LukAB, предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по
10 меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 103, которая функционально связана с нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99%
15 сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 110.

[0327] В варианте осуществления 76 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 71, где
20 указанные композиции содержат одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) или его вариант, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетеродимер LukAB (RARPR-34), где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гетеродимер LukAB, предусматривает нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей
25 мере 99% сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 103, которая функционально связана с нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99%
сходством последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:
30 109.

[0328] В варианте осуществления 77 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по варианту осуществления 71, где одна или более молекул нуклеиновой кислоты содержатся в одном или более векторов.

[0329] В варианте осуществления 78 предусмотрена иммуногенная композиция по вариантам осуществления 71 или 77, где указанная композиция предусматривает клетку-хозяина, где указанная клетка-хозяин содержит указанную одну или более указанных молекул нуклеиновой кислоты или указанный один или более векторов.

5 **[0330]** В варианте осуществления 79 предусмотрен способ лечения или предупреждения инфекции, обусловленной бактерией рода *Staphylococcus*, у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества иммуногенной композиции или комбинации иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления

10 1—78.

[0331] В варианте осуществления 80 предусмотрен способ обеспечения развития иммунного ответа на бактерию рода *Staphylococcus* у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества иммуногенной композиции или комбинации иммуногенных

15 композиций по любому из вариантов осуществления 1—78.

[0332] В варианте осуществления 81 предусмотрен способ деколонизации или предупреждения колонизации или повторной колонизации бактерией рода *Staphylococcus* у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества иммуногенной

20 композиции или комбинации иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 1—78.

[0333] В варианте осуществления 82 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 1—78 для применения в способе обеспечения выработки иммунного ответа на *S. aureus* у субъекта.

25

[0334] В варианте осуществления 83 предусмотрена иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из вариантов осуществления 1—78 для применения в качестве лекарственного препарата.

ПРИМЕРЫ

30 **[0335]** Следующие примеры предусмотрены для иллюстрации вариантов осуществления настоящего изобретения, но ни в коем случае не предназначены для ограничения его объема.

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

[0336] Для экспрессии гетеродимерных белков LukAB клетки *E. coli*

5 BL21(DE3) контрансформировали конструкцией *lukA*, клонированной в pCDFDuet-1, и конструкцией *lukB*, клонированной в pETDuet-1. Трансформанты культивировали в 50 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл спектиномицина для отбора в отношении pETDuet-1 и pCDFDuet-1, соответственно, в бульоне Лурии-Бертани при 37°C со встряхиванием при 190 об./мин. в течение ночи. Для экспрессии свежую среду Terrific

10 Broth инокулировали разбавлением 1:50 ночной культуры при 37°C со встряхиванием при 190 об./мин. до достижения культурами $OD_{600} = 2$. Затем индуцировали экспрессию путем добавления изопропил- β -d-1-тиогалактопиранозида до конечной концентрации 1 mM и индукцию продолжали при 37°C в течение дополнительных 5 часов. В случае экспрессии гетеродимеров LukAB, которые предусматривали пары

15 цистеиновых замен в LukA и/или LukB, экспрессию осуществляли в цитоплазме клеток *E. coli* Origami 2(DE3) для способствования образованию дисульфидных связей. Экспрессию мономеров LukA в периплазме *E. coli* BL21(DE3) осуществляли путем трансформации конструкций *lukA* в pD861-CH с индукцией в Terrific Broth (с добавлением 30 мкг/мл канамицина) с использованием рамнозы при конечной

20 концентрации, составляющей 4 mM, при 37°C в течение 4 часов. После индукции как цитоплазматических, так и периплазматических конструкций экспрессии клетки собирали путем центрифугирования при 4000 об./мин. при 4°C в течение 15 мин. и затем ресуспендировали в буфере для лизиса (94% Bugbuster [EMD Millipore] + 6%

25 5 M NaCl + 0,4% 4 M имидазола + смесь ингибиторов протеазы [ProteaseArrest, G-Biosciences]). После лизиса при комнатной температуре в течение 20 минут лизаты инкубировали на льду в течение 45 минут, а затем центрифугировали при 16100 x g, 4°C в течение 35 минут. Белки очищали с помощью 6xHis-метки на N-конце LukA с использованием колонок АКТА Pure 25M FPLC и HisTrap и элюировали с помощью градиента имидазола (50—500 mM имидазола в 50 mM натрий-фосфатного буфера,

30 pH 7,4, 200 mM NaCl). Фракции, содержащие очищенный белок, как определено с помощью SDS-PAGE, объединяли и подвергали диализу в 50 mM натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, 200 mM NaCl, 10% глицерине при 4°C в течение ночи. Количественное определение очищенных белков осуществляли с помощью анализа белка с блицинхониновой кислотой (BCA) (Pierce).

Таблица 5. Иллюстративные LukA, LukB и гетеродимерные комплексы LukAB, используемые в исследованиях, описанных в данном документе

Название анатоксина/токсина	LukA	Замены в LukA	SEQ ID NO:	LukB	Замены в LukB	SEQ ID NO:
RARPR-013	CC45 W94	E321A, Lys81Leu, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile	11	CC45	Отсутствуют	16
RARPR-015	CC45 W95	E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile	4	CC45	Отсутствуют	16
RARPR-017	CC45 W96	E321A, Lys81Leu, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val	12	CC45	Отсутствуют	16
RARPR-019	CC45 W97	E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val	8	CC45	Отсутствуют	16
RARPR-30	CC45 W95	E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile	4	CC45	Val53Leu	18
RARPR-31	CC8 W95	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile	3	none		
RARPR-32	CC8 W95	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile	3	CC8	Отсутствуют	15
RARPR-33	CC8 W95	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile	3	CC45	Val53Leu	18
RARPR-34	CC8 W95	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile	3	CC8	Val53Leu	17
Мономер LukA	CC8 W97 W72	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Thr246Val, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	9	Отсутствуют		
Мономер LukA	CC45 W97 W72	E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys	10	Отсутствуют		
	CC8 W95	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile,	5	CC45	Отсутствуют	16

Название анатоксина/токсина	LukA	Замены в LukA	SEQ ID NO:	LukB	Замены в LukB	SEQ ID NO:
	W72	Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys				
	CC8 W95 W72	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	5	CC45	Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys	22
	CC8 W95 W72	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	5	CC45	Val53Leu	18
	CC8 W95 W72	E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys	5	CC45	Val53Leu, Glu45Cys, Thr122Cys, Glu110Cys, Arg155Cys	20
CC8delta10	CC8	Делеция С-концевых остатков 312—321	113	CC8	Отсутствуют	15
CC45delta10	CC45	Делеция С-концевых остатков 313—322	114	CC45	Отсутствуют	16
Токсин из CC8	CC8	Отсутствуют	1	CC8	Отсутствуют	15
Токсин из CC45	CC45	Отсутствуют	2	CC45	Отсутствуют	16

Пример 2. Цитотоксичность анатоксинов дикого типа, LukA и LukAB

[0337] Цитотоксичность белков, которые представляют собой анатоксины на основе LukAB (как определено в таблице 5), оценивали по сравнению с токсином LukAB дикого типа, используя промоноцитарную линию клеток ТНР-1 или свежeweделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (hPMN).

[0338] Дифференцирование клеток ТНР-1 обеспечивали в присутствии форбол-12-миристат-13-ацетата перед тестированием в отношении цитотоксичности.

Для анализов цитотоксичности ТНР-1 в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли в целом 1×10^5 клеток в 50 мкл RPMI. Белки, представляющие собой токсины LukAB и анатоксины на их основе, регулировали до стандартной

концентрации белка, последовательно разводили в ледяной среде RPMI и объемы каждого, составляющие 50 мкл, добавляли в соответствующие лунки. В дополнение к отрицательным контролям, представляющим собой только RPMI, в качестве положительного контроля добавляли Triton X-100 до конечной концентрации 0,1%.

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

[0339] Цитотоксичность анатоксинов LukA и LukAB в отношении

10 дифференцированных клеток ТНР-1 представлена в таблице 6 ниже.

Дифференцированные клетки ТНР-1 были чувствительны к токсинам дикого типа, так как токсины дикого типа, представляющие собой LukAB как из CC8, так и из CC45, уничтожали 30% или более популяции клеток при низких концентрациях токсинов, как 0,313 мкг/мл. Делеция последних 10 аминокислотных остатков на С-конце LukA

15 (delta10) уменьшала цитотоксичность токсина CC8delta10 до уровня, отвечающего гибели менее 5% клеток, при 40 мкг/мл, но не уменьшала цитотоксичность токсина CC45delta10 в отношении дифференцированных клеток ТНР-1. Ни один из мономеров LukA не характеризовался цитотоксичностью в отношении дифференцированных клеток ТНР-1. Этот результат был ожидаемым, так как LukA не должен образовывать активный комплекс пор в отсутствие LukB. Каждый из димерных анатоксинов LukAB, включая RARPR-33, RARPR-34 и RARPR-15, характеризовался заметно сниженной цитотоксичностью в отношении дифференцированных клеток ТНР-1, при этом показатель гибели клеток находился на уровне 1% или менее для каждого из протестированных анатоксинов при самой высокой тестируемой концентрации, 20 составляющей 40 мкг/мл.

Таблица 6. Цитотоксичность белков LukA или LukAB в отношении

дифференцированных клеток ТНР-1, линии клеток моноцитов человека, с

использованием стандартизированного количества токсина. Данные представлены как процент мертвых клеток.

Анатоксин/ токсин	Концентрация LukAB (мкг/мл)											
	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,04	0,02
RARPR-15	-12	-12	-12	-14	-14	-15	-10	-14	-12	-11	-9	-7
RARPR-30	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RARPR-31	0	0	-1	0	0	0	-1	-1	0	0	-1	-1

RARPR-32	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
RARPR-33	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
RARPR-34	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
CC8 LukA W97 (мономер)	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
CC45 LukA W97 (мономер)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
CC8delta10	4	3	1	1	0	0	0	0	0	-1	0	0
CC45delta10	53	39	32	31	33	41	54	55	53	35	13	5
Токсин из CC8	41	44	43	39	39	38	37	30	15	6	2	1
Токсин из CC45	42	34	31	34	40	46	46	36	18	4	1	0

[0340] Для hPMN перед интоксикацией все токсины нормализовали до 2,5 мкг/мл (на субъединицу), а затем пипеткой вносили 20 мкл токсина в верхние лунки 96-луночного планшета и серийно разбавляли в 2 раза в 10 мкл 1X PBS. PMN выделяли и нормализовали до 200000 клеток на 90 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). Затем пипеткой вносили 90 мкл PMN в каждую лунку и смесь токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 1 часа. Для оценки токсичности в 96-луночный планшет добавляли 10 мкл раствора CellTiter 96 Aqueous One (CellTiter; Promega) и смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 1,5 часа. Жизнеспособность PMN оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader по поглощению при длине волны 492 нм.

[0341] Цитотоксичность мономеров LukA и димерных анатоксинов LukAB в отношении первичных клеток PMN человека представлена в таблице 7 ниже. Токсины дикого типа из CC8 и CC45 характеризовались более 90% уничтожением первичных PMN человека при концентрациях токсина 0,313 мкг/мл и 1,25 мкг/мл соответственно. Для сравнения — цитотоксичность каждого из анатоксинов LukAB и мономеров LukA была значительно снижена по отношению к этим клеткам. В случае делеции 10 С-концевых остатков в LukA из CC8 цитотоксичность в отношении дифференцированных клеток ТНР-1 фактически исчезала, в то время как этот токсин сохранял цитотоксичность в отношении hPMN, причем в концентрациях, составляющих 5 мкг/мл или более, наблюдалось уничтожение на уровне более 20%. Мономеры LukA из CC8 и CC45 характеризовались незначительной цитотоксичностью в отношении hPMN, как и ожидалось для анатоксинов, лишенных компонента LukB, критически важного для образования активного комплекса пор. Каждый из димерных анатоксинов LukAB характеризовался заметно сниженной цитотоксичностью в отношении клеток hPMN по

сравнению с токсинами LukAB дикого типа из CC8 и CC45. Анатоксин LukAB RARPR-33, а также родственные анатоксины RARPR-32 и -34 характеризовались меньшей цитотоксичностью, чем CC8delta10, причем RARPR-33 уничтожал только 15% популяции клеток при самой высокой тестируемой концентрации, составляющей 20 мкг/мл.

Таблица 7. Цитотоксичность белков LukA или LukAB в отношении первичных полиморфноядерных лейкоцитов человека при применении стандартизированного количества токсина. Данные представлены как процент мертвых клеток.

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

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

[0342] Проводили дополнительный эксперимент для оценки цитотоксичности и иммуногенности RARPR-33 и различных вариантов токсина LukAB WT и мономеров LukA. Для исследований иммуногенности использовали мышей.

15 [0343] Цитотоксичность LukAB токсинов, анатоксинов и мономеров оценивали на PMN человека. Перед интоксикацией все токсины нормализовали до 100 мкг/мл (на субъединицу), а затем пипеткой вносили 20 мкл токсина в верхние лунки 96-луночного планшета и серийно разбавляли в 2 раза в 10 мкл 1X PBS. PMN выделяли от различных доноров и нормализовали до 200000 клеток на 90 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). Пипеткой вносили 90 мкл PMN в каждую лунку и смесь токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 1 часа. Для

20

оценки токсичности в 96-луночный планшет добавляли 10 мкл раствора CellTiter 96 Aqueous One (CellTiter; Promega) и смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 1,5 часа. Жизнеспособность PMN оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader по поглощению при длине волны 492 нм. Процент мертвых клеток рассчитывали путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X100, которые принимают за 100% мертвых.

[0344] Цитотоксичность мономеров LukA и токсинов LukAB в отношении первичных клеток PMN человека представлена на ФИГ. 3. Токсины LukAB дикого типа из CC8 и CC45 характеризовались более 90% уничтожением первичных PMN человека при концентрациях токсина 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно. Максимальное уничтожение также наблюдалось для гибридных токсинов LukAB CC8/CC45 и CC45/CC8 при 2,5 мкг/мл. Для сравнения — цитотоксичность анатоксинов LukAB и мономеров LukA была значительно снижена по отношению к этим клеткам. В случае делеции 10 С-концевых остатков в LukA из CC8 цитотоксичность в отношении hPMN сохранялась, причем в концентрациях, составляющих 5 мкг/мл или более, наблюдалось уничтожение на уровне более 20%. Мономеры LukA из CC8 и CC45, а также комбинация этих мономеров характеризовались незначительной цитотоксичностью в отношении hPMN. Анатоксин LukAB RARPR-33 характеризовался меньшей цитотоксичностью, чем CC8Δ10C, причем RARPR-33 уничтожал только 15% популяции клеток при самой высокой тестируемой концентрации, составляющей 20 мкг/мл.

Пример 4. Иммуногенность вариантов LukAB у мышей

[0345] Для определения иммуногенности различных вариантов LukAB мышам Envigo Hsd:ND4 (в возрасте 4 недели) (n = 5/антиген) подкожно вводили 20 мкг LukAB в 50 мкл 10% глицерина 1X TBS, смешанного с 50 мкл адьюванта TiterMax® Gold. Когорта из 5 мышей также получала иммунизацию имитационным контролем, который состоял из равных объемов 10% глицерина 1X TBS и TiterMax® Gold. После двух бустерных введений одного и того же коктейля антиген-адьювант с интервалом в две недели у мышей брали кровь с помощью сердечной пункции и получали сыворотку крови.

[0346] Для определения титра антител к LukAB проводили ELISA. LukAB из CC8 или CC45 WT разводили до 2 мкг/мл в 1X PBS и наносили 100 мкл на 96-луночные планшеты Immulon 2HB (Thermo Fisher, кат. № 3455) и инкубировали при

4°C в течение ночи. Затем планшеты промывали 3X буфером для промывания (1X PBS + 0,05% Tween) и затем блокировали с помощью 200 мкл блокирующего буфера (2,5% молока в 1X PBS) в течение 1 ч. Получали пятикратные серийные разведения, начиная с 1:500, сыворотки крови в блокирующем буфере и обеспечивали их инкубацию на шейкере в течение 1 ч. Затем планшеты снова промывали 3X и добавляли антитело, представляющее собой IgG-HRP мыши (Biorad), разведенное в соотношении 1:5000 в блокирующем буфере, и инкубировали в течение 1 ч. при комнатной температуре. Несвязанное вторичное антитело промывали в трех последовательных промывках буфером для промывки. В каждую лунку добавляли ТМВ (100 мкл), нагретый до комнатной температуры, и инкубировали под крышкой в течение 25 мин. После завершения реакции в каждую реакционную лунку добавляли равное количество 2 н. серной кислоты, чтобы остановить реакцию. Затем планшеты считывали на устройстве для считывания планшетов Envision по поглощению при длине волны 450 нм. Тепловые карты, изображенные на фигурах 4А и 4В, показывают средние значения поглощения из повторных измерений, где черным цветом обозначено высокое поглощение и связывание антител с покрывающим антигеном, а белым обозначено низкое поглощение и отсутствие связывания антител.

[0347] RARPR-33 вызывал выработку устойчивых титров антител IgG к LukAB из CC8 и к LukAB из CC45 из (фиг. 4А и рис. 4В). Иммунизация с помощью RARPR-33 вызывала ответы в виде антитела, представляющего собой IgG к CC8, сопоставимые с иммунизацией токсином из CC8 WT, гибридным токсином CC8/CC45 и анатоксином CC8Δ10С. Титры IgG к LukAB из CC8, индуцированные отдельным мономером LukA из CC8, были не такими высокими, как титры, индуцированные токсином LukAB из CC8 или гибридным токсином CC8/CC45, гибридным токсином CC45/CC8 и гибридными антигенами RARPR 33 (ФИГ. 4А).

[0348] Титры антитела к LukAB из CC45 у мышей, иммунизированных с помощью RARPR-33, были выше, чем титры, вызванные гибридным антигеном CC8/CC45 WT, и были на одном уровне с титрами, вызванными антигеном из CC45 WT. Комбинирование мономеров LukA из CC8 и CC45 вызвало образование титров антител к LukAB как из CC8, так и из CC45 (ФИГ. 4В). Однако эти титры антител к LukAB из CC8 и CC45, вызванные объединенными мономерами LukA из CC8 и CC45, были не такими высокими, как титры, вызванные RARPR 33. Отдельный мономер LukA из CC45 вызывает образование очень высоких титров антитела к LukAB из CC45, которые схожи с уровнями, вызванными гибридом CC45/CC8, и лишь немного

ниже, чем уровни, вызванные RARPR-33 или токсином из CC45 WT. Эти результаты показывают, что при иммунизации с помощью RARPR-33 индуцируются реакции в виде выработки антител к LukAB как из CC8, так и из CC45, которые характеризуются высоким значением.

5 Пример 5. Опосредованная антителами нейтрализация цитотоксичности токсина [0349]

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

[0350] Образцы сыворотки крови от мышей, иммунизированных с помощью RARPR-33, проявили наиболее эффективную LukAB-нейтрализующую способность широкого спектра действия для всех антигенов (ФИГ. 5). Образцы сыворотки крови от мышей, иммунизированных с помощью RARPR 33, в значительной степени нейтрализовали цитотоксический эффект всех 11 протестированных вариантов LukAB уже при уровне 0,25% сыворотки крови, и для большинства вариантов LukAB также обеспечивали защиту уже при уровне 0,063—0,125% сыворотки крови (ФИГ. 5). Иммунизация отдельными мономерами LukA из CC8 и CC45 обеспечила получение образцов сыворотки крови с LukAB-нейтрализующей способностью, сильно смещенной к остову антигена (ФИГ. 5). Комбинация мономера LukA из CC8 с LukA из CC45, введенная из расчета 20 мкг каждого мономера (40 мкг общего белка) для каждой иммунизации, обеспечила получение образцов сыворотки крови с LukAB-нейтрализующей способностью, которая характеризовалась как широким спектром

действия, так и эффективностью, обеспечивая нейтрализацию всех протестированных 11 вариантов LukAB уже при уровне 0,5% сыворотки крови (ФИГ. 5), однако это ниже, чем наблюдалось в случае образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных с помощью RARPR-33.

- 5 **[0351]** В совокупности данные, представленные в примерах 3—5, показывают, что аттенуирующие и стабилизирующие мутации, включенные в остов LukAB из CC8/CC45 RARPR-33, обеспечивают улучшение в отношении широты спектра иммуногенных эффектов гибрида LukAB из CC8/CC45 WT (ФИГ. 4 и 5),
 10 одновременно также обеспечивая высокую степень аттенуации RARPR-33 по сравнению с токсином LukAB из CC8/CC45 WT (ФИГ. 3).

Пример 6. Нейтрализация токсинов посредством образцов антисыворотки

- [0352]** Опосредованную антителами нейтрализацию цитотоксичности токсина оценивали с использованием сыворотки крови, полученной от мышей, иммунизированных с помощью LukAB дикого типа, гибридами LukAB дикого типа
 15 (т. е. LukA из CC8/LukB из CC45 и LukA из CC45/LukB из CC8), мономерами LukA или анатоксинами LukAB. Объединенные образцы сыворотки крови, инактивированные нагреванием, нормализовали до 40% сыворотки крови в PBS, а затем пипеткой вносили 20 мкл сыворотки крови в верхние лунки 96-луночного
 20 планшета и серийно разводили в 2 раза в 10 мкл 1X PBS. Затем LD₉₀ каждого из вариантов последовательности клонального комплекса токсина LukAB добавляли в лунки планшета (10 мкл/лунка), который содержал 2%, 1% или 0,5% сыворотки крови, на 15 мин. при комнатной температуре. Затем к смеси сыворотки и токсина вносили свежевыделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (hPMN) от разных доноров, нормализованные до 200000 клеток на 80 мкл RPMI
 25 (10 mM HEPES + 0,1% HSA) и инкубировали их в течение 1 ч при 37°C + 5% CO₂. Для оценки токсичности в 96-луночный планшет добавляли 10 мкл раствора CellTiter 96 Aqueous One (CellTiter; Promega) и смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 1,5 часа. Жизнеспособность PMN оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader по поглощению при длине волны 492 нм. Данные по
 30 нейтрализации антител представлены в таблицах на ФИГ. 6А (2% сыворотки крови с антителами), ФИГ. 6В (1% сыворотки крови с антителами) и ФИГ. 6С (0,5% сыворотки крови с антителами).

[0353] Иммунизация с помощью LukAB дикого типа из CC8 и CC45 вызвала образование антител, которые нейтрализовали встречающиеся в природе варианты

последовательностей токсинов LukAB с паттерном, отражающим состав последовательности антигена, которым осуществляли иммунизацию. Антитела, образование которых было вызвано токсином LukAB из CC8, эффективно нейтрализовали токсины, полученные из CC8, CC1, CC5 и других линий *S. aureus*, но они не обеспечивали полной нейтрализации токсинов, полученных из CC30, CC45 или ST22A *S. aureus*. Аналогичным образом иммунизация токсином LukAB из CC45 вызвала образование антител, которые эффективно нейтрализовали токсины, полученные из линий CC30, CC45 или ST22A *S. aureus*, но не токсины, полученные из других линий.

10 **[0354]** Иммунизация мышей неестественным гибридом LukAB, либо LukA из CC8 в комбинации с LukB из CC45, либо LukA из CC45 в комбинации с LukB из CC8, вызвала образование антител, которые характеризовались более широким спектром нейтрализации вариантов последовательности LukAB по сравнению с встречающимися в природе комбинациями димеров. Из неестественных гибридных димеров LukA из CC8 и LukB из CC45 характеризовались несколько лучшим профилем нейтрализации, чем противоположная комбинация, а именно паттерн, который сохранялся в белках, которые характеризуются заменой Glu на Ala в предпоследнем остатке LukA (E323A). Как наблюдалось для образования антител к токсинам дикого типа, мономеры LukA вызывали образование антител, которые 15 характеризовались паттерном нейтрализации, указывающим на составы их последовательности. Комбинация мономеров LukA из CC8 и LukA из CC45 (RARPR-31 + CC45 LukA W97) вызвала образование антител, которые характеризовались широким нейтрализующим паттерном, но эффективность нейтрализации была снижена по сравнению с димерными антигенами, о чем свидетельствует сниженный 20 уровень нейтрализации в случае 1% или 0,5% образцов сыворотки крови.

[0355] Среди димерных анатоксинов RARPR-15, RARPR-33 и RARPR-34 демонстрировали ответ в виде выработки нейтрализующих антител с широким спектром действия на все протестированные варианты последовательности LukAB. Неестественные комбинации димеров дикого типа также характеризовались широким профилем нейтрализации, хотя эффективность нейтрализующего ответа уступала той, 30 которая наблюдалась для нескольких анатоксинов. Как гибридные антигены дикого типа, так и антигены, представляющие собой анатоксины, характеризовались широким нейтрализующим профилем при тестировании с использованием 2% (ФИГ. 6А) и 1% (ФИГ. 6В) образцов сыворотки крови, но улучшенная эффективность

ответа на анатоксины была очевидна при тестировании с использованием 0,5% образцов сыворотки крови (ФИГ. 6С). При этой самой низкой протестированной концентрации каждый из RARPR-15, RARPR-32, RARPR-33 и RARPR-34 характеризовался нейтрализующим ответом широкого спектра. RARPR-33, в частности, обеспечивал получение образцов сыворотки крови, которые сохраняли 5
нейтрализующий ответ широкого спектра, тогда как гибридные антигены дикого типа и анатоксины E323A не вызывали ответа с широким спектром защиты при использовании 0,5% образцов сыворотки крови, а паттерн нейтрализации, вызванной анатоксином из CC45 RARPR-15 при самой низкой протестированной концентрации, 10
отражал состав его последовательности, поскольку высокие уровни нейтрализации наблюдались только для токсинов LukAB из CC30, CC45 и ST22A. Гибридный димерный анатоксин RARPR-33 вызвал нейтрализующий иммунный ответ, который характеризовался эффективностью и широким спектром действия.

Пример 7. Цитотоксичность RARPR-33 в высоких концентрациях

15 Способы

[0356] Анализ цитотоксичности. Для оценки цитотоксичности каждого соответствующего белкового комплекса LukAB свежевыделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (PMN) подвергали интоксикации токсинами *S. aureus*. PMN выделяли от различных доноров и нормализовали до 200000 клеток на 20
50 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). К клеткам добавляли 50 мкл токсина в PBS и смесь токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 1 ч. Для оценки токсичности в 96-луночный планшет добавляли 10 мкл раствора CellTiter 96 Aqueous One (CellTiter; Promega) и смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 1,5 ч. Жизнеспособность PMN оценивали с помощью прибора PerkinElmer 25
EnVision 2103 Multilabel Reader по поглощению при длине волны 492 нм. % мертвых клеток рассчитывают путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X, которые принимают за 100% мертвых.

[0357] Анализ на основе выявления LDH. Чтобы оценить, может ли каждый 30
соответствующий белковый комплекс LukAB вызывать лизис клеток, свежевыделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (PMN) от разных доноров подвергали интоксикации токсинами, представляющими собой LukAB *S. aureus*, и измеряли высвобождение LDH. Токсины WT серийно разводили в 2 раза в PBS и тестировали в концентрациях, находящихся в диапазоне 5—

0,0024 мкг/мл. Анатоксины LukAB разводили в PBS и тестировали при концентрациях 2,5, 2, 1, 1,5 и 0,5 мг/мл. PMN выделяли и нормализовали до 200000 клеток на 50 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). Затем 50 мкл PMN пипеткой вносили в каждую лунку и добавляли 50 мкл разведенного токсина на лунку. Смесь токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 2 ч. Для оценки высвобождения LDH планшеты центрифугировали при 1500 об./мин. в течение 5 мин., затем 25 мкл надосадочной жидкости удаляли из каждой лунки и переносили в 96-луночные черные планшеты с прозрачным дном. 25 мкл реагента для определения равномерной целостности мембран CytoTox-ONE (Promega) добавляли в черный 96-луночный планшет с прозрачным дном и смесь инкубировали в течение 10 мин. при комнатной температуре в темноте. Лизис клеток оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader путем регистрации флуоресценции с длиной волны возбуждения 560 нм и длиной волны испускания 590 нм. % мертвых клеток рассчитывали путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X, которые принимали за 100% мертвых.

Результаты

[0358] В предыдущих примерах цитотоксичность анатоксина LukAB RARPR-33 относительно hPMN определяли до концентрации 20 мкг/мл. Далее осуществляли мониторинг цитотоксичности в отношении PMN человека в присутствии более высоких концентраций (до 2,5 мг/мл) RARPR-33. Максимальная цитотоксичность PMN человека (4—6 доноров) на основании измерений с помощью CellTiter наблюдали для токсинов LukAB WT из CC8, CC45 и CC8/CC45 после 1-часовой интоксикации токсином в количестве ~0,156 мкг/мл (ФИГ. 7А). Для RARPR-33 и мономера LukA из CC8 процент мертвых клеток, измеренный с помощью CellTiter, составлял приблизительно 10% при концентрации 0,5 мг/мл (ФИГ. 7В). Инкубация PMN с RARPR-33 или мономером LukA из CC8 в концентрациях до 2,5 мг/мл не приводила к дальнейшему увеличению процента мертвых клеток, определенного с помощью измерений с использованием CellTiter.

[0359] С помощью значения LD₁₅ обозначают концентрацию антигена, которая вызывает гибель 15% клеток. LD₁₅ определяли с помощью линейной регрессии. Для LukAB из CC8 WT значение LD₁₅ составляло 0,013 мкг/мл, для LukAB из CC45 WT значение LD₁₅ составляло 0,004 мкг/мл, а для гибрида LukAB из CC8/CC45 значение LD₁₅ составляло 0,002 мкг/мл. Значение LD₁₅ для LukAB RARPR-33 составляло

2,5 мг/мл. Значения LD₁₅ сравнивали путем деления концентраций LD₁₅ RARPR-33 на концентрацию LD₁₅ антигенов WT. На основании этих наблюдений токсичность LukAB RARPR-33 в более чем 192308 раз меньше, чем у LukAB из CC8 WT, в более чем 625000 раз меньше, чем у LukAB из CC45 WT, и в более чем 1250000 раз меньше, чем у гибрида LukAB CC8/CC45.

[0360] Кроме того, проводили анализ на основе выявления LDH для оценки повреждения цитоплазматической мембраны после двух часов инкубации с различными токсинами WT, мономером LukA из CC8 или RARPR-33.

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

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

[0361] Получали анатоксин LukAB на основе остова CC8, в котором LukA характеризуется наличием мутации D39A, а LukB характеризуется наличием точечной мутации R23E. Этот «анатоксин D39A/R23E» описан в работе Kailasan, S. et al, «Rational Design of Toxoid Vaccine Candidates for *Staphylococcus aureus* Leukocidin AB (LukAB)», *Toxins* 11(6): (2019), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Этот анатоксин получали на остове LukAB из CC8, и согласно описанию его токсичность была аттенуирована в более чем 36000 раз по сравнению с токсином LukAB из CC8 WT. Цитотоксичность определяли с использованием линии клеток HL-60, дифференцированной с обеспечением сходства с PMN. В настоящем эксперименте проводили сравнение между анатоксином D39A/R23E и RARPR-33. Определяли цитотоксичность в отношении полиморфноядерных лейкоцитов человека (PMN) и оценивали способность индуцировать токсиннейтрализующие антитела с широким спектром действия после иммунизации.

Способы

- [0362] Анализы цитотоксичности.** Для оценки цитотоксичности каждого соответствующего белкового комплекса LukAB свежевыделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты человека (PMN) от различных доноров подвергали интоксикации токсинами *S. aureus*. PMN выделяли и нормализовали до 200000 клеток на 50 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). К клеткам добавляли 50 мкл токсина в PBS и смесь токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 2 ч. Для оценки токсичности в 96-луночный планшет добавляли 10 мкл раствора CellTiter 96 Aqueous One (CellTiter; Promega) и смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 1,5 ч. Жизнеспособность PMN оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader по поглощению при длине волны 492 нм. Процент мертвых клеток рассчитывают путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X, которые принимают за 100% мертвых.
- [0363] Анализ на основе выявления LDH.** Для оценки, вызывает ли каждый соответствующий белковый комплекс LukAB лизис клеток, свежевыделенные первичные полиморфноядерные лейкоциты (PMN) человека от разных доноров интоксицировали токсинами LukAB от *S. aureus* и измеряли высвобождение LDH. Токсины WT серийно разводили в 2 раза в PBS и тестировали в концентрациях, находящихся в диапазоне 0,5 мкг/мл — 0,00024 мкг/мл. Анатоксины LukAB разводили в PBS до концентрации, находящейся в диапазоне от 1 мкг/мл до 0,03125 мкг/мл, и тестировали. PMN выделяли и нормализовали до 200000 клеток на 50 мкл RPMI (10 mM HEPES + 0,1% HSA). Затем PMN (50 мкл) пипеткой вносили в каждую лунку и добавляли 50 мкл разведенного токсина на лунку. Смеси токсин-PMN инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 2 ч. Для оценки высвобождения LDH планшеты центрифугировали при 1500 об./мин. в течение 5 мин., затем 25 мкл надосадочной жидкости удаляли из каждой лунки и переносили в 96-луночные черные планшеты с прозрачным дном. 25 мкл реагента для определения равномерной целостности мембран CytoTox-ONE (Promega) добавляли в черный 96-луночный планшет с прозрачным дном и смесь инкубировали в течение 10 мин. при комнатной температуре в темноте. Лизис клеток оценивали с помощью прибора PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel Reader путем регистрации флуоресценции с длиной волны возбуждения 560 нм и длиной волны испускания 590 нм. Процент мертвых клеток рассчитывали путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и

нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X, которые принимали за 100% мертвых.

[0364] Иммунизации мышей. Мышам Envigo Hsd:ND4 (в возрасте 4 недели) ($n = 5$ /антиген) подкожно вводили 20 мкг LukAB в 50 мкл 10% глицерина 1X TBS, смешанного с 50 мкл адьюванта TiterMax® Gold. После двух бустерных введений одного и того же коктейля антиген/адьювант у мышей брали кровь с помощью сердечной пункции и получали сыворотку крови для исследований нейтрализации токсинов.

[0365] Анализ нейтрализации токсинов. Образцы сыворотки крови от иммунизированных мышей собирали из каждой группы и инактивировали путем нагревания на водяной бане при 55°C в течение 30 мин. Затем объединенные образцы сыворотки крови, инактивированные нагреванием, разбавляли до 40% PBS. Потом получали дальнейшие разведения образцов сыворотки крови путем серийного разведения 40% исходных растворов в 2 раза в 10 мкл PBS в 96-луночном планшете.

Токсин (10 мкл) добавляли в лунки с сывороткой крови в конечной концентрации 0,156 мкг/мл токсина (LD90). В каждую лунку добавляли 80 мкл hPMN в концентрации 200000 клеток в RPMI + 0,1% HSA + 10 mM HEPES. Затем планшеты инкубировали в инкубаторе при 37°C + 5% CO₂ в течение 1 ч. После инкубации добавляли Cell Titer к образцам, для которых была обеспечена интоксикация, и инкубировали в течение 1,5 ч. После инкубации планшеты затем считывали на устройстве для считывания планшетов при длине волны поглощения 492 нм. Проценты мертвых клеток рассчитывали путем вычитания исходного уровня (здоровые клетки + PBS) и нормализации относительно клеток, обработанных с помощью Triton X, которые принимают за 100% мертвых.

25 **Результаты**

[0366] Сообщалось, что цитотоксичность анатоксина D39A/R23E тестировали до приблизительно 12 мкг/мл. В данном документе цитотоксичность RARPR-33 и анатоксина D39A/R23E определяли в отношении PMN человека до концентрации 1 мг/мл. Кроме того, для сравнения были протестированы LukAB из CC8, CC45 и CC8/CC45 WT. Максимальная цитотоксичность в отношении PMN человека на основе измерений с помощью CellTiter наблюдалась после 1-часовой интоксикации с помощью приблизительно 0,02 мкг/мл LukAB из CC8/CC45 WT, приблизительно 0,03 мкг/мл LukAB из CC8 и 0,125 мкг/мл LukAB из CC45 (ФИГ. 8А). Показано среднее значение для 5 доноров. Для анатоксина D39A/R23E при инкубации с 1 мг/мл

наблюдалась примерно 22% цитотоксичность. Для RARPR-33 процент мертвых клеток, измеренный с помощью Cell Titer, составлял примерно 3% при концентрации 1 мг/мл (ФИГ. 8B).

[0367] Кроме того, проводили анализ на основе выявления LDH для оценки повреждения цитоплазматической мембраны после двух часов инкубации с различными токсинами WT, анатоксином D39A/R23E и RARPR-33. Цитотоксичность в отношении PMN человека индуцировали через 2 часа после контакта с токсинами WT, CC8 WT, CC45 WT и гибридами, которые являются комбинацией токсинов из CC8/CC45 (ФИГ. 8C). Максимальный уровень гибели клеток, определенный с помощью LDH, наблюдался при концентрации токсина 0,25 мкг/мл токсина. После контакта PMN человека с анатоксином D39A/R23E с концентрациями до 1 мг/мл в течение двух часов наблюдалась гибель примерно 8% клеток. При инкубации PMN человека с аналогичной концентрацией RARPR-33 не наблюдалось повреждения цитоплазматической мембраны, что указывает на отсутствие гибели клеток (ФИГ. 8D). Эти результаты указывают на то, что RARPR-33 аттенуирован ниже предела выявления в анализе и он аттенуирован в большей мере, чем анатоксин D39A/R23E.

[0368] Образцы сыворотки крови от мышей, иммунизированных с помощью RARPR-33 или анатоксином D39A/R23E, тестировали в анализе нейтрализации токсина для оценки способности образцов сыворотки крови предупреждать вызванную токсинами гибель PMN-клеток человека. Нейтрализацию шестнадцати различных токсинов LukAB тестировали на PMN, выделенных от 4 доноров.

[0369] В присутствии 0,125% образцов сыворотки крови от иммунизированных с помощью RARPR 33 мышей цитотоксический эффект всех 16 протестированных вариантов LukAB был нейтрализован (ФИГ. 9). При аналогичной концентрации сыворотки крови образцы сыворотки крови от мышей, иммунизированных анатоксином D39A/R23E, защищали лишь от цитотоксического эффекта LukAB из CC8 точно так же, как образцы сыворотки крови от мышей, иммунизированных с помощью RARPR-33. Против всех других токсинов не наблюдалось защиты или наблюдался значительно более низкий уровень защиты для образцов сыворотки крови, полученных от мышей, иммунизированных анатоксином D39A/R23E. Эти результаты показывают, что иммунизация с помощью RARPR-33 вызвала ответ в виде нейтрализации токсинов, который характеризовался значительно более широким спектром действия, чем иммунизация анатоксином D39A/R23E.

Пример 9. Термическая стабилизация анатоксинов LukAB

[0370] Стабильность анатоксинов LukAB по сравнению с белком дикого типа оценивали с помощью экспериментов термического развертывания с использованием собственной флуоресценции триптофана или тирозина для оценки температуры плавления (T_m), соответствующей средней точке перехода белка из свернутого в развернутое состояние. Термическую стабильность оценивали с помощью прибора PromethiusNT.Plex от NanoTemper (NanoTemper Inc., Германия). Измерения разворачивания под действием температуры проводили на образцах белка в количестве от 0,3 до 1 мг/мл (20 мкл, буфер: 50 mM натрий-фосфатный буфер, 200 mM NaCl, pH 7,4, 10% глицерин) в двух повторностях для каждого образца. Интерфейс пользователя Prometheus NanoDSF (вкладка Melting Scan) использовался для настройки экспериментальных параметров для цикла. Термические сканирования для типичного образца охватывают диапазон от 20°C до 95°C со скоростью 1,0°C/мин. Стандартное mAb (CNT05825 или NIST) в том же буфере, который использовался для образцов, включали в качестве контроля и анализы проводили в двух повторностях. Профили термического плавления анализировали с помощью программного обеспечения поставщика PR.ThermControl с определением температуры, при которой разворачивается 50% белка (T_m).

[0371] В таблицах 8А и 8В показана термическая стабильность белков, которые представляют собой анатоксины на основе LukA и LukAB, оцененная с помощью nanoDSF. Показаны температура начала разворачивания белка (T_{onset}) и средняя точка перехода (T_{m1}) разворачивания белка, а также разница в T_m между сравнительными конструкциями со стабилизирующими заменами и без них (ΔT_m).

Таблица 8А. Одиночные замены в генетической основе CC45 и комбинированные замены в гибридной генетической основе CC8/CC45

Название токсина	LukA	LukB	Tonset	Tm1	ΔT_m^a
Токсин из CC45	CC45 LukA ^{E321A}	CC45 LukB ^{wt}	40,3	47,3	--
Токсин из CC8/CC45	CC8 LukA ^{E320A}	CC45 LukB ^{wt}	37,7	43,9	--
	CC45 LukA ^{E321A, Lys81Met}	CC45 LukB ^{wt}	40,5	47,4	0,1
	CC45 LukA ^{E321A, Ser139Ala}	CC45 LukB ^{wt}	40,5	47,4	0,1
	CC45 LukA ^{E321A, Val111Ile}	CC45 LukB ^{wt}	40,0	47,7	0,4
	CC45 LukA ^{E321A, Val190Ile}	CC45 LukB ^{wt}	40,5	47,5	0,2
	CC45 LukA ^{E321A, Thr247Val}	CC45 LukB ^{wt}	41,3	47,3	0
	CC45 LukA ^{E321A}	CC45	40,7	47,8	0,5

		LukB ^{Val53Leu}			
RARPR-15	CC45 LukA ^{E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile}	CC45 LukB ^{wt}	41,2	48,9	1,6
RARPR-33	CC8 LukA ^{E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile}	CC45 LukB ^{Val53Leu}	40,0	47,9	4,0
Мономер LukA	CC8 LukA ^{E320A, Lys80Met, Ser138Ala, Val110Ile, Val190Ile, Thr246Val, Tyr71Cys, Asp137Cys, Gly146Cys, Gly153Cys}	Без LukB	45,2	61,8	--
Мономер LukA	CC45 LukA ^{E321A, Lys81Met, Ser139Ala, Val111Ile, Val191Ile, Thr247Val, Tyr72Cys, Asp138Cys, Gly147Cys, Gly154Cys}	Без LukB	51,9	58,1	--

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

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

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

10 **Таблица 8В.** Одиночные замены в генетической основе CC8 и комбинированные замены в гибридной генетической основе CC8/CC45

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

[0372] **Результаты.** Анализ термической стабильности (таблица 8А) показал, что белок CC45 LukA^{E321A}/LukB из CC45 характеризовался значением T_m на 3°C

15 выше, чем T_m для гибридного белка CC8 LukA^{E321A}/LukB из CC45. Отдельные замены в LukA из CC45 в сочетании с LukB^{wt} из CC45 приводили к умеренному увеличению T_m от 0 до 0,4°C. Замена Val53Leu в LukB приводила к увеличению T_m на 0,5°C.

Поскольку гибридные анатоксины LukAB включали основу LukA из CC8, отдельные аминокислотные замены тестировали в LukA из CC8 в комбинации с LukB из CC45 дикого типа (таблица 8B). Как видно для LukA из CC45, отдельные замены в LukA из CC8 также обеспечивали повышение значений Tm выше, чем у LukAB дикого типа.

- 5 Комбинации замен в LukA (RARPR-15) обеспечивали значение Tm, которое было на 1,6°C выше, чем для белка CC45 LukA^{E321A}/LukB из CC45, а комбинация замен в LukA из CC8 с LukB^{Val53Leu} (RARPR-33) обеспечивала значение Tm, которое было на 4°C выше, чем для гибрида CC8 LukA^{E321A}/LukB из CC45. Повышенная термическая стабильность RARPR-33 наблюдалась в обоих наборах данных (таблицы 8A и 8B).
- 10 Хотя nanoDSF может обуславливать некоторую вариабельность для белков, которые разворачиваются при температуре ниже 50°C, ΔTm, определенная с помощью контролей, которые анализировали в каждом наборе, была постоянной в наборах данных при 4,0 и 4,1°C соответственно. Мономеры LukA предусматривали как комбинации замен, так и пары цистеиновых замен и характеризовались повышенными значениями Tm, составляющими ≥ 58°C, что указывает на дальнейший вклад дисульфидных связей в повышение термической стабильности.

Обсуждение примеров 1—9

- [0373] Описанные в данном документе анатоксины, представляющие собой стабильные варианты гетеродимеров LukAB, обладают рядом характеристик, которые обеспечивают их высокую степень пригодности в качестве кандидатов для применения в качестве вакцинных антигенов *S. aureus*.

- [0374] Во-первых, анатоксины, представляющие собой мономеры LukA и димер LukAB, в том числе RARPR-30, RARPR-31, RARPR-32, RARPR-33, RARPR-34 и RARPR-15, характеризовались заметно сниженной цитотоксичностью по отношению к дифференцированным ТНР-1 человека и PMN человека в сравнении с токсинами дикого типа и другими известными анатоксинами (*m. e.* анатоксинами CC8delta10 и CC45delta10). Даже в концентрациях до 2,5 мг/мл RARPR-33 оставался нецитотоксическим, демонстрируя полную аттенуацию.

- [0375] Во-вторых, комбинация замен, введенных в варианты белков LukA и LukB, обеспечивала значительное повышение термической стабильности гетеродимерных комплексов RARPR по сравнению с соответствующими анатоксинами, которые характеризуются наличием только одной замены. В частности, комбинации замен в LukA (RARPR-15) давали значение Tm на 1,6°C выше, чем у белка LukA^{E321A} из CC45 / LukB из CC45, а комбинация замен в LukA из CC8 с^{Val53Leu} в LukB

(RARPR-33) приводила к значению T_m , которое было на 4°C выше, чем у гибрида LukA^{E321A} из CC8 / LukB из CC45.

[0376] Помимо аттенуированной цитотоксичности и повышенной термической стабильности описанные в данном документе анатоксины LukAB RARPR, в частности RARPR-15, RARPR-33 и RARPR-34, вызывали ответ в виде нейтрализации токсинов, который характеризовался сопоставимым или более широким спектром действия, и более высокие титры нейтрализующих антител, чем токсины CC45 и CC8 дикого типа, гибридные токсины дикого типа и анатоксины, включая анатоксины E323A и анатоксин D39A/R23E.

[0377] Таким образом, аттенуированная цитотоксичность, улучшенная термическая стабильность, устойчивая иммуногенность и широкий профиль нейтрализующих антител делают описанные в данном документе анатоксины LukAB RARPR идеальными кандидатами для применения в качестве вакцинных антигенов.

Пример 10. Действенность LukAB RARPR-33, Spa* и GLA-SE в модели инфекции в хирургической ране у минипигов

[0378] Цель эксперимента заключалась в оценке, может ли комбинация антигена, представляющего собой вариант Spa, и димера LukAB RARPR с глюкopiранозиллипидным адьювантом (GLA), агонистом toll-подобного рецептора 4 (TLR), или без него обеспечить защиту в модели инфекции *S. aureus* в хирургической ране у геттингенских минипигов. Вариант антигена Spa (Spa*), который был протестирован, характеризовался аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:60. Мутантный димер LukAB RARPR-33, который был протестирован, содержит вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, и вариант полипептида LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18. Адьювант GLA был составлен в виде стабильной эмульсии (SE) и содержал 10 мкг GLA и 2% SE.

[0379] Эксперимент *in vivo*. Самцов геттингенских минипигов (по 3 свиньи на группу) иммунизировали внутримышечно 3 отдельных раза с 3-недельными интервалами в соответствии со схемой, показанной на ФИГ. 10, следующими композициями или комбинациями композиций:

1. контроль в виде буфера (без адьюванта, без LukAb RARPR-33, без Spa*);
2. LukAB RARPR-33 (100 мкг) + Spa* (100 мкг) + адьювант GLA-SE (10 мкг);
3. LukAB RARPR-33 (100 мкг) + Spa* (100 мкг), без адьюванта;

4. только адъювант GLA-SE (10 мкг).

[0380] После вакцинации свиней заражали клинически релевантным штаммом *S. aureus*, т. е. клональным комплексом (CC) 398. На день +8 после инфицирования свиней подвергали эвтаназии и определяли у них бактериальную нагрузку в участке хирургического вмешательства.

[0381] Первичной конечной точкой исследования было снижение бактериальной нагрузки (КОЕ) в участке хирургического вмешательства у животных, вакцинированных LukAB + вариант Spa с адъювантом или без него. В качестве контролей использовали вакцинацию отдельно адъювантом или отдельно буфером для составления.

Материалы и способы

[0382] Способы инфицирования в хирургической ране у минипигов.

Самцов геттингенских минипигов в возрасте от пяти до восьми месяцев (Marshall Biosciences, Норт-Роуз, Нью-Йорк) размещали группами и содержали при 12-часовом цикле свет/темнота со свободным доступом к воде. Утром в день хирургической операции минипигам натошак давали седативное средство, интубировали и помещали под изофлурановую анестезию на время хирургической операции. Хирургическую операцию проводили на левом бедре, при этом обнажали мышечный слой и вводили безлезвийный троакар диаметром 5 мм (Endopath® Xcel, Ethicon Endo-Surgery, Гуайнабо, Пуэрто-Рико) на глубину бедренной кости. Средство для заражения бактериями, состоящее из 20 мкл инокулята (примерно $6 \log_{10}$ КОЕ/мл *S. aureus*), вводили в рану (верхнюю часть бедренной кости) с помощью 6-дюймовой иглы для спинномозговой пункции MILA (Mila International, Inc., Флоренция, Кентукки) через троакар, который затем удаляли. После введения средства для заражения бактериями мышцу зашивали одним шелковым швом и зашивали кожу рассасывающейся нитью из PDS. Спустя восемь дней минипигов, находящихся под воздействием седативным средством, подвергали эвтаназии барбитуратом. После подтверждения смерти органы по-отдельности подвергали обработке для микробиологического анализа. Образцы гомогенизировали в солевом растворе с помощью Bead Ruptor Elite (Omni International, Кеннесо, Джорджия, США), затем разводили и высевали на чашки с TSA с помощью аппарата для спирального посева бактерий на чашки Autoplate 5000 (Spiral Biotech, Норвуд, Массачусетс, США). Чашки инкубировали в течение 18—24 ч при 37°, затем считывали на счетчике колоний QCount (Spiral Biotech, Норвуд, Массачусетс, США).

[0383] Для проверки статистической значимости результатов при сравнении нескольких групп проводили однофакторный дисперсионный анализ с использованием критерия множественного сравнения Даннетта. Модель на основе дисперсионного анализа в качестве объясняющих факторов содержала группу и дату хирургического вмешательства. Все исследования на животных были рассмотрены и одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных Janssen Spring House и размещены в учреждении, аккредитованном AAALAC.

Результаты

- 10 **[0384]** **Действенность в модели инфекции в хирургической ране у минипигов.** Для тестирования действенности вакцины с адьювантом и без него определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в мышце на средней и большой глубине после трех иммунизаций и заражения штаммом *S. aureus*, принадлежащим к клональному комплексу CC398.
- 15 **[0385]** В средней мышце иммунизация комбинацией LukAB, Spa* + адьювант (среднее геометрическое \log_{10} КОЕ/г в мышце на средней глубине = 1,61) приводила к значительному снижению КОЕ по сравнению с группой, которую иммунизировали посредством LukAB и Spa* без адьюванта (среднее геометрическое \log_{10} КОЕ/г в мышце на средней глубине = 6,03, $P= 0,0018$) или по сравнению с группой, которая получала только адьювант (среднее геометрическое \log_{10} КОЕ/г в мышце на средней глубине = 6,08, $P= 0,0017$) (ФИГ. 11А). Никаких значимых различий в КОЕ не было обнаружено при сравнении контрольной группы, получавшей буфер (среднее геометрическое \log_{10} КОЕ/г в мышце на средней глубине = 5,77), с группой, получавшей только адьювант ($P= 0,8711$), или группой, получавшей LukAB RARPR-33 + Spa* ($P= 0,9392$). Однако значимое снижение КОЕ было обнаружено при сравнении контрольной группы, получавшей буфер, и животных, получавших LukAB RARPR-33, Spa* + адьювант ($P= 0,0006$). Эти результаты указывают на то, что адьювант сам по себе не обеспечивает защитного эффекта.
- 20
- 25
- 30 **[0386]** В мышце на большой глубине иммунизация комбинацией LukAB и Spa* без адьюванта приводила к снижению КОЕ (среднее геометрическое \log_{10} КОЕ/г в мышце на большой глубине = 4,18, $P= 0,1389$). Иммунизация комбинацией LukAB RARPR-33, Spa* + адьювант приводила к еще большему снижению КОЕ по сравнению с группой, которая была иммунизирована посредством LukAB и Spa* без адьюванта (среднее геометрическое \log_{10} КОЕ/г в мышце на большой глубине = 1,58)

и значимому снижению по сравнению с группой, которая получала только адьювант (среднее геометрическое \log_{10} КОЕ/г в мышце на большой глубине = 6,37, $P=0,0360$) (ФИГ. 11В). Никаких значимых различий в КОЕ не было обнаружено при сравнении контрольной группы, получавшей буфер (среднее геометрическое \log_{10} КОЕ/г в мышце на большой глубине = 6,14) с группой, получавшей только адьювант ($P=0,9931$), или группой, получавшей с LukAB RARPR-33 + Spa* ($P=0,3953$). Однако значимое снижение КОЕ было обнаружено при сравнении контрольной группы, получавшей буфер, и животных, получавших LukAB RARPR-33, Spa* + адьювант ($P=0,0137$).

10 **[0387]** Эти результаты показывают, что комбинация LukAB RARPR-33 и Spa* была действенной в снижении бактериальной нагрузки в модели инфекции в участке хирургического вмешательства у минипигов и что добавление адьюванта GLA-SE дополнительно усиливало снижение бактериальной нагрузки в участке хирургического вмешательства.

15 **[0388]** **Выводы.** Для тестирования действенности вакцинной композиции определяли способность вакцины снижать бактериальную нагрузку в модели инфекции в хирургической ране у минипигов с применением соответствующего штамма *S. aureus*. Иммунизация минипигов комбинацией LukAB RARPR-33 + Spa* в вакцинных композициях приводила к снижению количества колониеобразующих
20 единиц в мышце после заражения соответствующим клиническим штаммом *S. aureus*. Добавление адьюванта GLA-SE к вакцинной комбинации еще больше снижало бактериальную нагрузку. Таким образом, вакцина-кандидат против *S. aureus*, содержащая анатоксин LukAB и мутантный вариант Spa* вместе с адьювантом GLA-SE, эффективно защищала от глубоко расположенной инфекции *S. aureus* в модели
25 инфекции в участке хирургического вмешательства у минипигов.

Пример 11. Иммунные ответы, индуцированные иммуногенными композициями, в модели инфекции в хирургической ране у минипигов

[0389] Цель эксперимента заключалась в оценке того, обеспечивает ли комбинация варианта антигена Spa и димера LukAB RARPR-33 дополнительно в
30 комбинации с двумя различными адьювантами защиту в модели инфекции в хирургической ране, обусловленной *S. aureus*, у геттингенских минипигов. Вариант антигена Spa (SpA*), который был протестирован, характеризовался аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:60. Димер LukAB RARPR, который был протестирован, содержит полипептид LukA, предусматривающий аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO:3, и полипептид LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:18. В одной группе данного эксперимента тестировали адъювант AS01b, который является частью лицензированной вакцины Shingrix (Leroux et al. 2016) и который содержит агонист TLR4 MPL и QS-21. В другой группе эксперимента тестировали адъювант GLA-SE, содержащий агонист TLR4 GLA, составленный в виде стабильной эмульсии. Стабильная эмульсия представляла собой эмульсию типа масло в воде, в которой масло представляло собой сквален.

5 [0390] Модель на минипигах использовали для оценки как иммуногенности (в отношении образования антигенспецифических IgG), так и действенности вакцин-кандидатов. Минипиги широко используются в исследованиях инфекционных заболеваний, поскольку их иммунная система, структура органов и кожи во многом сходны с таковыми у людей. В данной модели после инфицирования раны бактериями *S. aureus* развивается локальная инфекция во всех слоях мышцы и кожи в участке хирургического вмешательства. Наблюдается также диссеминация инфекции на другие внутренние органы, и прогрессирование заболевания является в высокой степени сходным с таковым у людей.

15 [0391] Токсичность LukAB в отношении полиморфноядерных нейтрофилов минипигов (PMN) схожа с таковой, которая наблюдалась в случае PMN человека. Это контрастирует с сильно сниженной токсичностью LukAB, наблюдаемой в случае PMN мышей и кроликов вследствие видоспецифичности мишени токсина. Более того, вследствие часто наблюдаемого у свиней носительства видов стафилококков, минипиги, сходно со взрослыми людьми (но не лабораторными грызунами), зачастую имеют высокие уровни уже существующих антител к стафилококковым антигенам (в том числе LukAB и другим белкам *S. aureus*). Следовательно, данная модель, вероятно, будет более надежным индикатором потенциальной вакцинной защиты у людей, особенно в случае вакцин, содержащих вариант LukAB и Spa, чем ранее доступные модели на грызунах.

25 [0392] Эксперимент *in vivo*. Самцов геттингенских минипигов (по 3 свиньи на группу) иммунизировали внутримышечно три отдельных раза с 3-недельными интервалами в соответствии со схемой, показанной на ФИГ. 12, следующими композициями или комбинациями композиций:

1. контроль в виде буфера (без адъюванта, без LukAB RARPR, без варианта Spa);

2. LukAB RARPR-33 (100 мкг) + SpA* (100 мкг) + адъювант AS01b (25 мкг MPL + 25 мкг QS-21);

3. LukAB RARPR-33 (100 мкг) + SpA* (100 мкг) + адъювант GLA-SE (10 мкг GLA).

5 **[0393]** После вакцинации свиней заражали клинически релевантным штаммом *S. aureus*, клональным комплексом (CC) 398. На день +8 после инфицирования свиней подвергали эвтаназии и определяли у них бактериальную нагрузку в участке хирургического вмешательства и внутренних органах.

10 **[0394]** Образцы крови забирали до начала исследования и через регулярные промежутки времени в течение периода вакцинации, как показано на ФИГ. 12. Проводили анализ сыворотки крови для оценки количества и функции сывороточных иммуноглобулинов.

15 **[0395]** Первичной конечной точкой исследования было снижение бактериальной нагрузки (КОЕ) в участке хирургического вмешательства/органах у животных, вакцинированных посредством LukAB + SpA* и различных адъювантов. В качестве контроля использовали вакцинацию только буфером.

Материалы и способы

20 **[0396]** **Ответы в виде выработки антител к LukAB и SpA, измеренные с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).** Для измерения уровней антител IgG к LukAB из CC8 и LukAB из CC45 384-луночные планшеты Nunc (Thermo Fisher Scientific) покрывали с помощью 1,0 мкг/мл LukAB из CC8 или LukAB из CC45 в PBS и инкубировали в течение 1 ч при 2—8°C. После промывки посредством PBS + 0,05% Tween-20 планшеты блокировали посредством 2,5% обезжиренного молока, промывали и в лунки вносили 3-кратные серийные разведения сыворотки крови, приготовленные в буфере-разбавителе (2,5% (вес/об.) в виде сухого обезжиренного молока в 1xPBS), начиная с 1:10. Планшеты инкубировали в течение 25 1 часа при комнатной температуре, промывали и вносили вторичное антитело к антителам IgG свиньи с HRP (Sigma Aldrich), разведенное в соотношении 1:10000. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа планшеты проявляли 30 посредством субстрата TMB (Leinco Technologies). Реакцию останавливали путем внесения 1 М серной кислоты. Поглощение считывали при 450 нм. Титры EC₅₀, определяемые как половина максимальной эффективной концентрации, рассчитывали на основе кривых 12-стадийного титрования в двух повторностях, которые анализировали с помощью модели 4-параметрической логистической (PL)

нелинейной регрессии. Образцы с титром EC50 ниже 30 цензурировали до 30. Модель Тобита для потенциально цензурированных значений использовали для тестирования статистической значимости результатов сравнения групп получавших вакцину + адьювант, и группы, получавшей только буфер, после трех иммунизаций. Для поправки на множественные сравнения использовали поправку Бонферрони. Для измерения антител к SpA* 96-луночные планшеты maxisorp покрывали с помощью 0,25 мкг/мл SpA* в PBS и инкубировали в течение ночи при температуре 2—8°C. Вторичное антитело представляло собой антитело к IgG свиньи с HRP, разведенное в соотношении 1:10000 в блокирующем буфере. Остальные этапы были схожи с описанными выше в том, что касается измерения ответов в виде выработки антител к LukAB. Модель Тобита для потенциально цензурированных значений использовали для тестирования статистической значимости результатов сравнения групп получавших вакцину + адьювант, и группы, получавшей только буфер, после трех иммунизаций. Для поправки на множественные сравнения использовали поправку Бонферрони.

[0397] Анализ нейтрализации токсина LukAB. Для измерения высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH) из клеток с поврежденной мембраной использовали набор Cyto-Tox-One (Promega). Клетки THP-1 подвергали центрифугированию и ресуспендировали с помощью RPMI до плотности 2×10^6 клеток/мл. Клетки (50 мкл) вносили в 96-луночные планшеты для культивирования, содержащие серийные 3-кратные разведения сыворотки крови или 3-кратные серийные разведения эталонного моноклонального антитела к LukAB с начальной концентрацией 2500 нг/мл. В тестируемые лунки вносили токсин LukAB из CC8, CC45, CC22a или CC398 до конечной концентрации 40 нг/мл (CC8, CC22a, CC398) или 20 нг/мл (CC45). В контрольные лунки лизиса вносили лизирующий раствор (Promega). Планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37°C в присутствии 5% CO₂. Планшеты подвергали центрифугированию, 25 мкл надосадочной жидкости переносили в новый планшет и вносили 25 мкл реагента CytoTox-ONE (Promega). Планшеты инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре и в лунки вносили раствор для остановки реакции (Promega). Планшеты считывали с помощью ридера Biotek Synergy Neo 2 в монохромном режиме с длиной волны возбуждения 560 нм и шириной полосы 5 нм и длиной волны испускания 590 нм и шириной полосы 10 нм. Усиление установлено на уровне 120—130. Для всех образцов сыворотки крови и эталонного моноклонального антитела к LukAB

определяли титры IC_{50} , представляющие собой концентрацию, при которой наблюдали 50% цитотоксичность. В качестве исходного значения использовали титры относительной эффективности, представляющие собой разницу в титрах IC_{50} между образцами сыворотки крови и эталонным моноклональным антителом. Титры относительной эффективности у групп, получавших вакцины, сравнивали с титрами группы, получавшей буфер, после трех иммунизаций. Для проверки статистической значимости результатов при сравнении групп, получавших вакцину, и группы, получавшей буфер, проводили однофакторный дисперсионный анализ с использованием критерия множественного сравнения Даннетта.

10 **[0398] Способы инфицирования в хирургической ране у минипигов.**

Самцов геттингенских минипигов в возрасте от пяти до восьми месяцев (Marshall Biosciences, Норт-Роуз, Нью-Йорк) размещали группами и содержали при 12-часовом цикле свет/темнота со свободным доступом к воде. Утром в день хирургической операции минипигам натошак давали седативное средство, интубировали и помещали под изофлурановую анестезию на время хирургической операции. Хирургическую операцию проводили на левом бедре, при этом обнажали мышечный слой и вводили безлезвийный троакар диаметром 5 мм (Endopath® Xcel, Ethicon Endo-Surgery, Гуайнабо, Пуэрто-Рико) на глубину бедренной кости. Средство для заражения бактериями, состоящее из 20 мкл инокулята (примерно $6 \log_{10}$ КОЕ/мл *S. aureus*), вводили в рану (верхнюю часть бедренной кости) с помощью 6-дюймовой иглы для спинномозговой пункции MILA (Mila International, Inc., Флоренция, Кентукки) через троакар, который затем удаляли. После введения средства для заражения бактериями мышцу зашивали одним шелковым швом и зашивали кожу рассасывающейся нитью из PDS. Спустя восемь дней минипигов, находящихся под воздействием седативным средством, подвергали эвтаназии барбитуратом. После подтверждения смерти органы по-отдельности подвергали обработке для микробиологического анализа. Образцы гомогенизировали в солевом растворе с помощью Bead Ruptor Elite (Omni International, Кеннесо, Джорджия, США), затем разводили и высевали на чашки с TSA с помощью аппарата для спирального посева бактерий на чашки Autoplate 5000 (Spiral Biotech, Норвуд, Массачусетс, США). Чашки инкубировали в течение 18—24 ч при 37°C, затем считывали на счетчике колоний QCount (Spiral Biotech, Норвуд, Массачусетс, США).

30 **[0399]** Для проверки статистической значимости результатов определения КОЕ при сравнении группы, получавшей буфер, и групп, которые были иммунизированы с

помощью LukAB RARPR-33 + SpA* + различные адъюванты, проводили однофакторный дисперсионный анализ с использованием критерия множественного сравнения Даннетта. Модель на основе дисперсионного анализа в качестве объясняющих факторов содержит группу и даты хирургических вмешательств. Все исследования на животных были рассмотрены и одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных Janssen Spring House и размещены в учреждении, аккредитованном AAALAC.

Результаты

[0400] Ответы в виде выработки антител, индуцированные в отношении

10 **LukAB и SpA***. Упомянутые выше группы минипигов трижды подвергали иммунизации с интервалом в три недели комбинацией LukAB RARPR-33 (100 мкг) и SpA* (100 мкг) + адъювант AS01b (25 мкг MPL и 25 мкг QS-21) или GLA-SE (10 мкг GLA, стабильная эмульсия). Была включена контрольная группа животных, получавших только буфер. Через три недели после третьей иммунизации животных

15 заражали посредством *S. aureus*. Образцы крови забирали перед каждой иммунизацией и перед заражением (ФИГ. 12) и методом ELISA анализировали на наличие ответов в виде выработки антител к LukAB и SpA*. У животных, иммунизированных только буфером, в результате измерения наблюдали низкие уровни антител IgG к LukAB из CC8 и CC45, что указывает на наличие ранее существовавших антител к LukAB

20 (ФИГ. 13А и 13В). На протяжении всего эксперимента уровни антител в сыворотке крови не увеличивались со временем. Иммунизация посредством LukAB RARPR-33, SpA* с адъювантом AS01b или GLA-SE приводила к получению более высокого среднего геометрического (сред. геом.) титров IgG к LukAB из CC8 и LukAB из CC45 по сравнению с контрольной группой после трех иммунизаций (ФИГ. 13А и 13В –

25 сред. геом. титры IgG к LukAB из CC8 после трех иммунизаций: LukAB RARPR-33 + SpA* + AS01b: 64637; $P=0,0034$; LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE: 116357, $P=0,0003$; контрольная группа, получавшая буфер: 2931; сред. геом. титров IgG к LukAB из CC45 после трех иммунизаций: LukAB RARPR-33 + SpA* + AS01b: 19764, $P<0,0001$; LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE: 11620, $P<0,0001$; контрольная группа,

30 получавшая буфер: 129).

[0401] Минипиги, иммунизированные только буфером, не имели поддающихся измерению количеств антител к SpA* во все моменты времени (ФИГ. 13С).

Иммунизация посредством LukAB RARPR-33, SpA* с адъювантом AS01b или GLA-SE приводила к более высоким средним геометрическим (сред. геом.) титрам IgG к SpA*

по сравнению с контрольной группой после трех иммунизаций (ФИГ. 13С – сред. геом. IgG к SpA* после трех иммунизаций: LukAB RARPR-33 + SpA* + AS01b: 7013, $P < 0,0001$; LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE: 1770, $P < 0,0001$; контрольная группа, получавшая буфер: 30). Данные результаты свидетельствуют об индуцировании

5 выработки специфичных к SpA* антител под действием вакцин LukAB + SpA* + адьювант.

[0402] Нейтрализация цитотоксической активности токсина LukAB.

LukAB представляет собой токсин, который связывается с рецепторами на

10 нейтрофилах, где он образует поры в мембране и это приводит к лизису клетки. Для оценки функциональности антител, выработка которых была индуцирована тестируемыми вакцинами, измеряли способность образцов сыворотки крови от вакцинированных минипигов ингибировать индуцированный токсином LukAB лизис

клеток THP-1. Токсин LukAB дикого типа в анализе был получен из клонального комплекса CC8 или CC45. LukA в LukAB RARPR-33 получен из клонального

15 комплекса CC8, LukB в LukAB RARPR-33 получен из клонального комплекса CC45. В анализе также использовали эталонное моноклональное антитело, специфичное к LukAB. Определяли отличие в титрах IC50, представляющих собой разведение, при котором в результате измерения получают 50% цитотоксичности, между образцами сыворотки крови и эталонным антителом и наносили на график в виде титров

20 относительной эффективности (титров RP). Нейтрализующие антитела к LukAB из CC8 и LukAB из CC45 выявляли в образцах сыворотки крови от минипигов в начале эксперимента (сред. геом. титра RP LukAB из CC8 контрольной группы, получавшей буфер, до иммунизации: 1126; LukAB RARPR-33 + SpA* + AS01b: 1483; LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE: 896; сред. геом. титра LukAB RP из CC45 контрольной

25 группы, получавшей буфер, до иммунизации: 616; LukAB RARPR-33 + SpA* + AS01b: 954; LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE: 637). У животных, вакцинированных только буфером, в течение эксперимента не изменялись титры RP (после трех иммунизаций сред. геом. титра RP LukAB из CC8: 1497; LukAB из CC45: 884). У животных, вакцинированных посредством LukAB + SpA* + адьювант, после трех иммунизаций в

30 образцах сыворотки крови по результатам измерения были получены значимо более высокие сред. геом. титров RP (сред. геом. титра RP LukAB из CC8: LukAB RARPR-33 + SpA* + AS01b: 17095, $P=0,0007$; LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE: 10285, $P=0,0116$; сред. геом. титра RP LukAB из CC45: LukAB RARPR-33 + SpA* + AS01b: 20019, $P=0,0022$; LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE: 16612, $P=0,0047$). Эти

результаты, показанные на ФИГ. 14А и 14В, указывают на то, что LukAB в вакцине (RARPR-33) индуцирует выработку функциональных антител, которые блокируют цитотоксическую активность токсина LukAB.

[0403] Перекрестная нейтрализация цитотоксической активности токсина

5 **LukAB.** Затем оценивали, способны ли антитела, выработка которых была индуцирована у минипигов иммунизацией посредством LukAB RARPR-33 + SpA* и различных адьювантов, перекрестно нейтрализовать цитотоксичность вариантов последовательности LukAB, которые не присутствовали в остоле RARPR-33. Для этой цели использовали варианты последовательностей LukAB из CC22a и CC398.

10 Перекрестную нейтрализацию измеряли путем оценки способности сыворотки крови ингибировать индуцированный токсином LukAB лизис клеток ТНР-1. В анализе также использовали эталонное моноклональное антитело, специфичное к LukAB, и титры относительной эффективности определяли так, как описано выше. Перекрестно-нейтрализующие антитела к LukAB из CC22a и LukAB из CC398 выявлялись в

15 образцах сыворотки крови минипигов в начале эксперимента (сред. геом. титра RP из CC22a контрольной группы, получавшей буфер, до иммунизации: 541; LukAB RARPR-33 + SpA* + AS01b: 846; LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE: 436; сред. геом. титра RP LukAB из CC398 контрольной группы, получавшей буфер, до иммунизации: 1061; LukAB RARPR-33 + SpA* + AS01b: 1090; LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE: 608). У

20 животных, вакцинированных только буфером, в течение эксперимента не изменялись титры RP (после трех иммунизаций сред. геом. титра RP LukAB из CC22a: 761; LukAB из CC398: 1270). У животных, вакцинированных посредством LukAB + SpA* + адьювант (AS01b или GLA-SE), после трех иммунизаций в образцах сыворотки крови по результатам измерения были получены значимо более высокие сред. геом. титров

25 RP (сред. геом. титра RP LukAB из CC22a: LukAB RARPR-33 + SpA* + AS01b: 7524, $P=0,0040$; LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE: 5025, $P=0,0312$; сред. геом. титра RP LukAB из CC398: LukAB RARPR-33 + SpA* + AS01b: 14396, $P=0,0005$; LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE: 8051, $P=0,0146$). Эти результаты, показанные на

30 выработку перекрестно-нейтрализующих антител, которые блокируют цитотоксическую активность различных вариантов последовательностей токсина LukAB.

[0404] Действенность в модели инфекции в хирургической ране у

минипигов. Для тестирования действенности вакцины количество

колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли в двух участках мышцы (на средней и большой глубине) и селезенке после трех иммунизаций и заражения посредством *S. aureus* из клонального комплекса CC398. Иммунизация посредством LukAB RARPR-33 + SpA* + адъювант AS01b (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г в мышце (на средней глубине) = 0,98, P=0,0057) или LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г в мышце (на средней глубине) = 0,83, P=0,0046) приводила к значительному снижению значения КОЕ в мышце на средней глубине по сравнению с группой, получавшей только адъювант (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г в мышце (на средней глубине) = 5,99) (ФИГ. 15А). Иммунизация посредством LukAB RARPR-33 + SpA* + адъювант AS01b (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г мышцы (на большой глубине) = 0,58, P=0,0024) или LukAB RARPR-33 + SpA* + GLA-SE (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г мышцы (на большой глубине) = 0,76, P=0,0031) также приводила к значительному снижению КОЕ в мышце на большой глубине по сравнению с группой, получавшей только адъювант (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г мышцы (на большой глубине) = 6,10) (ФИГ. 15В). В селезенке более высокие уровни КОЕ наблюдались в контрольной группе, иммунизированной только адъювантом (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г селезенки = 2,20) по сравнению с иммунизацией посредством LukAB + SpA* + AS01b или LukAB + SpA* + GLA-SE (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г селезенки = 0,51, P=0,0138 и 0,45, P=0,0120 соответственно) (ФИГ. 15С). Эти результаты, показанные на ФИГ. 15А—15С, указывают на то, что тестируемая вакцинная комбинация является действенной в модели инфекции в участке хирургического вмешательства у минипигов. Вакцины также уменьшают распространение бактерий на такие органы, как селезенка.

[0405] Выводы. Было показано, что вакцинная композиция, содержащая антигены LukAB RARPR-33 и SpA* с адъювантом, обладает иммуногенностью у минипигов, поскольку индуцировалась выработка антител IgG к LukAB из CC8, LukAB из CC45 и SpA*. Увеличение уровня антител IgG к LukAB было связано с усилением перекрестной нейтрализации цитотоксической активности токсина LukAB, что указывает на то, что индуцированные к выработке антитела IgG являются функциональными. Для тестирования действенности вакцинной композиции определяли способность вакцины снижать бактериальную нагрузку в модели инфекции в хирургической ране у минипигов с применением соответствующего штамма *S. aureus*. Иммунизация минипигов вакцинной композицией LukAB RARPR-33 + SpA* + адъювант приводила к значимому снижению количества колониеобразующих единиц в мышце после заражения тестируемым штаммом.

Вакцинная композиция также приводила к значимому снижению количества КОЕ в селезенке. Таким образом, протестированная вакцина-кандидат против *S. aureus*, содержащая мутанты анатоксина LukAB и Spa, эффективно защищала от глубоко расположенной инфекции *S. aureus* и ее распространения в модели инфекции в участке хирургического вмешательства у минипигов.

Пример 12. Действенность LukAB RARPR-33 и Spa* в модели инфекции в хирургической ране у минипигов против штамма USA300 *S. aureus*

[0406] В примере 10 было показано, что комбинация LukAB RARPR-33 и Spa* без адьюванта обеспечивала некоторую защиту от заражения штаммом CC398 *S. aureus* в модели инфекции в участке хирургического вмешательства у минипигов.

Целью данного эксперимента была оценка, может ли Spa* в сочетании с LukAB RARPR-33 обеспечить защиту в модели инфекции в хирургической ране, обусловленной *S. aureus*, у геттингенских минипигов от другого штамма, которым осуществляют заражение, в отсутствие адьюванта. Использовали клинически релевантный штамм USA300 *S. aureus*.

[0407] Вариант антигена Spa (Spa*), который был протестирован, характеризовался аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:60. Мутантный димер LukAB RARPR-33, который был протестирован, содержит вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, и вариант полипептида LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

[0408] Эксперимент *in vivo*. Самцов геттингенских минипигов (по 3 свиньи на группу) иммунизировали внутримышечно 3 отдельных раза с 3-недельными интервалами в соответствии со схемой, показанной на ФИГ. 16А, следующими композициями или комбинациями композиций (FIG. 16B):

1. контроль в виде буфера;
2. LukAB RARPR-33 (100 мкг) + Spa* (100 мкг).

После вакцинации свиней заражали клинически релевантным штаммом *S. aureus* USA300. На день +8 после инфицирования свиней подвергали эвтаназии и определяли у них бактериальную нагрузку в участке хирургического вмешательства. Первичной конечной точкой исследования было снижение бактериальной нагрузки (КОЕ) в участке хирургического вмешательства у животных, вакцинированных вариантами LukAB и Spa*. В качестве контроля использовали вакцинацию буфером для составления.

Материалы и способы

[0409] Способы инфицирования в хирургической ране у минипигов.

Геттингенских минипигов заражали штаммом USA300 *S. aureus* в модели инфекции в хирургической ране у минипигов. Заражение и определение бактериальной нагрузки в 5 участке хирургического вмешательства проводили согласно описанию, представленному в примерах 10 и 11.

Результаты

[0410] Действенность в модели инфекции в хирургической ране у минипигов.

Для тестирования действенности комбинации вакцинных антигенов 10 определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в мышце на средней и большой глубине после трех иммунизаций и заражения штаммом USA300 *S. aureus*.

[0411] В мышце на средней глубине иммунизация комбинацией LukAB RARPR-33 и Spa* (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г в мышце на средней глубине = 2,15)

приводила к снижению КОЕ по сравнению с группой, которая получала только буфер 15 (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г в мышце на средней глубине = 5,73, $P=0,2790$) (ФИГ. 16С).

[0412] В мышце на большой глубине иммунизация комбинацией LukAB RARPR-33, Spa* (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г в мышце на большой глубине = 3,65)

приводила к значимому снижению КОЕ по сравнению с контрольной группой, 20 получавшей буфер (сред. геом. log₁₀ КОЕ/г в мышце на большой глубине = 6,21, $P=0,0245$) (ФИГ. 16D). Эти результаты показывают, что в отсутствие адьюванта тестируемая вакцинная комбинация является действенной в отношении штамма USA300 в модели инфекции в участке хирургического вмешательства у минипигов.

[0413] **Выводы.** Для тестирования действенности комбинации вакцинных антигенов определяли способность вакцинной комбинации снижать бактериальную

25 нагрузку в модели инфекции в хирургической ране у минипигов с применением штамма USA300 *S. aureus*. В данном исследовании не использовали адьювант.

Иммунизация минипигов посредством LukAB RARPR-33 + Spa* приводила к снижению количества колониеобразующих единиц в мышце после заражения

тестируемым штаммом по сравнению с контрольной группой, получавшей буфер. Эти 30 результаты показывают, что в отсутствие адьюванта комбинация LukAB RARPR-33 и Spa* обеспечивает некоторый уровень защиты от штамма USA300 *S. aureus* в модели инфекции области хирургического вмешательства у минипигов.

Пример 13. Действенность LukAB RARPR-33, Spa* и GLA-SE в модели инфекции в хирургической ране у минипигов против штамма USA100 *S. aureus*

[0414] Цель эксперимента заключалась в оценке, может ли комбинация
 5 варианта антигена Spa и димера LukAB RARPR вместе с глюкопиранозиллипидным адьювантом (GLA), агонистом toll-подобного рецептора 4 (TLR), обеспечить защиту в модели инфекции в хирургической ране у геттингенских минипигов от заражения устойчивым к метициллину штаммом USA100 *S. aureus* (MRSA). Изоляты USA100 ответственны за большую часть случаев инфекций, обусловленных MRSA,
 10 ассоциированных со здравоохранением. Вариант антигена Spa (Spa*), который был протестирован, характеризовался аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:60. Мутантный димер LukAB RARPR-33, который был протестирован, содержит вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, и вариант полипептида LukB,
 15 предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18. Адьювант GLA был составлен в виде стабильной эмульсии (SE) и содержал 10 мкг GLA и 2% SE.

[0415] Эксперимент *in vivo*. Самцов геттингенских минипигов (по 3 свиньи на группу) иммунизировали внутримышечно 3 отдельных раза с 3-недельными
 20 интервалами в соответствии со схемой, показанной на ФИГ. 17А, следующими композициями или комбинациями композиций (FIG. 17B):

1. Адьювант GLA-SE (10 мкг, 2% SE) (без LukAb RARPR-33, без Spa*);
2. LukAB RARPR-33 (100 мкг) + Spa* (100 мкг) + адьювант GLA-SE (10 мкг, 2% SE)/

25 После вакцинации свиней заражали клинически релевантным штаммом *S. aureus* USA100 (ST5). На день +8 после инфицирования свиней подвергали эвтаназии и определяли у них бактериальную нагрузку в участке хирургического вмешательства. Первичной конечной точкой исследования было снижение бактериальной нагрузки (КОЕ) в участке хирургического вмешательства у животных, вакцинированных
 30 комбинацией варианта LukAB + Spa вместе с GLA-SE, по сравнению с животными, вакцинированными только GLA-SE.

Материалы и способы

[0416] Способы инфицирования в хирургической ране у минипигов. Геттингенских минипигов заражали штаммом USA100 *S. aureus* в модели инфекции в

хирургической ране у минипигов. Заражение и определение бактериальной нагрузки в участке хирургического вмешательства проводили согласно описанию, представленному в примере 10 и 11. Для проверки статистической значимости результатов при сравнении двух групп использовали модель на основе дисперсионного анализа.

Результаты

[0417] Действенность в модели инфекции в хирургической ране у минипигов. Для тестирования действенности вакцинной комбинации определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в мышце на средней и большой глубине после трех иммунизаций и заражения посредством USA100 *S. aureus*.

[0418] В мышце на средней глубине иммунизация комбинацией LukAB RARPR-33, Spa* + GLA-SE (сред. геом. \log_{10} КОЕ/г в мышце на средней глубине = 0,88) приводила к значимому снижению КОЕ по сравнению с группой, которую иммунизировали посредством только GLA-SE (сред. геом. \log_{10} КОЕ/г в мышце на средней глубине = 5,27, $P=0,0013$) (ФИГ. 17C). Также в мышце на большой глубине иммунизация комбинацией LukAB RARPR-33, Spa* + GLA-SE (сред. геом. \log_{10} КОЕ/г в мышце на большой глубине = 0,30) приводила к значимому снижению КОЕ по сравнению с группой, которую иммунизировали посредством только GLA-SE (сред. геом. \log_{10} КОЕ/г в мышце на большой глубине = 5,37, $P < 0,0001$) (ФИГ. 17D). Данные результаты свидетельствуют о том, что комбинация LukAB RARPR-33, Spa* и GLA-SE обеспечивает защиту от штамма USA100 *S. aureus* в модели инфекции области хирургического вмешательства, и демонстрируют, что тестируемая вакцина является действенной у минипигов.

[0419] Выводы. Для тестирования действенности комбинации LukAB RARPR-33, Spa* и GLA-SE определяли способность вакцины снижать бактериальную нагрузку в модели инфекции в хирургической ране у минипигов с применением соответствующего штамма USA100 *S. aureus*. Иммунизация минипигов вакцинной композицией LukAB RARPR-33 + Spa* + адъювант GLA-SE приводила к снижению количества колониеобразующих единиц в мышце после заражения тестируемым штаммом. В комбинации с результатами из предыдущих примеров видно, что вакцинная комбинация против *S. aureus*, содержащая анатоксин LukAB и мутант Spa, может эффективно защищать от глубоко расположенной инфекции, обусловленной различными клинически релевантными штаммами *S. aureus*, в модели инфекции в участке хирургического вмешательства у минипигов.

Пример 14. Иммуногенность LukAB RARPR-33 и SpA* в комбинации с различными адъювантами

[0420] Целью эксперимента было оценить, будут ли различные адъюванты улучшать иммуногенность комбинации варианта антигена SpA и димера LukAB RARPR. Вариант антигена SpA (SpA*), который был протестирован, характеризовался аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:60. Мутантный димер LukAB RARPR-33, который был протестирован, содержит вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, и вариант полипептида LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18. Были протестированы два адъюванта, содержащие агонист TLR4: AS01b (содержащий 5 мкг MPL и 5 мкг QS-21) и GLA, составленный в виде стабильной эмульсии (GLA-SE, содержащей 1 мкг GLA, 2% SE). Кроме того, были включены два адъюванта на основе квасцов: адъювант на основе гидрата алюминия 2% (гель гидроксида алюминия) и адъювант Adju-phos (гель фосфата алюминия).

[0421] Эксперимент *in vivo*. Самок мышей линии Swiss Webster (5—10 мышей на группу) иммунизировали подкожно 3 отдельных раза с 2-недельными интервалами в соответствии со схемой, показанной на ФИГ. 18А, следующими композициями или комбинациями композиций (ФИГ. 18В):

1. LukAB RARPR-33 (5 мкг) + SpA* (5 мкг) + AS01b (5 мкг MPL + 5 мкг QS-21);
2. LukAB RARPR-33 (5 мкг) + SpA* (5 мкг) + GLA-SE (1 мкг GLA, 2% SE);
3. LukAB RARPR-33 (5 мкг) + SpA* (5 мкг) + адъювант на основе гидрата алюминия (50 мкл);
4. LukAB RARPR-33 (5 мкг) + SpA* (5 мкг) + адъювант Adju-phos (50 мкл);
5. LukAB RARPR-33 (5 мкг) + SpA* (5 мкг);
6. буфер + AS01b (5 мкг MPL и 5 мкг QS-21);
7. буфер + GLA-SE (1 мкг GLA, 2% SE);
8. буфер + адъювант на основе гидрата алюминия (50 мкл);
9. буфер + адъювант Adju-phos (50 мкл);
10. буфер.

Образцы крови забирали до начала исследования и через 2 недели после третьей иммунизации, как показано на ФИГ. 18А. Проводили анализы сыворотки крови для оценки количества и функции сывороточных иммуноглобулинов. В качестве контроля

использовали вакцинацию адъювантом или буфером для составления без вакцинных антигенов.

Материалы и способы

[0422] Ответы в виде выработки антител к LukAB и SpA, измеренные с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Для измерения 5 уровней антител IgG к LukAB из CC8 и LukAB из CC45 384-луночные планшеты Nunc (Thermo Fisher Scientific) покрывали с помощью 1,0 мкг/мл LukAB из CC8 или LukAB из CC45 в PBS и инкубировали в течение 1 ч при 2—8°C. После промывки 10 посредством PBS + 0,05% Tween-20 планшеты блокировали посредством 2,5% обезжиренного молока, промывали и в лунки вносили 3-кратные серийные разведения сыворотки крови, приготовленные в буфере-разбавителе (2,5% (вес/об.) в виде сухого обезжиренного молока в 1xPBS), начиная с разведения 1:90. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, промывали и вносили вторичное 15 антитело к антителам IgG свиньи с HRP (Sigma Aldrich), разведенное 1:2 000. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа планшеты проявляли посредством субстрата TMB (Leinco Technologies). Реакцию останавливали путем 20 внесения 1 М серной кислоты. Поглощение считывали при 450 нм. Титры EC₅₀, определяемые как половина максимальной эффективной концентрации, рассчитывали на основе кривых 12-стадийного титрования в двух повторностях, которые анализировали с помощью модели 4-параметрической логистической (PL) 20 нелинейной регрессии. Образцы с титром EC₅₀ ниже 30 цензурировали до 30.

[0423] Для измерения антител к SpA* 384-луночные планшеты maxisorp покрывали с помощью 0,25 мкг/мл SpA* в PBS и инкубировали в течение ночи при 25 температуре 2—8°C. Вторичное антитело представляло собой антитело к IgG мыши с HRP, разведенное в соотношении 1:2000 в блокирующем буфере. Остальные этапы были схожи с описанными выше в том, что касается измерения ответов в виде 25 выработки антител к LukAB.

[0424] Анализ нейтрализации токсина LukAB. Для измерения высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH) из клеток с поврежденной мембраной 30 использовали набор Cyto-Tox-One (Promega). Клетки THP-1 подвергали центрифугированию и ресуспендировали с помощью RPMI до плотности 2×10^6 клеток/мл. Клетки (50 мкл) вносили в 96-луночные планшеты для культивирования, содержащие серийные 3-кратные разведения сыворотки крови или 3-кратные серийные разведения эталонного моноклонального антитела к LukAB с

начальной концентрацией 2500 нг/мл. В тестируемые лунки вносили токсин LukAB из CC8 и CC45 до конечной концентрации 40 нг/мл или 20 нг/мл соответственно. В контрольные лунки лизиса вносили лизирующий раствор (Promega). Планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37°C в присутствии 5% CO₂. Планшеты подвергали центрифугированию, 25 мкл надосадочной жидкости переносили в новый планшет и вносили 25 мкл реагента CytoTox-ONE (Promega). Планшеты инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре и в лунки вносили раствор для остановки реакции (Promega). Планшеты считывали с помощью ридера Biotek Synergy Neo 2 в монохромном режиме с длиной волны возбуждения 560 нм и шириной полосы 5 нм и длиной волны испускания 590 нм и шириной полосы 10 нм. Усиление установлено на уровне 120—130. Для всех образцов сыворотки крови и эталонного моноклонального антитела к LukAB определяли титры IC₅₀, представляющие собой концентрацию, при которой наблюдали 50% цитотоксичность. В качестве исходного значения использовали титры относительной эффективности, представляющие собой разницу в титрах IC₅₀ между образцами сыворотки крови и эталонным моноклональным антителом.

Результаты

[0425] Ответы в виде выработки антител, индуцированные в отношении LukAB и SpA*. Упомянутые выше группы мышей трижды подвергали иммунизации с интервалом в две недели комбинацией LukAB RARPR-33 (5 мкг) и SpA* (5 мкг) с адьювантом или без него. В качестве контроля животных иммунизировали адьювантом и буфером для составления или только буфером для составления, в обоих случаях без антигенов. См. ФИГ. 18В.

[0426] Образцы крови забирали согласно ФИГ. 18А и методом ELISA анализировали образцы сыворотки крови на наличие ответов в виде выработки антител к вариантам последовательностей LukAB из CC8 и CC45 и SpA*. До иммунизации во всех группах никакие ранее существовавшие антитела, специфичные к LukAB или SpA*, не выявлялись (ФИГ. 18С-Е). У животных, иммунизированных только адьювантом и/или буфером для составления, уровни антител в образцах сыворотки крови не увеличивались со временем на протяжении всего эксперимента (ФИГ. 18С-Е), что указывает на то, что адьюванты сами по себе не индуцируют ответ в виде выработки специфических антител и что необходим антиген.

[0427] Для оценки, может ли адьювант усиливать иммуногенность LukAB RARPR-33 и SpA*, титры антител IgG к данным антигенам сравнивали между

животными, которые были иммунизированы посредством LukAB RARPR-33 + SpA* с адьювантом или без него.

[0428] Иммунизация посредством LukAB RARPR-33, SpA* в комбинации с AS01b приводила к получению более высоких средних геометрических титров IgG в случае LukAB из CC8 и CC45 и в случае SpA* (сред. геом. IgG к LukAB из CC8: 8079; сред. геом. IgG к LukAB из CC45: 5012; сред. геом. IgG к SpA*: 31496) по сравнению с животными, которые были иммунизированы посредством LukAB RARPR-33, SpA* без адьюванта (сред. геом. IgG к LukAB из CC8: 315; сред. геом. IgG к LukAB из CC45: 141; сред. геом. IgG к SpA*: 282).

[0429] Иммунизация посредством LukAB RARPR-33, SpA* в комбинации с GLA-SE также приводила к получению более высоких средних геометрических титров IgG в случае LukAB из CC8 и CC45 и в случае SpA* (сред. геом. IgG к LukAB из CC8: 1401; сред. геом. IgG к LukAB из CC45: 3757; сред. геом. IgG к SpA*: 9012) по сравнению с животными, которые были иммунизированы посредством LukAB RARPR-33, SpA* без адьюванта (сред. геом. IgG к LukAB из CC8: 315; сред. геом. IgG к LukAB из CC45: 141; сред. геом. IgG к SpA*: 282). Эти результаты указывают на то, что адьюванты, содержащие агонисты TLR4, улучшают иммуногенность LukAB RARPR-33 и SpA*.

[0430] Иммунизация посредством LukAB RARPR-33, SpA* в комбинации с гидратом алюминия приводила к получению более высокого среднего геометрического титра IgG в случае LukAB из CC8 и CC45 (сред. геом. IgG к LukAB из CC8: 595; сред. геом. IgG к LukAB из CC45: 263) по сравнению с животными, которые были иммунизированы посредством LukAB RARPR-33, SpA* без адьюванта (сред. геом. IgG к LukAB из CC8: 315; сред. геом. IgG к LukAB из CC45: 141). В случае ответов в виде выработки специфичных к SpA* антител наиболее высокое среднее геометрическое титра IgG наблюдали в группе животных, иммунизированных посредством LukAB RARPR-33, SpA* в комбинации с гидратом алюминия (сред. геом. IgG к SpA*: 93318).

[0431] Иммунизация посредством LukAB RARPR-33, SpA* в комбинации с Adju-phos приводила к получению более высоких средних геометрических титров в случае LukAB из CC8 и CC45 (сред. геом. IgG к LukAB из CC8: 645; сред. геом. IgG к LukAB из CC45: 593) по сравнению с животными, которые были иммунизированы посредством LukAB RARPR-33, SpA* без адьюванта (сред. геом. IgG к LukAB из CC8: 315; сред. геом. IgG к LukAB из CC45: 141). В случае SpA* среднее геометрическое

титра IgG было выше в группе животных, иммунизированных посредством LukAB RARPR-33, SpA* в комбинации с Adju-phos (сред. геом. IgG к SpA*: 11614), по сравнению с группой, которая была иммунизирована посредством LukAB RARPR-33, SpA* без адьюванта (сред. геом. IgG к SpA*: 282).

5 **[0432]** Эти результаты указывают на то, что адьюванты на основе квасцов оказывают больший эффект в отношении развития ответов в виде выработки специфичных к SpA антител, чем на развитие ответа в виде выработки специфичных к LukAB антител. В совокупности все протестированные в данном случае адьюванты, содержащие либо агонисты TLR4, либо адьюванты на основе квасцов, улучшали
10 иммуногенность комбинированной вакцины LukAB RARPR-33 и SpA*.

[0433] Нейтрализация цитотоксической активности токсина LukAB.

Способность образцов сыворотки крови иммунизированных мышей защищать клетки TNP-1 от гибели клеток, вызванной цитотоксической дозой LukAB из CC8 и CC45, оценивали по нейтрализации токсина. Были включены только образцы сыворотки
15 крови от животных, иммунизированных посредством LukAB RARPR-33 + SpA* с адьювантом или без него, выделенные на день 42 (5 мышей на группу), поскольку в данных группах методом ELISA были выявлены антитела, специфичные к LukAB из CC8 и CC45 (ФИГ. 18C-D).

[0434] В анализ также было включено эталонное моноклональное антитело, специфичное к LukAB. Определяли отличия в титрах IC50, представляющих собой разведение, при котором в результате измерения получают 50% цитотоксичности, между образцами сыворотки крови и эталонным антителом и наносили на график в виде титров относительной эффективности (титров RP).
20

[0435] В случае LukAB из CC8 в группах, иммунизированных посредством LukAB RARPR-33 + SpA* с адьювантом (AS01b: 1281; GLA-SE: 1502; гидрат алюминия: 476; Adju-Phos: 425), более высокие сред. геом. титров RP были измерены в образцах сыворотки крови после трех иммунизаций по сравнению с группой, иммунизированной посредством LukAB RARPR-33 + SpA* без адьюванта (сред. геом. титра RP: 122) (ФИГ. 19A).
25

[0436] В случае LukAB из CC45 в группах, иммунизированных посредством LukAB RARPR-33 + SpA* с адьювантом (AS01b: 3392; GLA-SE: 3470; гидрат алюминия: 365; Adju-Phos: 298), более высокие сред. геом. титров RP были измерены в образцах сыворотки крови после трех иммунизаций по сравнению с группой,
30

иммунизированной посредством LukAB RARPR-33 + SpA* без адъюванта (сред. геом. титра RP: 131) (ФИГ. 19В).

[0437] Эти результаты, показанные на ФИГ. 19А-В, указывают на то, что LukAB в вакцине (RARPR-33) индуцирует выработку функциональных антител, которые блокируют цитотоксическую активность токсина LukAB, и что добавление адъюванта улучшает функциональность антител в отношении нейтрализации токсичности LukAB.

[0438] **Выводы.** Тест на то, могут ли различные типы адъювантов улучшить иммуногенность тестируемой вакцинной комбинации, состоящей из LukAB RARPR-33 и SpA*, титры и функциональность антител, проводили на образцах сыворотки крови мышей, иммунизированных вакцинной комбинацией вместе с адъювантами на основе квасцов (гидроксид алюминия или фосфат алюминия) или адъювантами, содержащими агонист TLR4 (AS01b или GLA-SE). Добавление обоих типов адъювантов к комбинированной вакцине улучшало титры вакциносpezifичных антител по сравнению с иммунизацией без адъюванта. Кроме того, в присутствии адъюванта специфичные к LukAB антитела обладали лучшей способностью нейтрализовать токсин LukAB. Эти результаты показывают, что иммуногенность комбинированной вакцины можно повысить с помощью различных адъювантов.

ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ

[0439] Представленные далее литературные источники, в той части, в которой в них приведены иллюстративные процедурные или другие подробности, дополняющие изложенные в данном документе, конкретно включены в данный документ посредством ссылки.

1. Nielsen, O.L., et al., *A pig model of acute Staphylococcus aureus induced pyemia*. Acta Vet Scand, 2009. **51**: p. 14.
2. Johansen, L.K., et al., *A porcine model of acute, haematogenous, localized osteomyelitis due to Staphylococcus aureus: a pathomorphological study*. APMIS, 2011. **119**(2): p. 111-8.
3. Svedman, P., et al., *Staphylococcal wound infection in the pig: Part I. Course*. Ann Plast Surg, 1989. **23**(3): p. 212-8.
4. Luna, C.M., et al., *Animal models of ventilator-associated pneumonia*. Eur Respir J, 2009. **33**(1): p. 182-8.
5. Meurens, F., et al., *The pig: a model for human infectious diseases*. Trends in microbiology, 2012. **20**(1): p. 50-57.

6. Leroux-Roels et al., *Impact of adjuvants on CD4+ T cell and B cell responses to a protein antigen vaccine: Results from a phase II, randomized, multicenter trial.*

Clinical Immunology 169 (2016) 16—27.

[0440] Хотя предпочтительные варианты осуществления были изображены и
5 подробно описаны в данном документе, специалистам в соответствующей области
техники будет очевидно, что различные изменения, дополнения, замены и тому
подобное могут быть сделаны без отступления от сути настоящего изобретения, и
поэтому они считаются входящими в объем настоящего изобретения, как определено
в приведенной ниже формуле изобретения.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая:

(i) полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) и

5 (ii) вариант полипептида LukA *S. aureus*, при этом указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

2. Комбинация двух или более иммуногенных композиций, которые совместно
10 содержат:

(i) полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) и

(ii) вариант полипептида LukA *S. aureus*, при этом указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Lys83,
15 Ser141, Val113 и Val193 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

3. Иммуногенная композиция по п. 1 или комбинация иммуногенных композиций по п. 2, где вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует Glu323 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

20 4. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 1—3, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотные замены по каждому аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотным остаткам Lys83, Ser141, Val113, Val193 и Glu323 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

25 5. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 4, где аминокислотные замены предусматривают Lys83Met, Ser141Ala, Val113Ile, Val193Ile и Glu323Ala.

6. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 1—5, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает
30 аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4.

7. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 1—6, где указанный вариант полипептида LukA дополнительно предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Tyr74, Asp140, Gly149 и Gly156 в последовательности под SEQ ID NO: 25.
8. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 7, где аминокислотные замены предусматривают Tyr74Cys, Asp140Cys, Gly149Cys и Gly156Cys.
9. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 7 или п. 8, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6.
10. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 1—9, где указанный вариант белка или полипептида LukA дополнительно предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному остатку, который соответствует аминокислотному остатку Thr249 в последовательности под SEQ ID NO: 25.
11. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 10, где указанный вариант полипептида LukA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8.
12. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 1—11, где полипептид SpA представляет собой вариант полипептида SpA.
13. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 12, где вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая нарушает связывание Fc, и по меньшей мере вторую аминокислотную замену, которая нарушает связывание VH3.

14. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 12 или п. 13, где вариант полипептида SpA предусматривает домен D из SpA, при этом указанный домен D из SpA предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 58.
15. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 14, где вариант полипептида SpA предусматривает наличие аминокислотной замены по одному или обоим аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58.
16. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 14 или п. 15, где вариант полипептида SpA дополнительно предусматривает наличие домена E, A, B или C из SpA.
17. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 16, где вариант полипептида SpA предусматривает домены E, A, B и C из SpA и содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:54.
18. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 16 или п. 17, где каждый из доменов E, A, B и C из SpA предусматривает наличие аминокислотной замены по одному или обоим аминокислотным положениям, соответствующим аминокислотным положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58.
19. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 15—18, где аминокислотная замена по одному или обоим аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, представляет собой замену остатка глутамина на остаток лизина.
20. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 12—19, где вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен предусматривает наличие (i) замены на лизин по остаткам глутамина, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и (ii) замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58.

21. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 1—20, где указанная композиция дополнительно содержит полипептид лейкоцидина В (LukB) *S. aureus* или его вариант.
22. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 21,
5 где полипептид LukB представляет собой полипептид LukB под SEQ ID NO: 15 или полипептид LukB под SEQ ID NO: 16.
23. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 21, где полипептид LukB представляет собой вариант полипептида LukB.
24. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 23,
10 где вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 15, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% сходством последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.
25. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 24,
15 где вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную замену по аминокислотному положению, соответствующему положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.
26. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 25,
20 где аминокислотная замена представляет собой замену валина на лейцин.
27. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 23—26, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu109, Thr121 и Arg154 в
25 последовательности под SEQ ID NO: 15.
28. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 23—26, где указанный вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную замену по одному или более аминокислотным остаткам, которые соответствуют аминокислотным остаткам Glu45, Glu110, Thr122 и Arg155 в
30 последовательности под SEQ ID NO: 16.
29. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 23—26, где вариант полипептида LukB предусматривает аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью

последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей под SEQ ID NO: 17—22.

30. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 21, где указанная композиция предусматривает вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 4, и полипептид LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 16.

31. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 21, где указанная композиция предусматривает вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 3, и полипептид LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 15.

32. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 21, где указанная композиция предусматривает вариант полипептида LukA, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 3, и полипептид LukB, предусматривающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 18.

33. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 30—32, где полипептид SpA представляет собой вариант полипептида SpA.

34. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 33, где вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен предусматривает наличие (i) замены

на лизин по остаткам глутамина, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и (ii) замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58.

- 5 35. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 21, где (i) вариант полипептида SpA предусматривает по меньшей мере один домен A, B, C, D или E из SpA, и где по меньшей мере один домен характеризуется наличием замен на лизин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58; (ii) вариант полипептида LukA предусматривает вариант полипептида LukA из CC8, предусматривающий замену на метионин по аминокислотному положению, соответствующему положению 80 в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, замену на аланин по аминокислотному положению, соответствующему
- 10 положению 138 в последовательности под SEQ ID NO: 1, замену на изолейцин по аминокислотным положениям, соответствующим положениям 110 и 190 в последовательности под SEQ ID NO: 1, и замену на аланин по аминокислотному положению, соответствующему положению 320 в последовательности под SEQ ID NO: 1; и (iii) полипептид LukB представляет собой вариант полипептида LukB из CC45, предусматривающий замену на лейцин по аминокислотному положению, соответствующему положению 53 в последовательности под SEQ ID NO: 16.
- 15 36. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 35, где вариант полипептида SpA предусматривает последовательно домены E, D, A, B и C из SpA, при этом каждый домен предусматривает наличие замен на лизин по
- 20 аминокислотным положениям, соответствующим положениям 9 и 10 в последовательности под SEQ ID NO: 58, и замены на глутамат по аминокислотному положению, соответствующему положению 33 в последовательности под SEQ ID NO: 58.
- 25 37. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 1—34, дополнительно содержащие адъювант.
- 30 38. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 37, где адъювант представляет собой стабильную эмульсию типа масло в воде.
39. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 37, где адъювант предусматривает сапонин.

40. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 39, где сапонин представляет собой QS21.
41. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 37, где адъювант предусматривает агонист TLR4.
- 5 42. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 41, где агонист TLR4 представляет собой липид A или его аналог или производное.
43. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 41, где агонист TLR4 представляет собой гликопиранозиллипидный адъювант (GLA).
- 10 44. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 41, где адъювант предусматривает агониста TLR-4 в комбинации со стабильной эмульсией типа масло в воде.
45. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 43, где адъювант предусматривает GLA-SE.
46. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 41, где адъювант предусматривает агониста TLR-4 в комбинации с сапонином.
- 15 47. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 43, где адъювант предусматривает GLA-LSQ.
48. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций, где указанные композиции предусматривают одну или более молекул нуклеиновой
- 20 кислоты, кодирующих полипептид белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) или его вариант, вариант полипептида LukA и полипептид LukB или его вариант из иммуногенных композиций по любому из пп. 1—36.
49. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 48, где одна или более молекул нуклеиновой кислоты содержатся в одном или более
- 25 векторах.
50. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по п. 48 или п. 49, где указанные композиции предусматривают клетку-хозяина, где указанная клетка-хозяин содержит указанную одну или более молекул нуклеиновой кислоты или указанный один или более векторов.
- 30 51. Способ лечения или предупреждения инфекции, обусловленной бактерией рода *Staphylococcus*, у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества иммуногенной композиции или комбинации иммуногенных композиций по любому из пп. 1—50.

52. Способ обеспечения развития иммунного ответа на бактерию рода *Staphylococcus* у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества иммуногенной композиции или комбинации иммуногенных композиций по любому из пп. 1—50.
- 5 53. Способ обеспечения деколонизации или предупреждения колонизации или повторной колонизации бактерией рода *Staphylococcus* у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества иммуногенной композиции или комбинации иммуногенных композиций по любому из пп. 1—50.
- 10 54. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 1—50 для применения в способе обеспечения выработки иммунного ответа на *S. aureus* у субъекта.
55. Иммуногенная композиция или комбинация иммуногенных композиций по любому из пп. 1—50 для применения в качестве лекарственного препарата.

Выравнивание последовательности Luka

```

SEQ_ID_NO:1      ---HKDSQDQNKKEHVDKSSQQKDKRNVTNKDKNSTAPDDIGKNGKI TKRTETVYDEKTN1 57 CC8
SEQ_ID_NO:2      --ANKDSQDQTKKEHVDKAQQQKEKRNVNDDKDKNTPGPDIDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNI 58 CC45
SEQ_ID_NO:27     NSANKDSQDQTKKEHVDKAQQQKEKRNVNDDKDKNTPGPDIDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNI 60 HMPREF0772_044 (TCH60)
SEQ_ID_NO:36     NSANKDSQDQTKKEHVDKAQQQKEKRNVNDDKDKNTPGPDIDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNI 60 SAR2108 (MRS252)
SEQ_ID_NO:34     NSANKDSQDQTKKEHVDKAQQQKEKRNVNDDKDKNTPGPDIDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNI 60 SALG_02329 (A9635)
SEQ_ID_NO:35     NSANKDSQDQTKKEHVDKAQQQKEKRNVNDDKDKNTPGPDIDIGKNGKVTKRTETVYDEKTN1 60 SAPIG2061 (ST398)
SEQ_ID_NO:37     NSANKDSQDQTKKEHVDKAQQQKEKRNVNDDKDKNTPGPDIDIGKNGKVTKRTETVYDEKTN1 60 SATG_01930 (D139)
SEQ_ID_NO:26     NSAHKDSQDQNKKEHVDKSSQQKDKRNVTNKDKNSTAPDDIGKNGKI TKRTETVYDEKTN1 60 NEWMAN
SEQ_ID_NO:32     NSAHKDSQDQNKKEHVDKSSQQKDKRNVTNKDKNSTVPDDIGKNGKI TKRTETVYDEKTN1 60 SAH1876C (RF122)
SEQ_ID_NO:38     NSAHKDSQDQNKKEHVDKSSQQKDKRNVTNKDKNSTVPDDIGKNGKI TKRTETVYDEKTN1 60 SAV2005 (Mu50)
SEQ_ID_NO:31     NSAHKDSQDQNKKEHVDKSSQQKDKRNVTNKDKNSTVPDDIGKNGKI TKRTETVYDEKTN1 60 SA1813 (N315)
SEQ_ID_NO:33     NSAHKDSQDQNKKEHVDKSSQQKDKRNVTNKDKNSTAPDDIGKNGKI TKRTETVYDEKTN1 60 SACOL2006
SEQ_ID_NO:29     NSAHKDSQDQNKKEHVDKSSQQKDKRNVTNKDKNSTAPDDIGKNGKI TKRTETVYDEKTN1 60 USA300 (TCH959)
SEQ_ID_NO:28     NSAHKDSQDQNKKEHVDKSSQQQKEKRNVTNKDKNSTVPDDIGKNGKI TKRTETVYDEKTN1 60 TCH130
SEQ_ID_NO:30     NSAHKDSQDQNKKEHVDKSSQQQKEKRNVTNKDKNSTVPDDIGKNGKI TKRTETVYDEKTN1 60 MW1942 (MW2)
                :*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***.***
SEQ_ID_NO:25     NSAHKDSQDQNKKEHVDKSSQQQKEKRNVTNKDKNSTXPDDIGKNGKI TKRTETVYDEKTN1 60 Большинство

SEQ_ID_NO:1      LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHKKEKNSNWLKYPSEYHVDFFQVKRN 117
SEQ_ID_NO:2      LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHHRNETNASWLKYPSEYHVDFFQVQRN 118
SEQ_ID_NO:27     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHHRNETNASWLKYPSEYHVDFFQVQRN 120
SEQ_ID_NO:36     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHHRNETNASWLKYPSEYHVDFFQVQRN 120
SEQ_ID_NO:34     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHHRNETNASWLKYPSEYHVDFFQVQRN 120
SEQ_ID_NO:35     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHKEENSSWLKYPSEYHVDFFQVKSNI 120
SEQ_ID_NO:37     LQNLQFDFFIDDPFYDKNILLVKKQGSIHNSLKFESHKEENSSWLKYPSEYHVDFFQVKRN 120
SEQ_ID_NO:26     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHKKEEKNSNWLKYPSEYHVDFFQVKRN 120
SEQ_ID_NO:32     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHKKEEKNSNWLKYPSEYHVDFFQVKRN 120
SEQ_ID_NO:38     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHKKEEKNSNWLKYPSEYHVDFFQVKRN 120
SEQ_ID_NO:31     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHKKEEKNSNWLKYPSEYHVDFFQVKRN 120
SEQ_ID_NO:33     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHKKEEKNSNWLKYPSEYHVDFFQVKRN 120
SEQ_ID_NO:29     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHKKEEKNSNWLKYPSEYHVDFFQVKRN 120
SEQ_ID_NO:28     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHKKEEKNSNWLKYPSEYHVDFFQVKRN 120
SEQ_ID_NO:30     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHKKEEKNSNWLKYPSEYHVDFFQVKRN 120
                *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
SEQ_ID_NO:25     LQNLQFDFFIDDPFYDKNVLLVKKQGSIHNSLKFESHKKEEKNSNWLKYPSEYHVDFFQVKRN 120
                74            83            113
    
```

1/32

ФИГ. 1

Выравнивание последовательности Luka (продолж.)

```

SEQ_ID_NO:1      RKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 177
SEQ_ID_NO:2      PKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSLGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKSIISYNQQNYDTIA 178
SEQ_ID_NO:27     PKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSLGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKSIISYNQQNYDTIA 180
SEQ_ID_NO:36     PKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSLGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKSIISYNQQNYDTIA 180
SEQ_ID_NO:34     PKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSLGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKSIISYNQQNYDTIA 180
SEQ_ID_NO:35     RKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYNSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 180
SEQ_ID_NO:37     RKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYNSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 180
SEQ_ID_NO:26     RKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 179
SEQ_ID_NO:32     RKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 180
SEQ_ID_NO:38     RKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 180
SEQ_ID_NO:31     RKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 180
SEQ_ID_NO:33     RKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 180
SEQ_ID_NO:29     PKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 179
SEQ_ID_NO:28     RKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 180
SEQ_ID_NO:30     PKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 180

```

***** **:******;*****:*****

```

SEQ_ID_NO:25     RKTEILDQLPKNKISTAKVDSFFSYSSGGKFDSTKGIIGRTSSNSYSKTIISYNQQNYDTIA 180

```

140/141 149 156

```

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

```

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

```

SEQ_ID_NO:25     SGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVR 240

```

193

ФИГ. 1 (продолж.)

Выравнивание последовательности LukA (продолж.)

```

SEQ_ID_NO:1      SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYAPPFILEKNKDGQRLIVTYE 297
SEQ_ID_NO:2      SGFNPEFLT YISNEKTNDKTRFEVTTYTRNQDILKNKPGIHYGQFILEQNKDGGQRFIVVYE 298
SEQ_ID_NO:27     SGFNPEFLT YISNEKSNEKTRFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYGQFILEQNKDGGQRFIVVYE 300
SEQ_ID_NO:36     SGFNPEFLT YISNEKSNEKTRFEVTTYTRNQDILKNKPGIHYGQFILEQNKDGGQRFIVVYE 300
SEQ_ID_NO:34     SGFNPEFLT YISNEKTNDKTRFEVTTYTRNQDILKNKPGIHYGQFILEQNKDGGQRFIVVYE 300
SEQ_ID_NO:35     SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDVLKNKPGIHYAPPFILEKNKDGQRLIVTYE 300
SEQ_ID_NO:37     SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDILKNKPGIHYAPPFILEKNKDGQRLIVTYE 300
SEQ_ID_NO:26     SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYAPPFILEKNKDGQRLIVTYE 299
SEQ_ID_NO:32     SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYAPPFILEKNKDGQRLIVTYE 300
SEQ_ID_NO:38     SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYAPSIILEKNKDGQRLIVTYE 300
SEQ_ID_NO:31     SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYAPPFILEKNKDGQRLIVTYE 300
SEQ_ID_NO:33     SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYAPPFILEKNKDGQRLIVTYE 300
SEQ_ID_NO:29     SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYAPPFILEKNKEGQRLIVTYE 299
SEQ_ID_NO:28     SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYAPPFILEKNKEGQRLIVTYE 300
SEQ_ID_NO:39     SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYAPPFILEKNKEGQRLIVTYE 300

```

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

```

SEQ_ID_NO:25     SGFNPEFLT YLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYAPPFILEKNKDGQRLIVTYE 300

```

249

```

SEQ_ID_NO:1      VDWKNTVKVVDKYSDDNRPYREG 321
SEQ_ID_NO:2      VDWKNTVKVVEKYSQNKPYREG 322
SEQ_ID_NO:27     VDWKNTVKVVEKYSQNKPYREG 324
SEQ_ID_NO:36     VDWKNTVKVVEKYSQNKPYREG 324
SEQ_ID_NO:34     VDWKNTVKVVEKYSQNKPYREG 324
SEQ_ID_NO:35     VDWKNTVKVIDKYSDENKPYREG 324
SEQ_ID_NO:37     VDWKNTVKVIDKYSDDNKFYREG 324
SEQ_ID_NO:26     VDWKNTVKVVDKYSDDNRPYREG 323
SEQ_ID_NO:32     VDWKNTVKVVDKYSDDNRPYREG 324
SEQ_ID_NO:38     VDWKNTVKVVDKYSDDNKFYREG 324
SEQ_ID_NO:31     VDWKNTVKVVDKYSDDNRPYREG 324
SEQ_ID_NO:33     VDWKNTVKVVEKYSDDNRPYREG 324
SEQ_ID_NO:29     VDWKNTVKVVDKYIDN-KSFREG 322
SEQ_ID_NO:28     VDWKNTVKVVDKYSDDN-KSFREG 323
SEQ_ID_NO:39     VDWKNTVKVVDKYSDDN-KSFREG 323

```

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

```

SEQ_ID_NO:25     VDWKNTVKVVDKYSDDNRPYREG 324

```

323

ФИГ. 1 (продолж.)

Выравнивание последовательности LukB

```

SEQ_ID_NO:15      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 CC8
SEQ_ID_NO:16      EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 CC45
SEQ_ID_NO:40      EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 A9639
SEQ_ID_NO:43      EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 E1410
SEQ_ID_NO:45      EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 MRSA252
SEQ_ID_NO:42      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 D139
SEQ_ID_NO:46      KINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 Mд.50
SEQ_ID_NO:44      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 JKD6008
SEQ_ID_NO:41      -----DKETVFIKAKGT 12 COL
SEQ_ID_NO:115     KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 USA300 PPR3757
SEQ_ID_NO:116     KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 NEWMAN
SEQ_ID_NO:98      KINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 RF122
SEQ_ID_NO:47      KINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 MW2
SEQ_ID_NO:99      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60 TCH130
                      *****

SEQ_ID_NO:39      KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGT 60
                      45          53

SEQ_ID_NO:15      IGSGLRILDPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:16      IGSGLKILNPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 120
SEQ_ID_NO:40      IGSGLKILNPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 120
SEQ_ID_NO:43      IGSGLKILNPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 120
SEQ_ID_NO:45      IGSGLKILNPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 120
SEQ_ID_NO:42      IGSGLRILEPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:46      IGSGLRILDPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:44      IGSGLRILDPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:41      IGSGLRILDPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 71
SEQ_ID_NO:115     IGSGLRILDPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:116     IGSGLRILDPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:98      IGSGLRILDPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:47      IGSGLRILDPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 119
SEQ_ID_NO:99      IGSGLRILDPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 119
                      *****;***** ,*****

SEQ_ID_NO:39      IGSGLRILDPNNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESRVVKYTYGY 119
                      109

```

ФИГ. 2

Выравнивание последовательности LukB (продолж.)

```
SEQ_ID_NO:15      KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG 179
SEQ_ID_NO:16      KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQPTTNKGVAVKVEAHSINNMG 180
SEQ_ID_NO:40      KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQPTTNKGVAVKVEAHSINNMG 180
SEQ_ID_NO:43      RTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQPTTNKGVAVKVEAHSINNMG 180
SEQ_ID_NO:45      KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQPTTNKGVAVKVEAHSINNMG 180
SEQ_ID_NO:42      KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQPTTNKGVAVKVEAHLINNMG 179
SEQ_ID_NO:46      RTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG 179
SEQ_ID_NO:44      KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG 179
SEQ_ID_NO:41      KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG 131
SEQ_ID_NO:115     KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG 179
SEQ_ID_NO:116     KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG 179
SEQ_ID_NO:98      KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG 179
SEQ_ID_NO:47      KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG 179
SEQ_ID_NO:99      KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG 179
*****:*** *****.*****:*** *:;***.***** *****
```

```
SEQ_ID_NO:39      KTEGGDFSIINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMG 179
121                                     154
```

```
SEQ_ID_NO:15      HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 239
SEQ_ID_NO:16      HDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 240
SEQ_ID_NO:40      HDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 240
SEQ_ID_NO:43      HDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 240
SEQ_ID_NO:45      HDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 240
SEQ_ID_NO:42      HDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 239
SEQ_ID_NO:46      HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 239
SEQ_ID_NO:44      HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 239
SEQ_ID_NO:41      HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 191
SEQ_ID_NO:115     HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 239
SEQ_ID_NO:116     HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 239
SEQ_ID_NO:98      HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 239
SEQ_ID_NO:47      HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 239
SEQ_ID_NO:99      HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 239
*****:*.*****:*****:*****:*****
```

```
SEQ_ID_NO:39      HDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDK 239
```

ФИГ. 2 (продолж.)

Выравнивание последовательности LukB (продолж.)

```

SEQ_ID_NO:15      KDEGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:16      NDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHHGFWGYWSGENHVVDQKEEKLSALYEVVDWKTHDVKL 300
SEQ_ID_NO:40      NDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNRHGFWGYWSGENHVVDQKEEKLSALYEVVDWKTHDVKL 300
SEQ_ID_NO:43      NDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHHGFWGYWSGENHVVDQKEEKLSALYEVVDWKTHDVKL 300
SEQ_ID_NO:45      NDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHHGFWGYWSGENHVVDQKEEKLSALYEVVDWKTHDVKL 300
SEQ_ID_NO:42      KDEGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVVDKKEEKLSALYEVVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:46      KDEGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVVDKKEEKLSALYEVVDWKTHDVKF 299
SEQ_ID_NO:44      KDEGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVVDKKEEKLSALYEVVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:41      KDEGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVVDKKEEKLSALYEVVDWKTHNVKF 251
SEQ_ID_NO:115     KDEGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVVDKKEEKLSALYEVVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:116     KDEGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVVDKKEEKLSALYEVVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:98      KDEGKSKFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVVDKKEEKLSALYEVVDWKTHDVKF 299
SEQ_ID_NO:47      KDEGKSKFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVVDKKEEKLSALYEVVDWKTHNVKF 299
SEQ_ID_NO:99      KDEGKSKFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVVDKKEEKLSALYEVVDWKTHNVKF 299
:*,**,*;*,*****;*,**,*;*****;*****;*****;*,*

```

```

SEQ_ID_NO:39      KDEGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVVDKKEEKLSALYEVVDWKTHNVKF 299

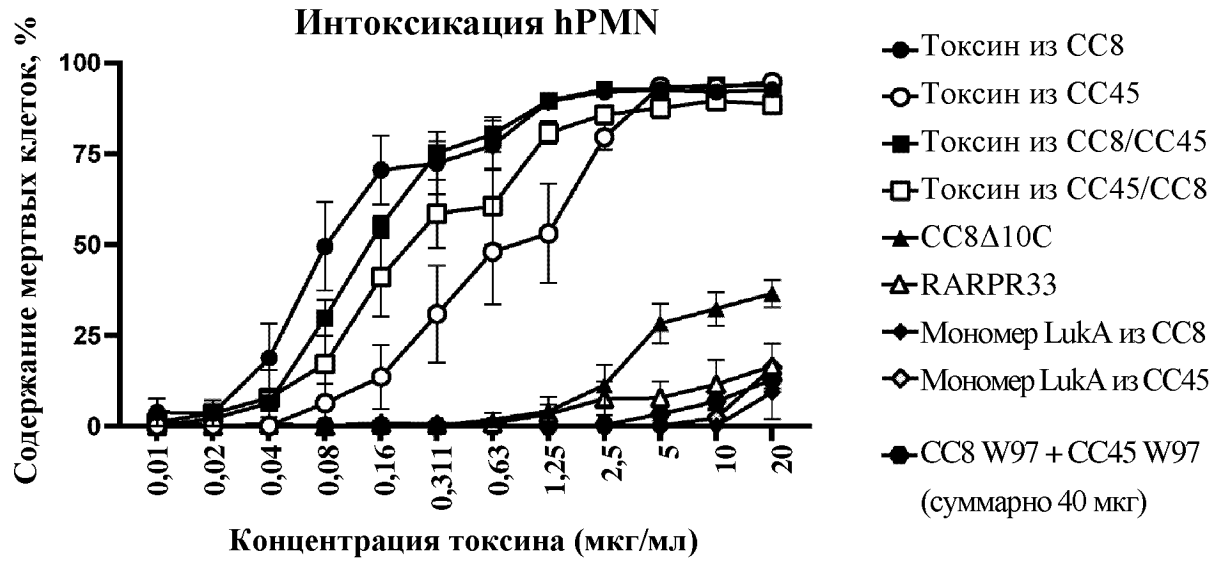
```

```

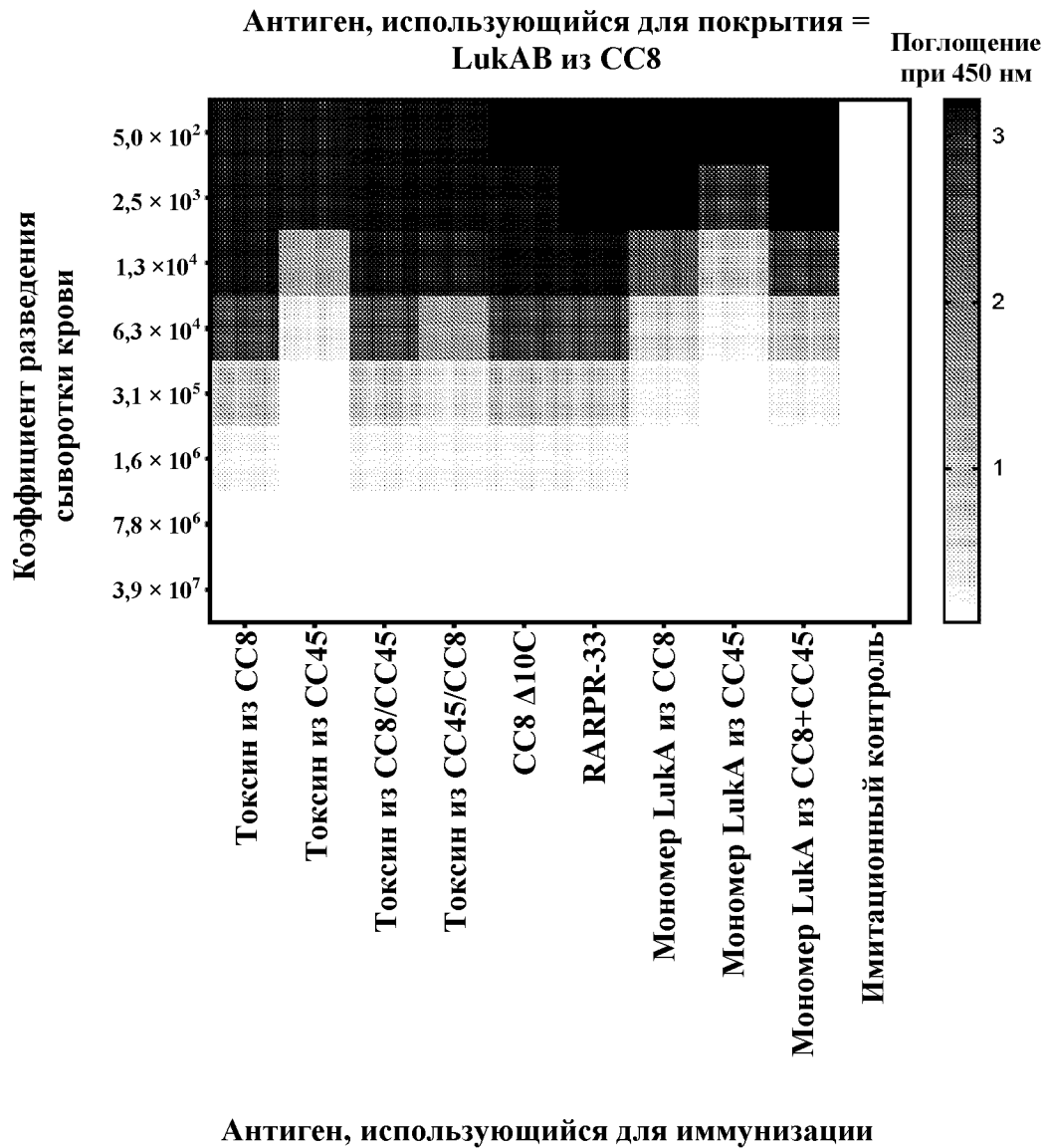
SEQ_ID_NO:15      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:16      IKTINDKEKK 310
SEQ_ID_NO:40      IKTINDKEKK 310
SEQ_ID_NO:43      IKTINDKEQK 310
SEQ_ID_NO:45      IKTINDKEQK 310
SEQ_ID_NO:42      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:46      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:44      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:41      VKVLNDNEKK 261
SEQ_ID_NO:115     VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:116     VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:98      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:47      VKVLNDNEKK 309
SEQ_ID_NO:99      VKVLNDNEKK 309
:*,**,*;*,*
SEQ_ID_NO:39      VKVLNDNEKK 309

```

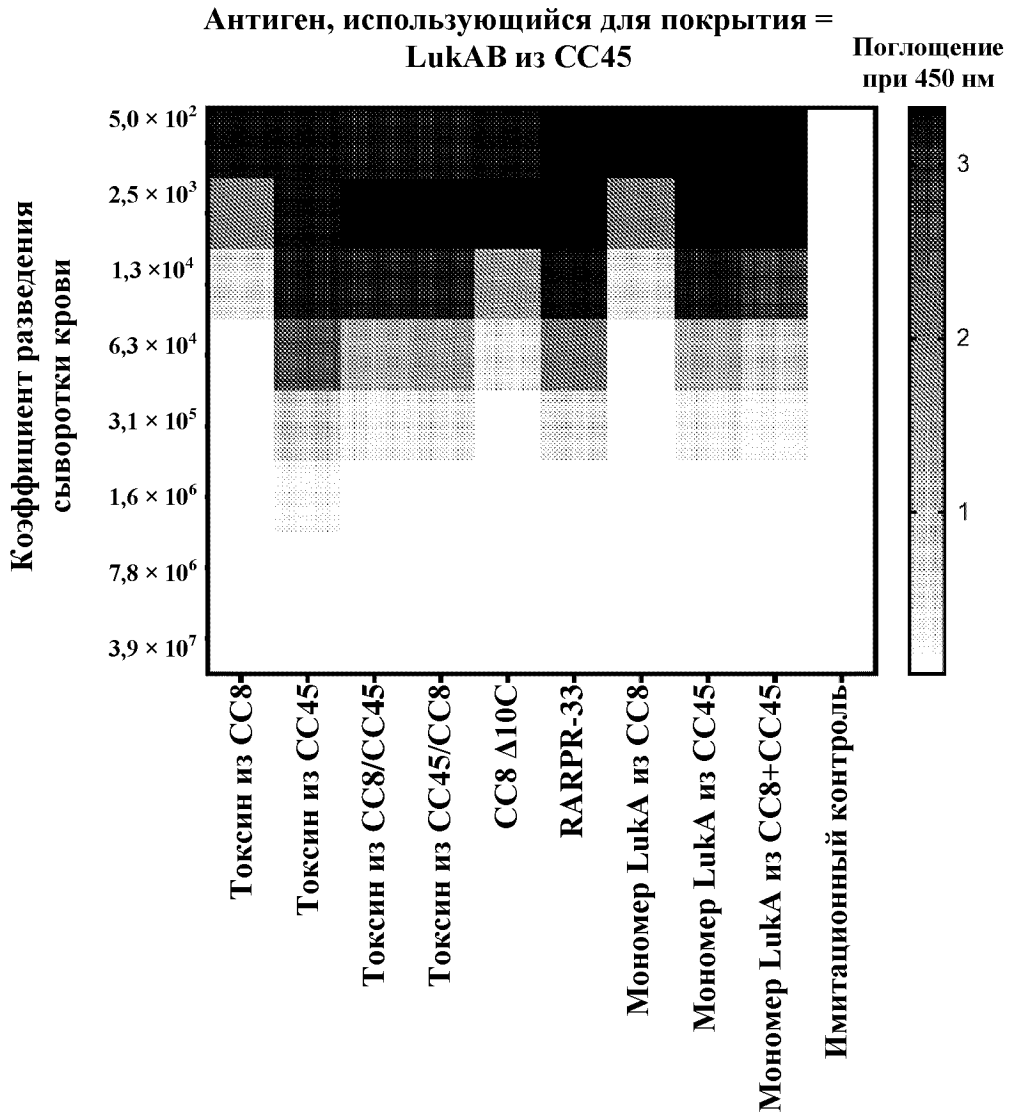
ФИГ. 2 (продолж.)



ФИГ. 3

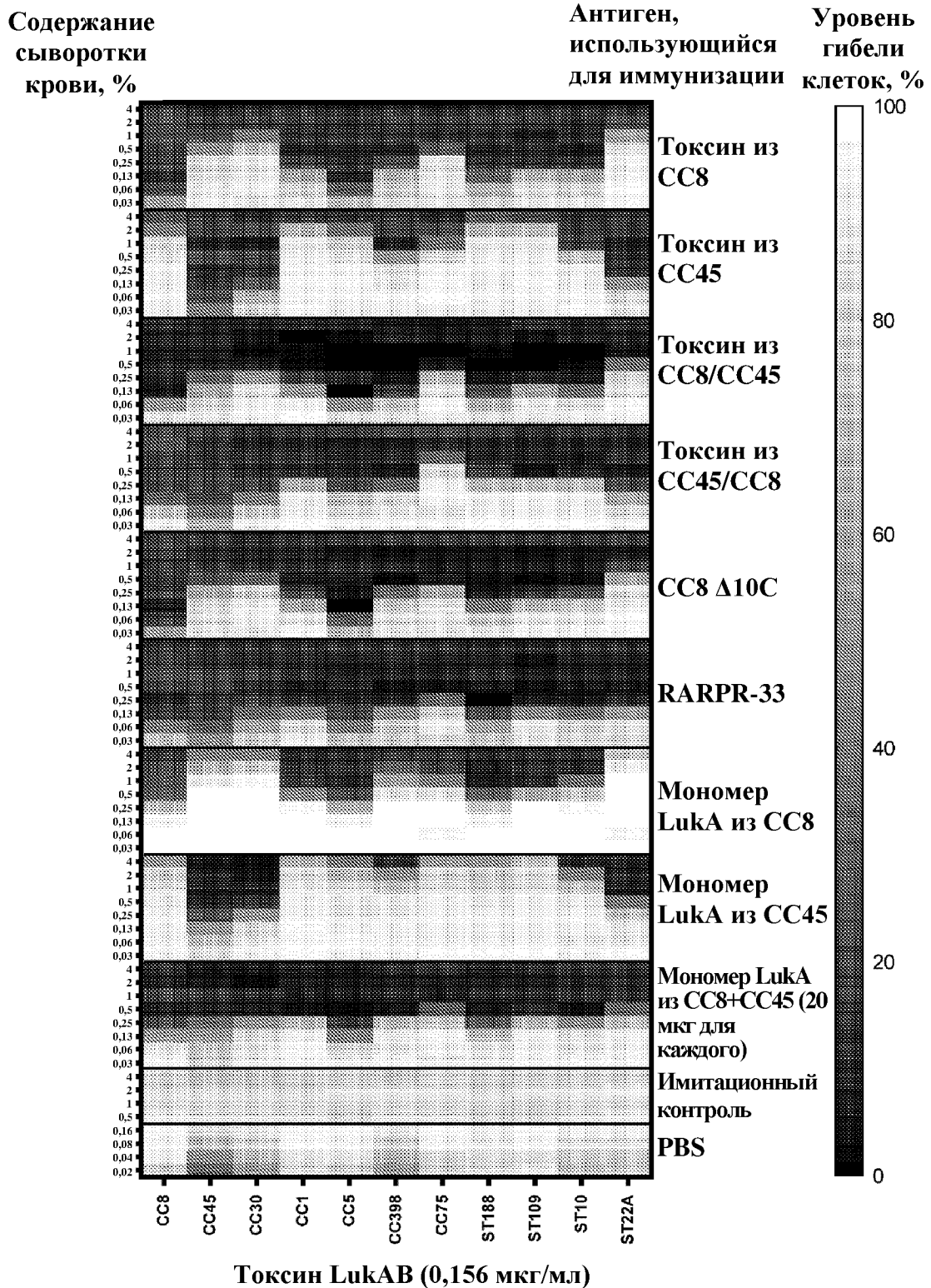


ФИГ. 4А



Антиген, использующийся для иммунизации

ФИГ. 4В



ФИГ. 5

Анализ нейтрализации: содержание мертвых PMN человека, % (нитроксиация с помощью LD90 вариантов LukAB+2% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n=4 донора											
Антиген LukAB, использующийся для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8	8,86	19,09	11,91	2,07	3,14	2,35	3,34	3,11	2,57	2,46	33,02
CC45	79,63	1,50	1,05	81,08	80,10	50,46	67,85	81,92	75,50	38,83	2,60
CC8/CC45	4,11	1,46	0,00	0,38	0,00	0,96	1,73	0,00	0,00	0,00	0,76
CC45/CC8	8,80	1,84	1,41	0,13	0,22	0,54	0,54	2,94	0,95	0,99	1,73
CC8 E323A/CC45	2,90	1,37	0,66	1,65	0,23	0,00	4,37	0,06	4,26	0,86	3,91
CC45 E323A/CC8	7,92	1,28	0,00	0,00	0,56	0,00	9,29	2,91	2,30	2,22	2,86
CC8 E323A/CC45 B5	37,18	51,31	53,86	40,06	39,43	74,44	49,27	23,54	47,20	66,59	35,62
CC45 E323A/CC8 B5	19,57	10,70	47,46	54,36	44,74	64,77	71,72	82,49	75,41	49,76	13,32
RARPR 13	23,49	6,31	3,94	42,95	29,57	1,87	4,58	32,08	16,15	8,42	7,25
RARPR 15	9,22	4,02	4,33	4,02	6,08	4,60	7,66	7,07	6,82	7,15	8,81
RARPR 17	56,11	8,90	4,35	58,37	64,23	4,36	5,00	52,92	40,46	7,22	8,88
RARPR 19	42,11	10,05	10,23	40,04	49,00	9,71	9,49	44,67	17,04	9,39	9,81
SM1W97	9,59	87,32	89,66	2,63	2,90	22,13	16,21	4,85	6,57	5,60	87,96
Импляционный контроль	88,81	81,28	86,39	87,04	89,89	87,03	93,31	90,54	90,08	91,77	92,30
CC45 B5 и CC8 B5 представляют собой варианты LukB с делециями *Мономер CC8 LukA W97, экспрессируемый в клетках HEK293											
Анализ нейтрализации: содержание мертвых PMN человека, % (нитроксиация с помощью LD90 вариантов LukAB+2% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n=4 донора											
Антиген LukAB, использующийся для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8 delta10C	25,46	16,21	17,06	30,25	18,63	27,37	62,25	17,97	22,44	21,63	18,86
RARPR 30	26,73	18,82	19,72	35,26	19,17	18,00	16,62	27,99	29,64	16,48	19,95
RARPR 31	20,61	78,41	79,18	19,06	11,23	42,24	47,72	14,23	23,67	11,37	82,07
RARPR 32	15,70	30,25	30,64	4,69	6,10	6,88	5,11	9,97	5,86	6,17	43,44
RARPR 33	17,33	8,43	10,14	8,95	12,32	11,81	14,58	12,55	11,55	9,08	10,46
RARPR 34	15,77	11,63	12,92	10,47	9,79	5,96	7,19	10,11	5,42	9,00	19,29
CC8 W97	12,75	78,67	79,90	3,78	4,49	35,56	39,56	9,09	10,68	13,01	85,04
CC45 W97	86,48	26,11	23,68	87,12	88,52	81,79	88,11	85,80	86,48	84,08	40,99
RARPR 31 + CC45 SW97	20,49	27,41	35,17	49,31	18,69	52,84	69,32	22,93	45,50	36,26	44,91
Импляционный контроль	89,05	88,88	89,56	87,67	87,61	88,38	89,26	87,11	90,31	87,72	88,05

ФИГ. 6А

Анализ нейтрализации: содержание мертвых PMN человека, % (нитротексикация с помощью LD90 вариантов LukAB+1% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n=4 донора											
Антиген LukAB, использующийся для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8	6,31	79,12	78,00	4,08	2,72	2,12	23,47	2,31	1,45	2,06	89,11
CC45	85,25	8,41	5,43	88,18	86,90	82,07	86,32	82,99	82,13	81,55	1,64
CC8/CC45	2,95	2,99	2,55	0,00	0,00	0,00	13,65	0,92	0,00	0,00	19,64
CC45/CC8	12,02	2,54	0,00	69,77	19,76	38,40	30,76	77,31	38,67	48,34	1,02
CC8 E323A/CC45	4,92	5,40	5,15	3,89	1,29	4,67	44,20	0,03	0,50	1,49	16,39
CC45 E323A/CC8	14,19	0,00	0,00	65,49	33,06	67,53	82,11	74,34	29,92	59,20	0,00
CC8 E323A/CC45 B5	44,80	85,26	72,72	88,32	62,49	85,71	88,69	61,54	76,01	81,73	85,04
CC45 E323A/CC8 B5	56,69	58,06	63,51	86,04	73,53	81,75	87,05	86,17	88,14	80,33	72,51
RARPR 13	77,93	4,99	3,09	84,41	80,70	12,54	15,60	80,10	71,92	15,54	0,37
RARPR 15	27,35	2,99	0,67	43,23	50,38	0,93	6,47	33,91	17,17	1,51	1,63
RARPR 17	87,67	5,78	1,96	86,75	85,31	55,72	46,87	86,40	87,35	46,46	3,17
RARPR 19	87,20	6,79	3,53	90,10	89,81	36,00	51,36	87,24	82,62	26,12	5,66
SM1W97	3,48	93,22	89,90	25,96	0,00	73,66	63,47	0,70	6,14	3,10	94,47
Имитационный контроль	90,53	94,26	93,47	93,61	93,03	93,21	93,34	91,75	92,00	92,35	90,72

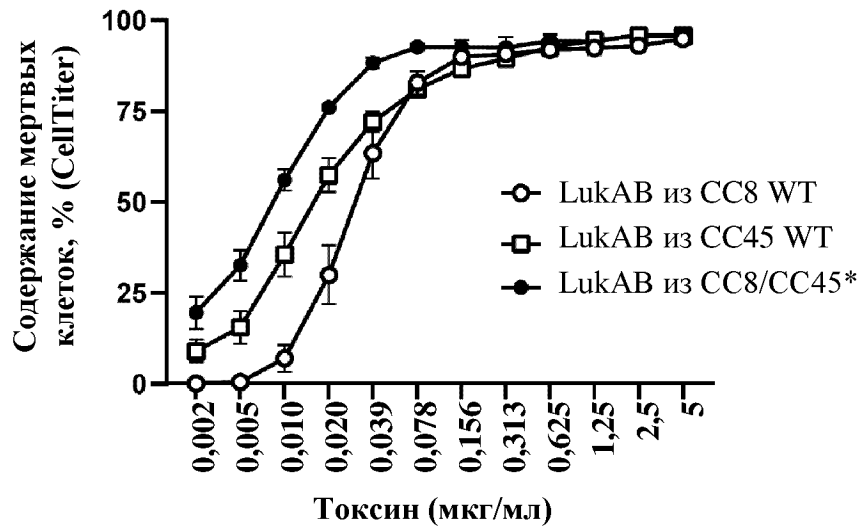
Анализ нейтрализации: содержание мертвых PMN человека, % (нитротексикация с помощью LD90 вариантов LukAB+1% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n=4 донора											
Антиген LukAB, использующийся для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8 delta10C	21,27	48,38	34,07	71,41	15,91	59,63	79,56	41,56	68,51	56,94	41,67
RARPR 30	28,95	16,90	21,28	77,12	35,04	33,77	26,01	61,04	71,73	32,93	14,38
RARPR 31	21,83	86,11	87,37	64,22	28,40	73,38	75,84	27,79	67,07	33,51	89,54
RARPR 32	9,35	65,16	67,49	4,22	4,32	2,79	12,24	4,71	2,24	2,80	76,25
RARPR 33	17,16	15,09	17,73	14,45	8,25	19,25	15,80	5,89	11,21	6,59	34,68
RARPR 34	22,52	42,51	44,83	6,80	5,30	6,77	15,77	5,37	4,55	6,97	51,43
CC8 W97	11,18	86,60	87,22	32,08	5,73	62,26	64,70	12,38	36,39	22,36	86,48
CC45 W97	88,20	49,88	54,36	86,55	86,81	87,97	87,96	88,78	86,29	86,15	63,54
RARPR 31 + CC45 SW97	37,40	57,23	64,18	85,41	53,18	74,04	81,87	55,68	79,97	67,11	73,77
Имитационный контроль	95,48	91,80	91,50	95,81	94,80	91,87	94,48	94,48	94,85	94,51	94,79

ФИГ. 6B

Анализ нейтрализации: содержание мертвых PMN человека, % (ингибирование с помощью LD90 вариантов LukAB+0,5% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n=4 донора											
Антиген LukAB, использующийся для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8	4,72	91,20	89,33	14,98	4,66	39,86	84,43	3,02	3,41	1,99	90,83
CC45	89,11	13,32	9,54	91,24	91,47	87,94	92,77	85,99	87,64	87,15	26,57
CC8/CC45	4,20	65,59	74,67	62,14	10,51	77,09	84,91	0,29	18,82	32,31	84,21
CC45/CC8	71,54	72,15	37,01	89,70	80,64	86,07	85,81	88,62	89,05	88,11	70,59
CC8 E323A/CC45	15,35	49,18	68,28	86,87	26,99	72,20	86,68	17,24	64,65	24,31	83,01
CC45 E323A/CC8	78,55	51,02	12,91	89,15	85,25	86,12	90,10	86,75	86,46	88,42	37,10
CC8 E323A/CC45 B5	84,73	92,88	89,97	90,77	89,44	90,97	93,02	86,62	89,11	89,31	91,77
CC45 E323A/CC8 B5	89,10	88,13	90,30	89,04	90,22	88,34	91,53	90,08	88,93	91,35	91,77
RARPR 13	92,34	1,46	1,63	91,95	91,88	55,81	62,35	91,87	88,36	80,69	6,74
RARPR 15	90,27	3,35	0,00	92,63	88,06	58,82	82,81	91,54	89,57	57,13	1,32
RARPR 17	92,25	1,35	0,48	92,38	92,90	91,11	89,94	92,48	92,80	87,28	1,26
RARPR 19	92,63	3,62	2,11	90,72	89,79	84,15	87,78	91,37	93,34	85,11	4,16
SM1W97	18,13	89,96	92,05	90,59	38,57	87,10	89,10	29,16	81,63	61,72	92,22
Имитационный контроль	93,93	91,94	90,60	92,04	94,88	93,06	91,54	93,06	91,73	93,38	95,19

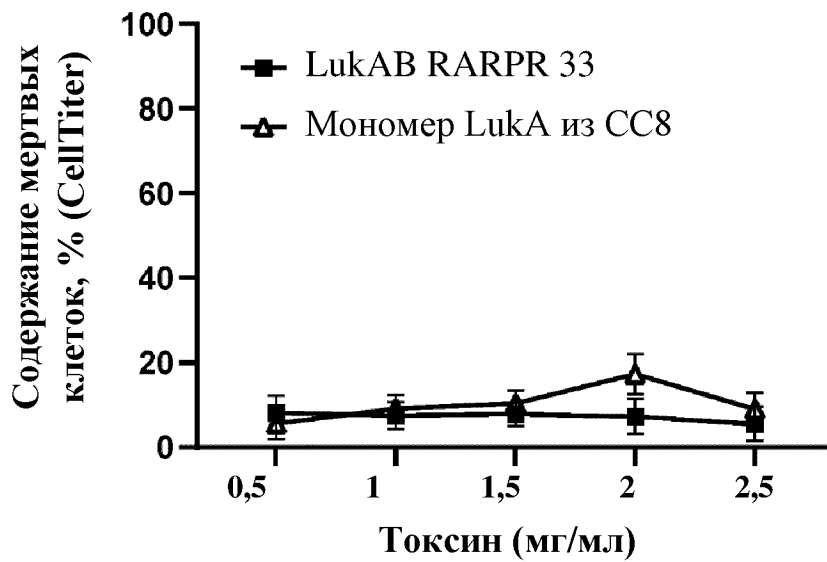
Анализ нейтрализации: содержание мертвых PMN человека, % (ингибирование с помощью LD90 вариантов LukAB+0,5% сыворотки крови от иммунизированных мышей); n=4 донора											
Антиген LukAB, использующийся для иммунизации	Вариант LukAB										
	CC8	CC30	CC45	CC1	CC5	CC398	CC75	ST188	ST109	ST10	ST22A
CC8 delta10C	19,20	65,77	66,31	86,52	42,23	76,84	85,46	79,13	84,89	76,20	75,26
RARPR 30	46,84	15,56	14,27	88,08	66,72	68,45	52,63	84,26	88,95	65,90	16,73
RARPR 31	34,37	87,32	86,47	86,14	59,72	85,14	86,23	67,96	87,03	70,30	87,91
RARPR 32	9,45	83,44	82,39	11,75	2,85	8,76	50,03	2,16	2,19	4,66	87,02
RARPR 33	10,98	54,83	51,44	47,75	4,47	51,89	51,85	7,31	43,18	24,47	76,12
RARPR 34	13,48	72,28	75,09	10,15	5,99	21,47	54,74	4,39	9,09	5,88	84,63
CC8 W97	72,27	80,37	87,69	18,45	60,44	81,25	52,60	58,74	54,93	78,52	84,32
CC45 W97	87,00	72,03	74,38	88,00	87,58	90,84	86,58	85,34	86,90	90,92	82,63
RARPR 31 + CC45 SW97	65,05	79,43	81,49	90,96	84,01	86,00	87,48	83,63	89,68	81,75	85,32
Имитационный контроль	93,59	88,06	90,18	94,58	94,00	90,17	93,48	94,27	94,28	92,16	92,91

ФИГ. 6С

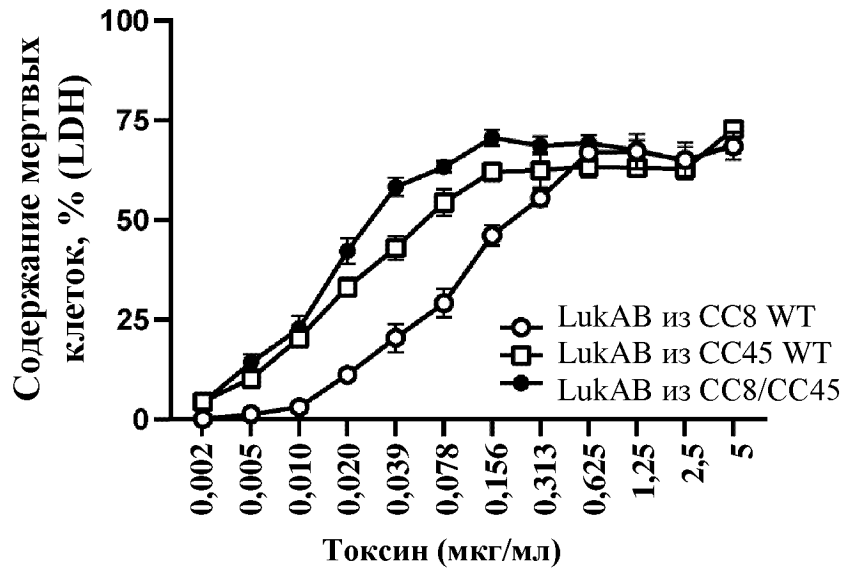


*LukAB из CC8/CC45 протестировали только у 4 доноров

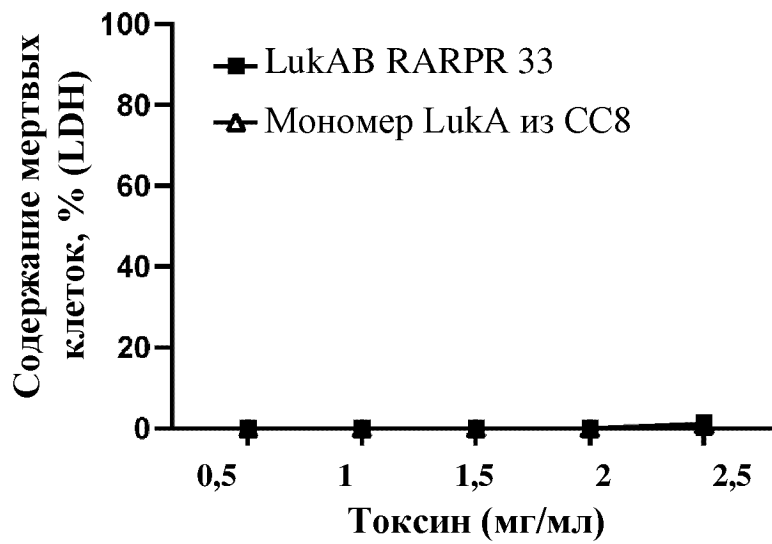
ФИГ. 7А



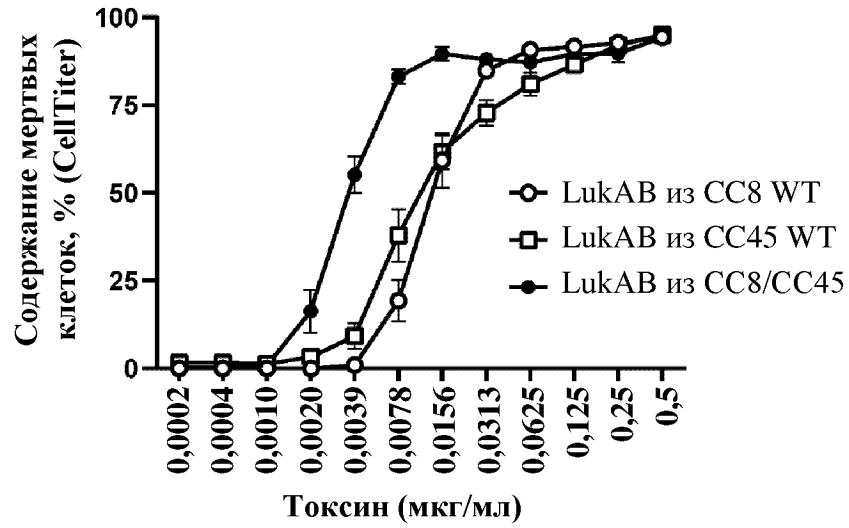
ФИГ. 7В



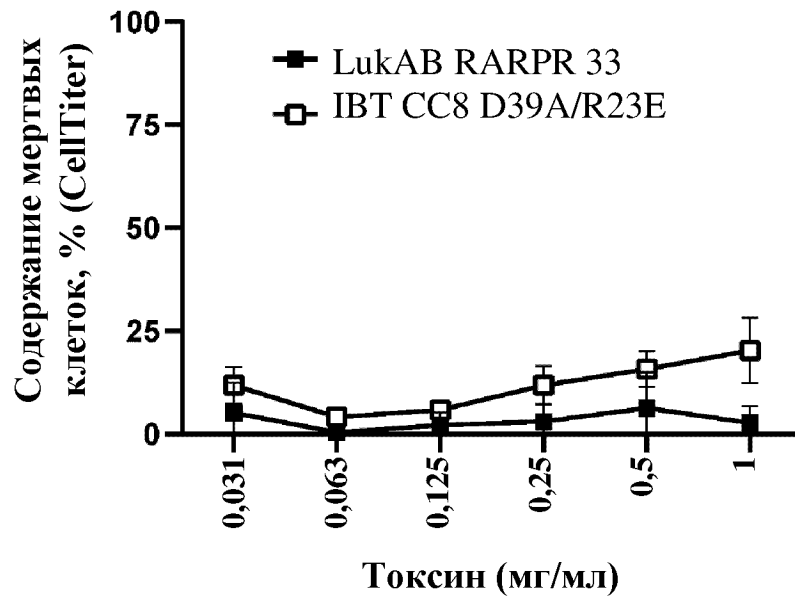
ФИГ. 7С



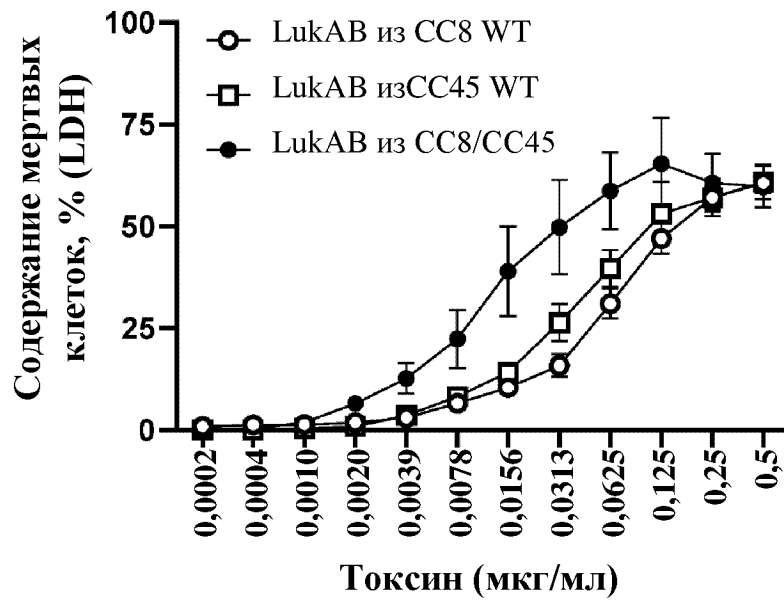
ФИГ. 7D



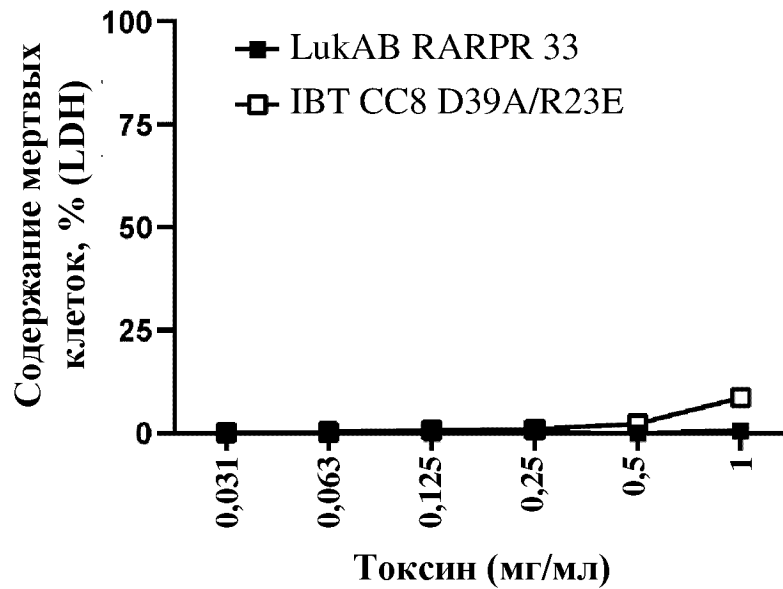
ФИГ. 8А



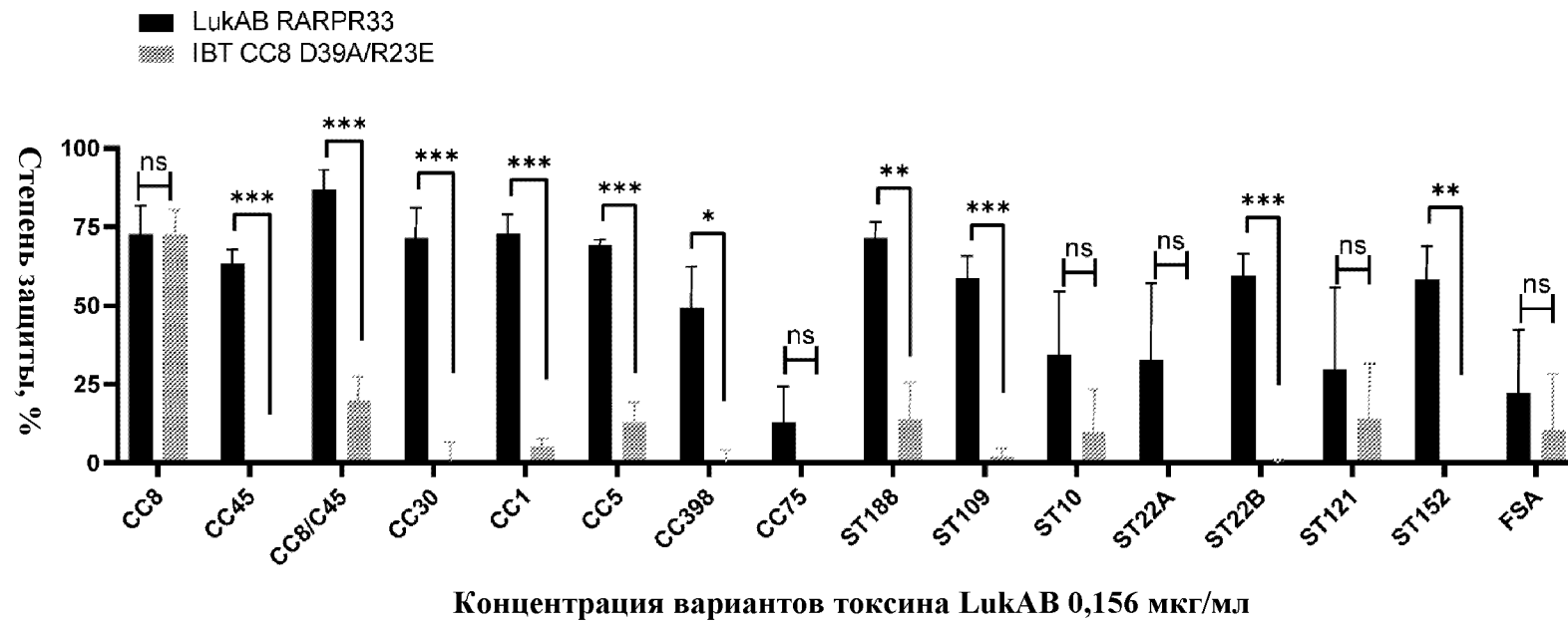
ФИГ. 8В



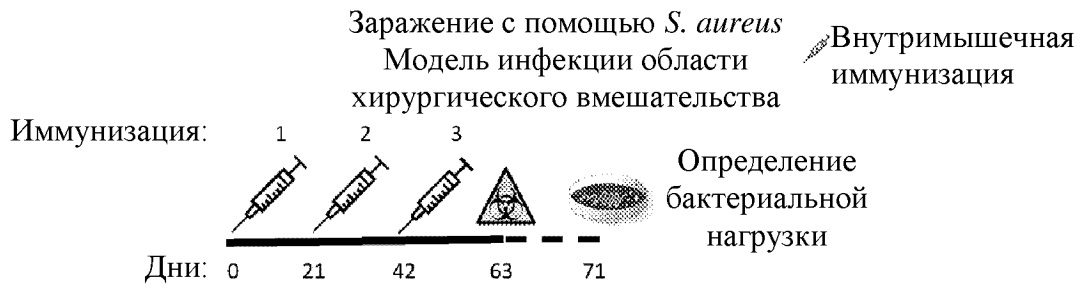
ФИГ. 8С



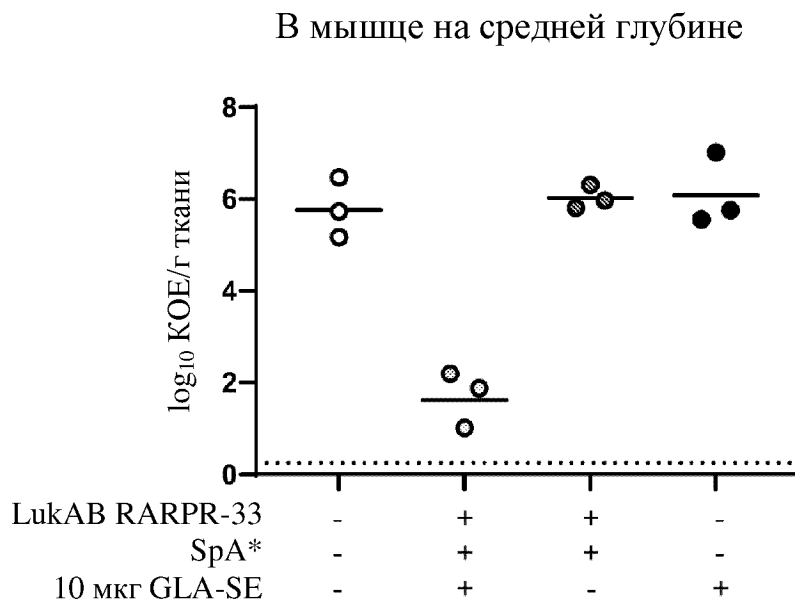
ФИГ. 8D



ФИГ. 9

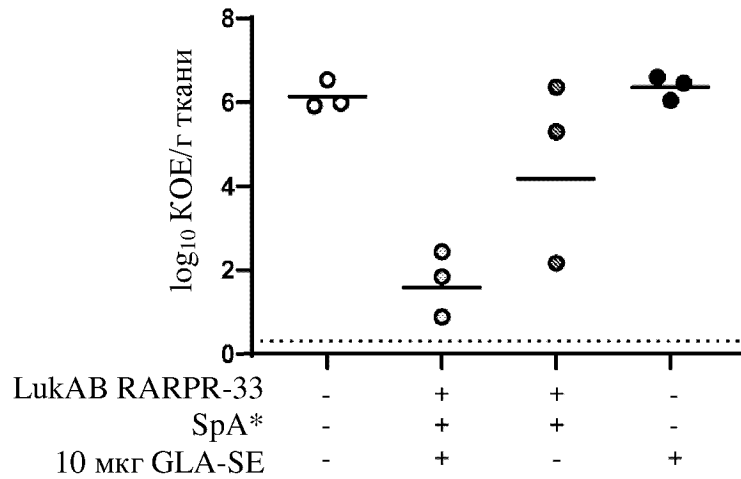


ФИГ. 10

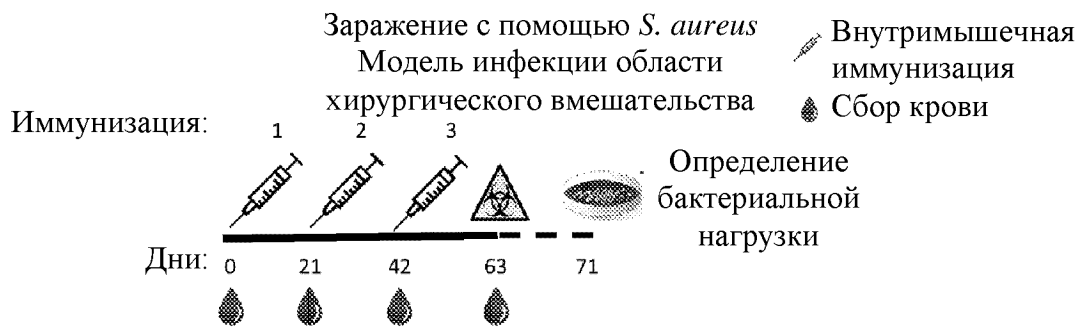


ФИГ. 11А

В мышце на большой глубине

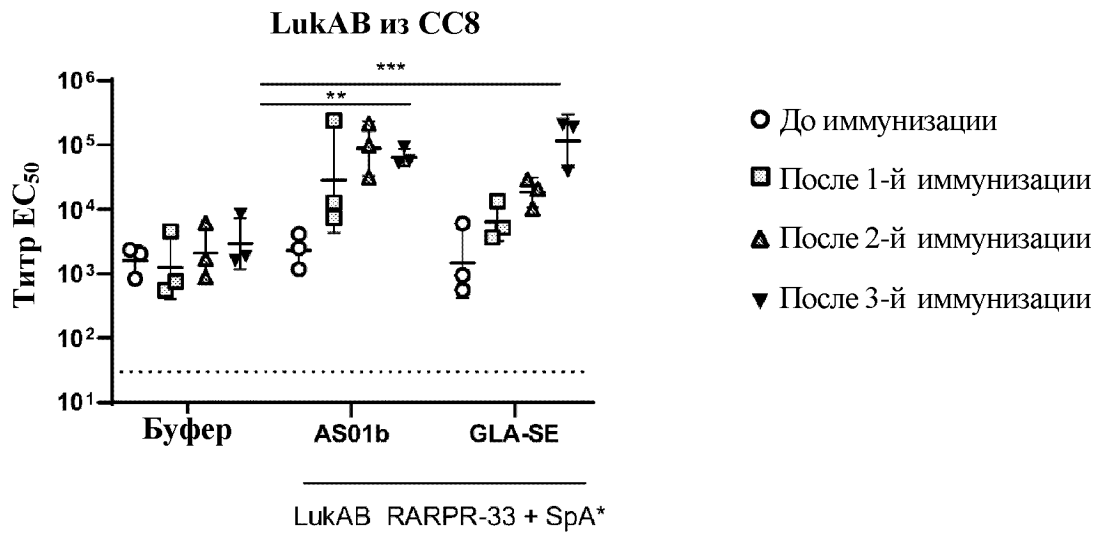


ФИГ. 11В

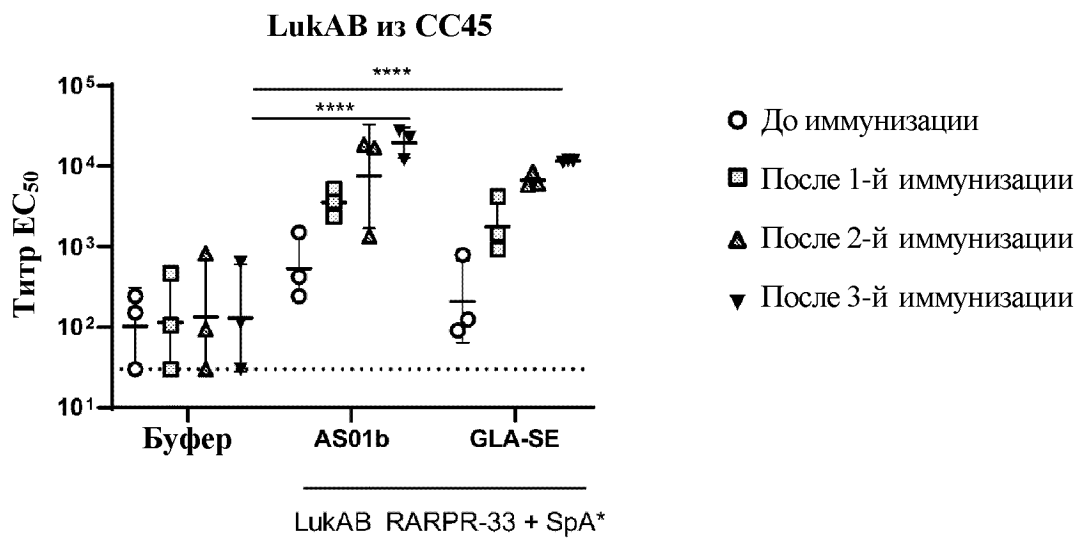


Группа	Антиген 1	Доза (мкг)	Антиген 2	Доза (мкг)	Адъювант	Доза (мкг)	Объем (мкл)
1. N=3	Контроль	-	-	-	-	-	500
2. N=3	RARPR-33	100	SpA*	100	AS01b (MPL, QS-21)	25/25	500
3. N=3	RARPR-33	100	SpA*	100	GLA-SE (2% SE)	10	500

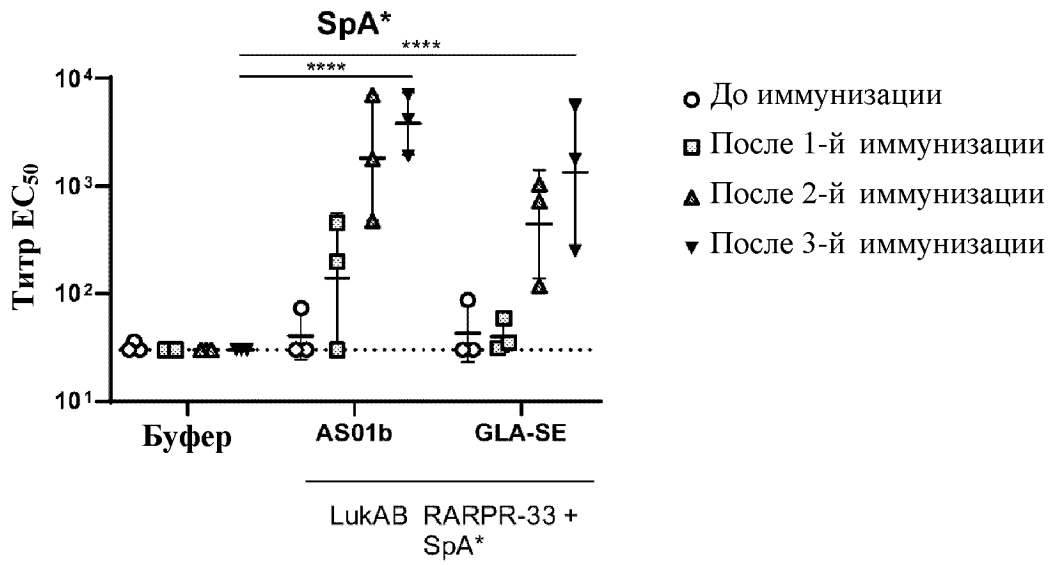
ФИГ. 12



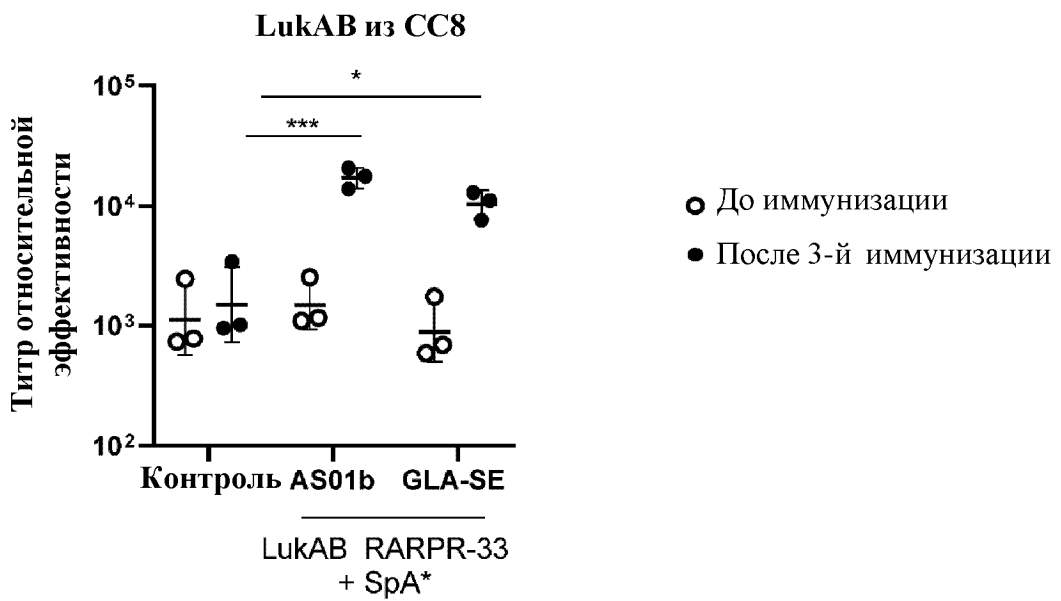
ФИГ. 13А



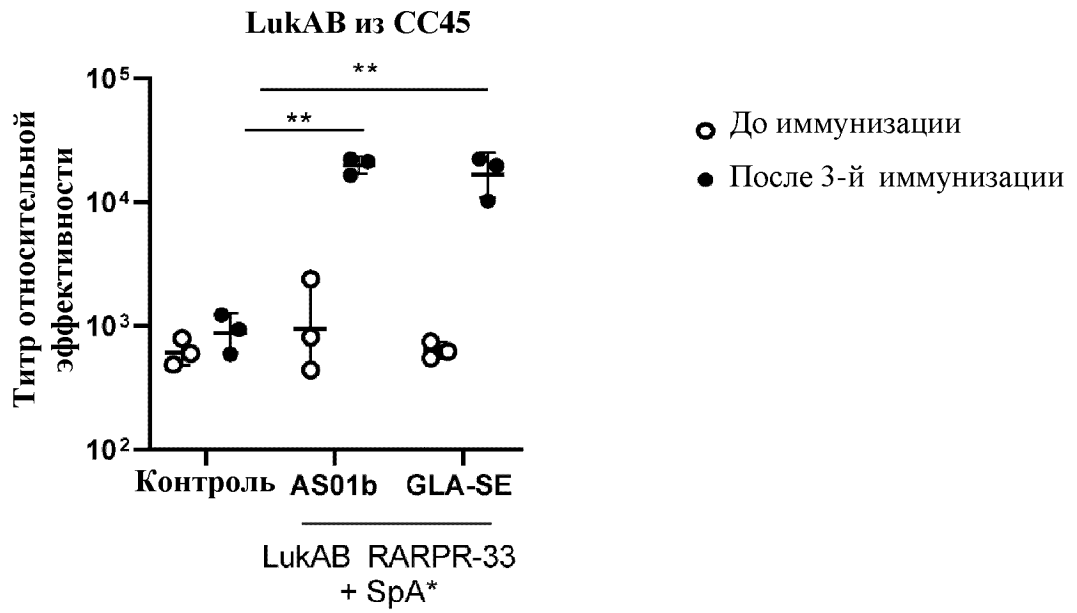
ФИГ. 13В



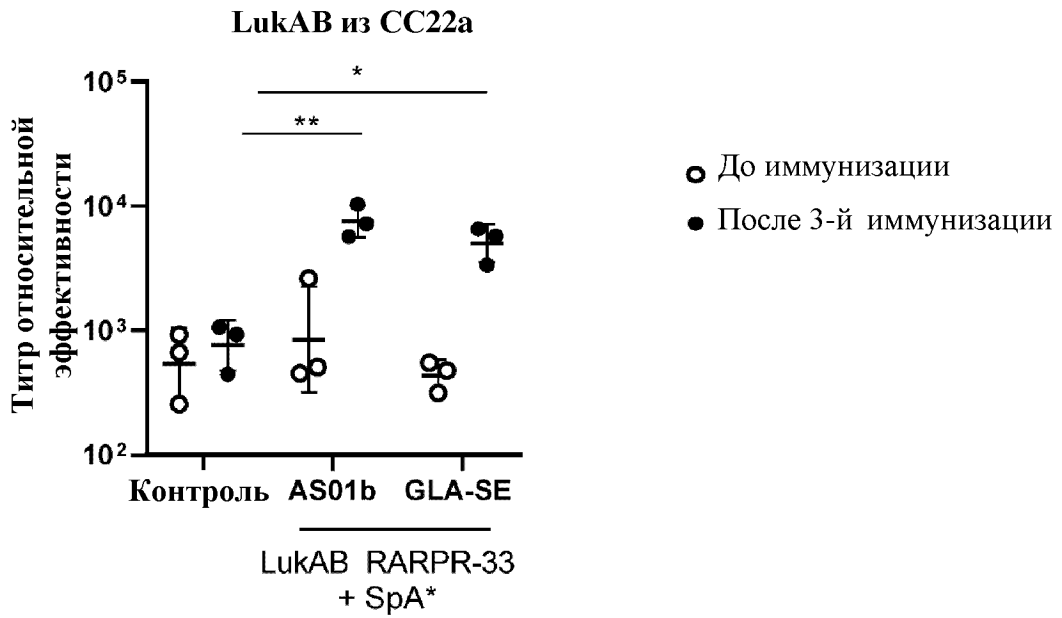
ФИГ. 13С



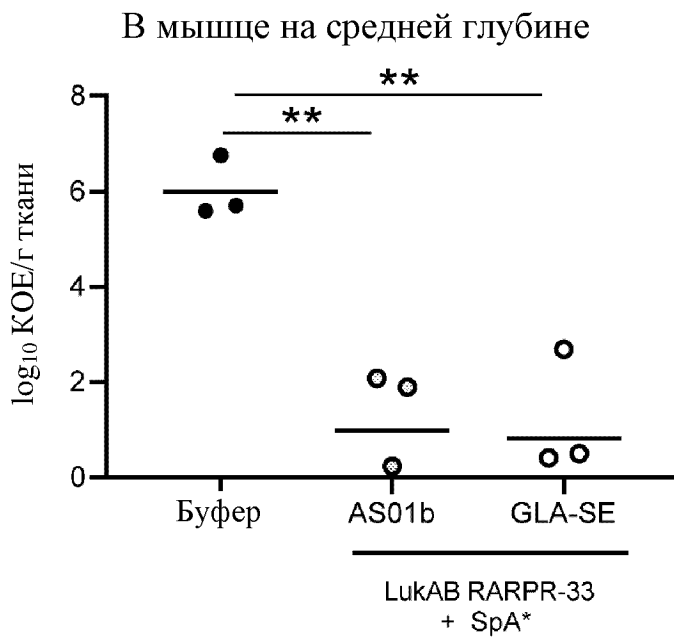
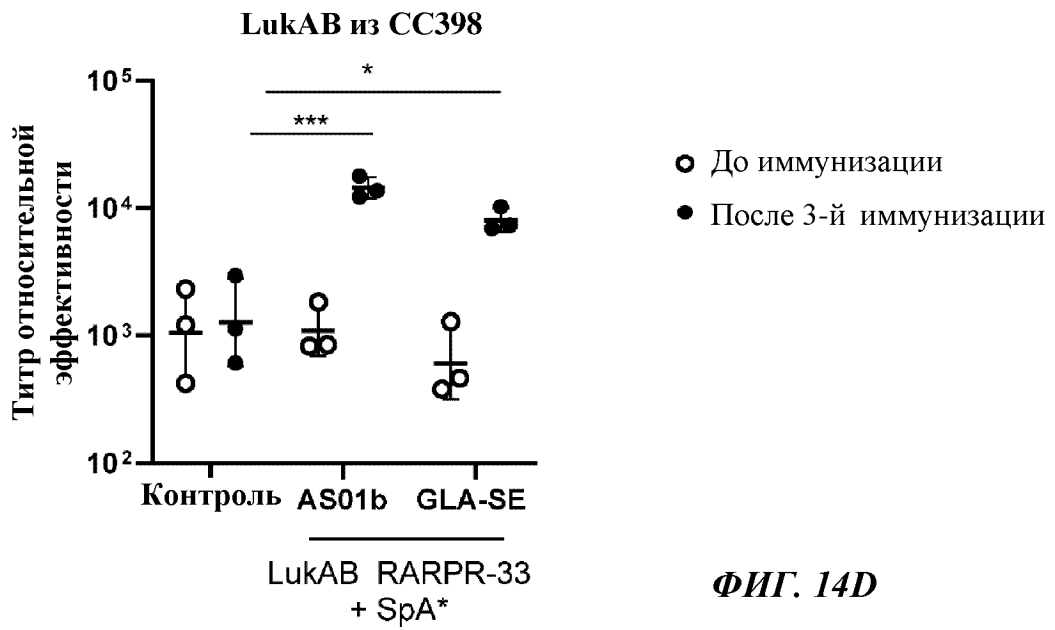
ФИГ. 14А

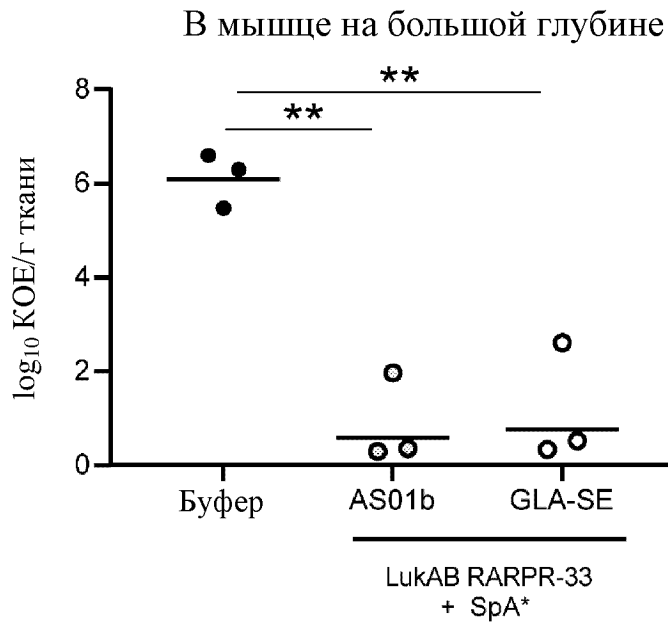


ФИГ. 14В

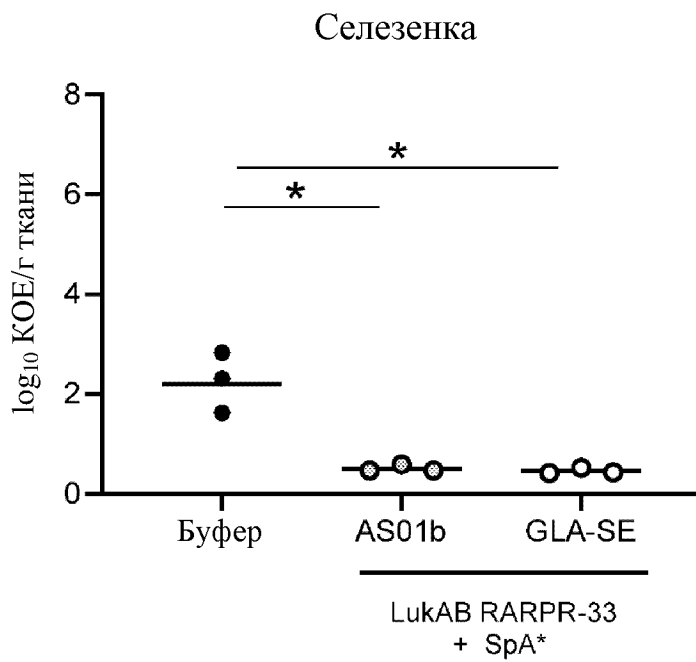


ФИГ. 14С

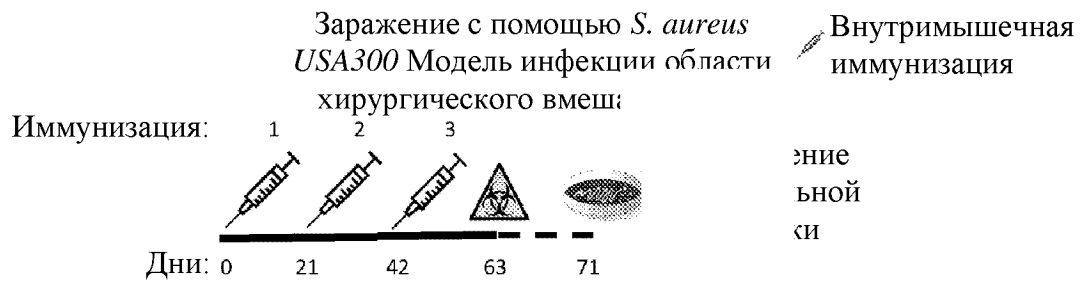




ФИГ. 15В



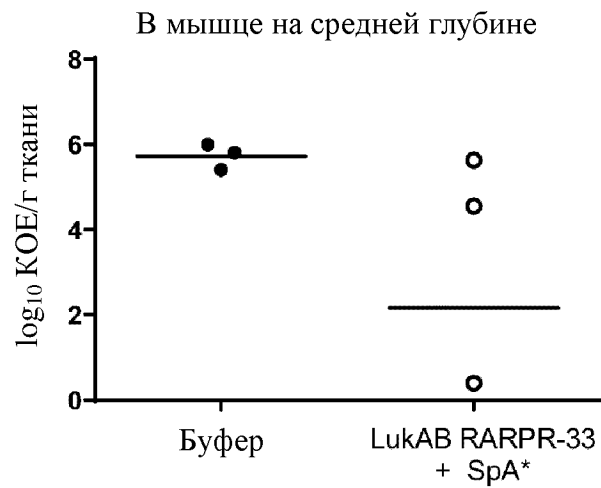
ФИГ. 15С



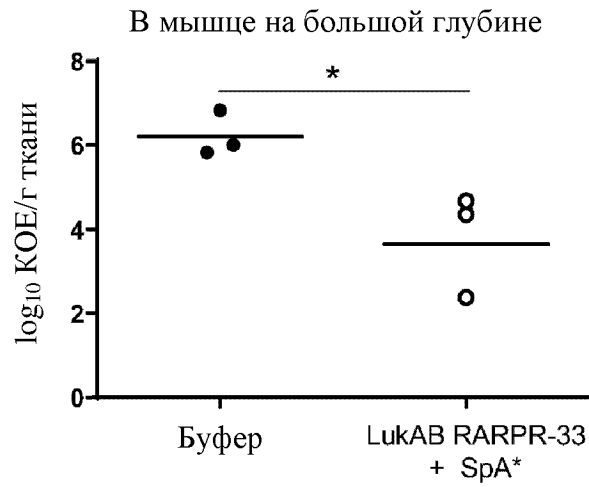
ФИГ. 16А

Группа	Антиген 1	Доза (мкг)	Антиген 2	Доза (мкг)
1. N=3	Буфер	-	-	-
2. N=3	LukAB RARPR-33	100	SpA*	100

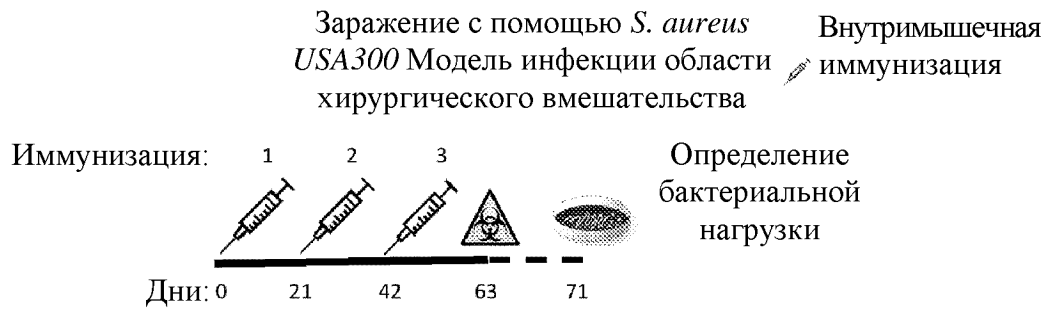
ФИГ. 16В



ФИГ. 16С



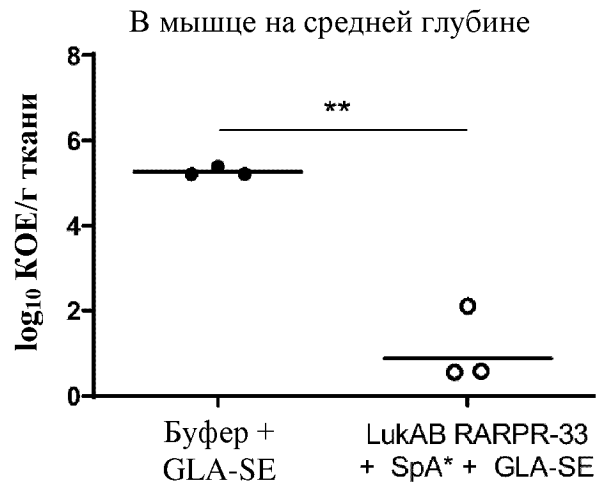
ФИГ. 16D



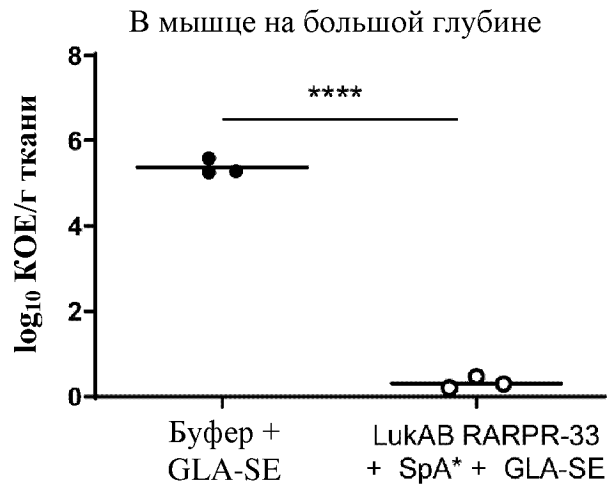
ФИГ. 17A

Группа	Антиген 1	Доза (мкг)	Антиген 2	Доза (мкг)	Альбумин	Доза (мкг)
1. N=3	Буфер	-	-	-	GLA-SE	10 мкг GLA 2% SE
2. N=3	RARPR-33	100	Spa*	100	GLA-SE	10 мкг GLA 2% SE

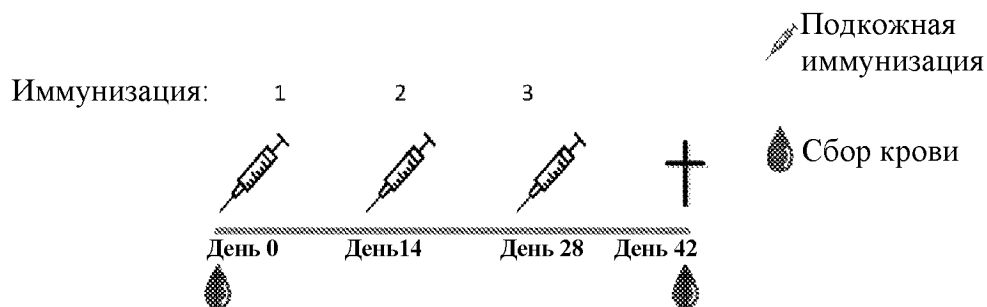
ФИГ. 17B



ФИГ. 17С



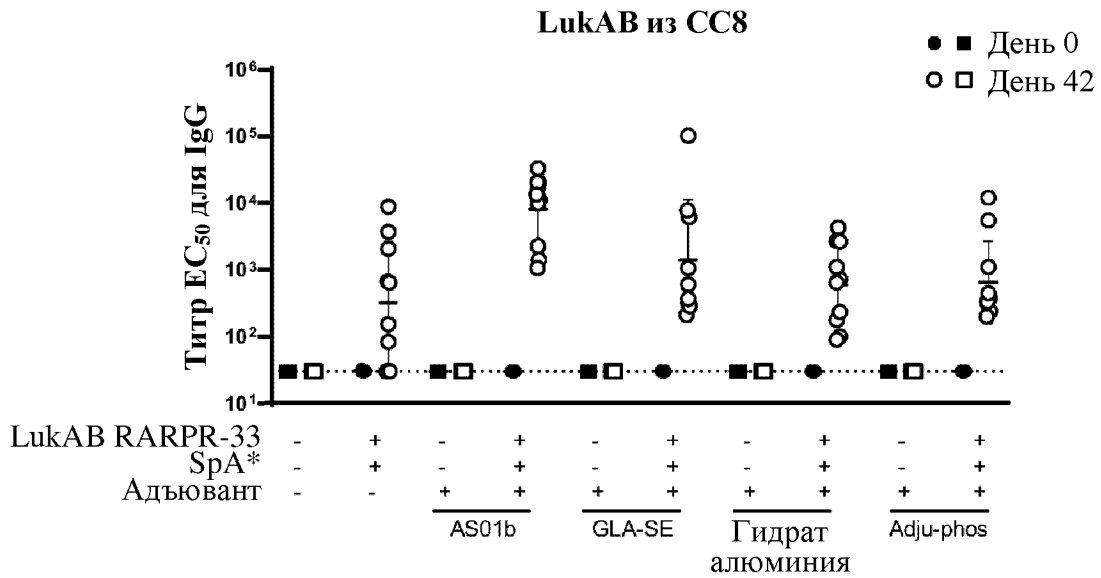
ФИГ. 17D



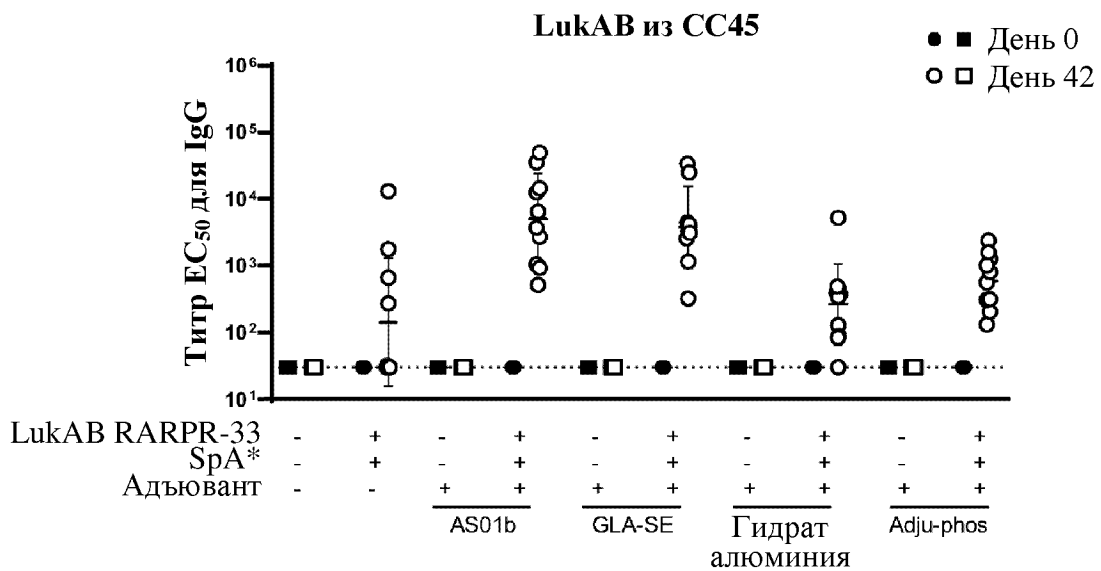
ФИГ. 18А

Группа	Антиген 1	Доза (мкг)	Антиген 2	Доза (мкг)	Адьювант	Доза или объем	Число животных
1.	LukAB His-RARPR-33	5	SpA*	5	AS01b	5 мкг MPL, 5 мкг QS-21	10
2.	LukAB His-RARPR-33	5	SpA*	5	GLA-SE	1 мкг GLA (2%SE)	9
3.	LukAB His-RARPR-33	5	SpA*	5	Гидрат алюминия	50 мкл	10
4.	LukAB His-RARPR-33	5	SpA*	5	Adju-Phos	50 мкл	10
5.	LukAB His-RARPR-33	5	SpA*	5	-	-	10
6.	Буфер	-	-	-	AS01b	5 мкг MPL, 5 мкг QS-21	5
7.	Буфер	-	-	-	GLA-SE	1 мкг GLA (2%SE)	5
8.	Буфер	-	-	-	Гидрат алюминия	50 мкл	5
9.	Буфер	-	-	-	Adju-Phos	50 мкл	5
10.	Буфер	-	-	-	-	-	5

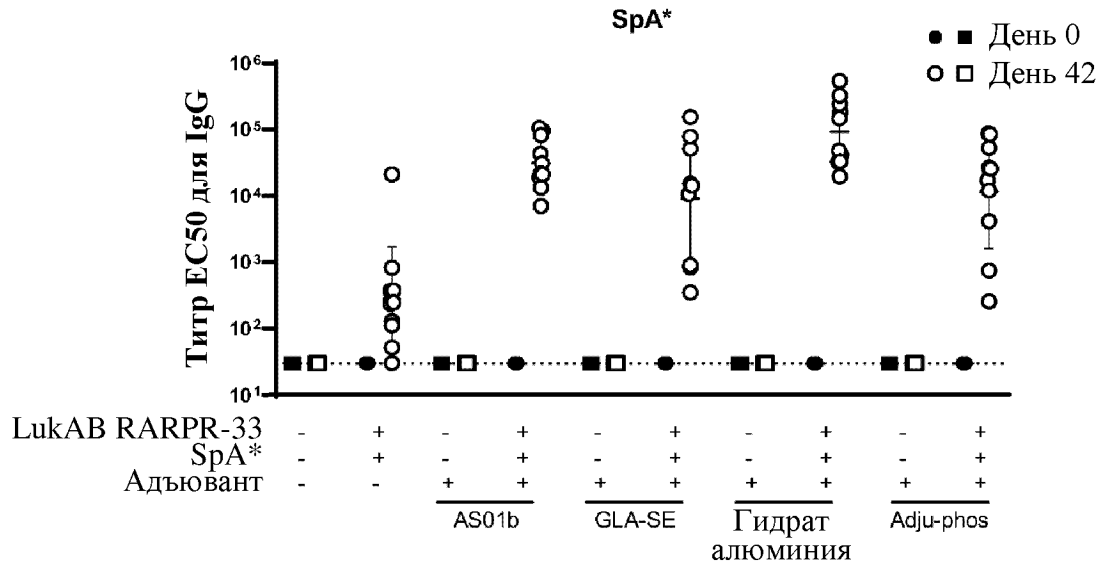
ФИГ. 18В



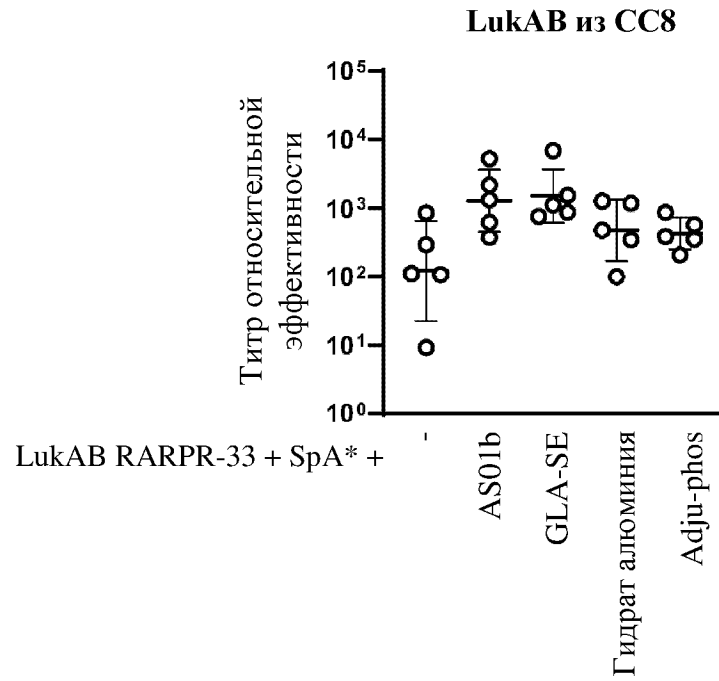
ФИГ. 18С



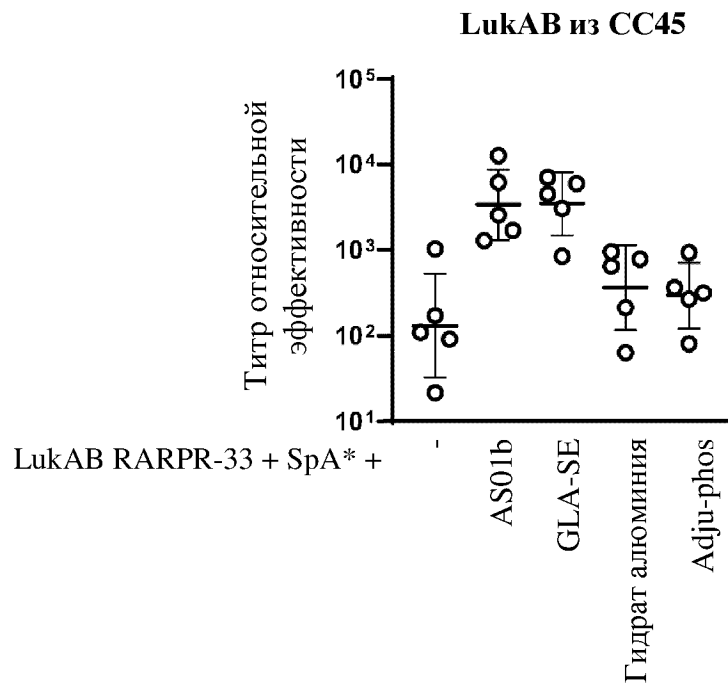
ФИГ. 18D



ФИГ. 18Е



ФИГ. 19А



ФИГ. 19В