

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035513

(13) В1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.06.29

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)

(21) Номер заявки

201391200

(22) Дата подачи заявки

2012.07.20

(54) ВАКЦИНА, СОДЕРЖАЩАЯ БЕЛОК Als3, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ У МЛЕКОПИТАЮЩЕГО АБСЦЕССА КОЖИ, ОБУСЛОВЛЕННОГО STAPHYLOCOCCUS AUREUS

(31) 61/510,896

(56) WO-A2-2007081896

(32) 2011.07.22

US-A1-20030124134

(33) US

FINKS et al. "Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus, Michigan, USA, 2007", June 2009; [online] Available on the internet: <URL: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/6/pdfs/08-1312.pdf, [retrieved 23 October 2012], Especially abstract

(43) 2014.05.30

WO-A1-2010151544

(86) PCT/US2012/000328

WO-A1-2005049081

(87) WO 2013/015831 2013.01.31

US-A1-20090297562

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

US-B1-7241613

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"НоваМедика" (RU); ЛОС-
АНДЖЕЛЕС БИОМЕДИКАЛ
РЕСЕРЧ ИНСТИТУТ ЭТ ХАРБОР-
УКЛА МЕДИКАЛ ЦЕНТЕР (US)

(72) Изобретатель:

Йиман Майкл, Р., Эдвардс Джон, Е.,
Дж., Филлер Скотт, Дж., Ибрагим
Ашраф, С., Фу Юэ, Хеннеси Джон, П.,
Дж. (US)

(74) Представитель:

Ловцов С.В., Левчук Д.В. (RU)

B1

035513

(57) Изобретение относится к вакцине, содержащей белок Als3, для лечения у млекопитающего абсцесса кожи, обусловленного Staphylococcus aureus, причем белок Als3 может быть конъюгирован с носителем. Вакцина может содержать иммуностимулирующий адьювант или антибиотик. Также заявлена дозированная форма вакцины в объеме 0,5 мл в фосфатном буферном физрастворе, pH 7.

035513
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка притязает на приоритет предварительной заявки США № 61/510,896, по данной 22 июля 2011 г., которая включена в настоящий документ путем ссылки.

Заявление об исследовании, спонсированном федеральным правительством

Настоящее изобретение было спонсировано за счет гранта № W81XWH-10-2-0035 Министерства обороны, присужденного Службой по закупкам медицинских исследований Вооруженными силами США, 820 Чэндлер Стрит, Форт-Детрик MD 21702-5014, которая также выступает в качестве ведомства управления закупками. Содержание раскрытоей здесь информации необязательно отражает позицию или политику Правительства, и никакое официальное подтверждение не должно предполагаться. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Предпосылки для создания изобретения

Изобретение относится к вакцинам против золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*).

Staphylococcus aureus является ведущей причиной кожных инфекций, включая целлюлит и фурункулез, и входит в число самых распространенных причин бактериемии. Штаммы *S. aureus*, которые проявляют фенотип, стойкий к метициллину (MRSA), являются основными причинами медицинских и общественных инфекций, включая инвазивное заболевание иммунокомпетентных клеток хозяев, подавление иммунной реакции (например, нейтропения, трансплантаты твердого органа или костного мозга) и наследственные дисфункции иммунной системы, проявляющие возвратную кожную инфекцию (например, синдром Джобса, хроническое грануломатозное заболевание). Значительно влияние MRSA на здоровье общества представляет особую озабоченность в свете высоких показателей смертности, связанных с инвазивным заболеванием *S. aureus* даже при соответствующей противомикробной терапии (например, 15-40% при бактериемии и эндокардите). Увеличение числа случаев угрожающих жизни инфекций и снижение восприимчивости к антибиотикам требуют разработки эффективной вакцины, нацеленной на *Staphylococcus aureus*. Настоящее изобретение выполняет это требование.

Раскрытие изобретения

В общем, изобретение относится к вакцине для лечения у млекопитающего абсцесса кожи, обусловленного *Staphylococcus aureus*, содержащей выделенный белок 3 (Als3p) агглютинино-подобной последовательности (Als), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления полипептид включает N-концевой домен Als3p *Candida albicans* или его иммуногенный фрагмент. Раскрытая здесь вакцина особенно подходит для лечения млекопитающего от абсцесса кожи, вызванного стойким к метициллину штамма *Staphylococcus aureus* (MRSA). Раскрытая здесь вакцина также подходит для лечения млекопитающего от абсцесса кожи, вызванного другими стойкими к лекарствам штаммов *S. aureus* (например, стойкими к ванкомицину, стойкими к даптомицину и т.д.) или чувствительными к метициллину штаммами *S. aureus* (MSSA). В других вариантах осуществления выделенный белок Als3p конъюгирован с носителем, представляющим собой гемоцианин фиссуреллы (KLH), CRM197, токсOID столбняка, токсOID дифтерии, фрагменты энтеротоксина B или белковый комплекс наружной мембранны N. meningitidis. Такие носители также могут включать фаг, дрожжи, вирус, вироносную или рекомбинантную вирусоподобную частицу. Вакцину обычно вводят внутримышечно, подкожно, внутрикожно, перорально или сублингвально, или же назначают для ингаляции в форме микрочастиц. По желанию, вакцину вводят как бустер-дозу. По выбору, вакцина может включать иммуностимулирующий адьювант. В других вариантах осуществления вакцина дополнительно содержит антибиотик против *S. aureus*. Например, антибиотик может быть объединен в одной форме с вакциной.

В еще одном аспекте изобретение предлагает вакцину для лечения у млекопитающего (например, человека или млекопитающего, не относящегося к человеческому роду или млекопитающего, не относящегося к человеческому роду, такого как домашний скот, например корова, лошадь, свинья или овца, или домашнее млекопитающее, например собака или кошка) против *Staphylococcus aureus*, включающий этапы: а) идентификации млекопитающего с риском развития инфекции *Staphylococcus aureus* на коже или мягкой ткани и б) введения упомянутому млекопитающему эффективного количества вакцины, включающей полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), кодирующий полипептид, включающий Als3p, или его иммуногенный фрагмент, введенный в подходящую среду доставки, которая может включать одно- или двухнитевую ДНК или РНК, плазмид или вирусный вектор двухнитевой ДНК, в фармацевтически приемлемой среде, при этом полинуклеотид экспрессируют *in vivo*, и млекопитающее генерирует иммунную реакцию. Вакцина, содержащая полинуклеотид, активирует иммунную реакцию у млекопитающего, например продуцирование антител к Als3p, которые проявляют специфичность к Als3p.

В еще одном аспекте изобретение предлагает выделенный белок Als3 или его иммуногенный фрагмент для использования в способе лечения или профилактики инфекции *Staphylococcus aureus* на коже или мягкой ткани у млекопитающего.

В еще одном аспекте изобретение предлагает вакцину, содержащую выделенный белок Als3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, для лечения у млекопитающего абсцесса кожи, содержащего *Staphylococcus aureus*.

В еще одном аспекте изобретение предлагает выделенный белок Als3, имеющий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 2.

В еще одном аспекте изобретение предлагает вакцину, включающую выделенный белок Als3, причем аминокислотная последовательность выделенного белка Als3 представлена в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления этот белок конъюгирован с носителем, таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH), CRM197, токсOID столбняка, токсOID дифтерии, фрагменты энтеротоксина B или белковый комплекс наружной мембранны N. meningitidis. Такие носители также могут включать фаг, дрожжи, вирус, виросому или рекомбинантную вирусоподобную частицу. Вакцину обычно вводят внутримышечно, подкожно, внутрикожно, перорально или сублингвально, или в форме для ингаляции в виде микрочастиц. Вакцина, по выбору, может включать иммуностимулирующий адьювант.

В настоящем документе выражения "инфекция *Staphylococcus aureus* на коже или мягкой ткани", "инфекция *Staphylococcus aureus* на структуре кожа/кожа" используются взаимозаменяющими и относятся к абсцессу кожи, являющемуся результатом поступления в организм *S. aureus* в месте, где кожа нарушена порезом, ссадиной, укусом или другой раной. В некоторых случаях абсцесс кожи, обусловленный *S. aureus*, является результатом *S. aureus*, живущего в организме, и может происходить спонтанно при отсутствии видимого места травмы или раны на коже. Такие инфекции могут влиять на слои кожи или более глубокие ткани, такие как мышечные и соединительные ткани (переплетающийся каркас ткани, который формирует связки, сухожилия и другие опорные структуры тела). Абсцессы кожи также могут появляться в тех областях кожи, где организм борется с инфекцией *S. aureus*. Более важными штаммами *S. aureus*, ответственными за инфекции на коже или мягкой ткани, является стойкий к антибиотикам *Staphylococcus*, известный как стойкий к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA); стойкие к ванкомицину и даптомицину штаммы *S. aureus* также могут вызывать инфекцию на структуре кожа/кожа. MRSA стойкий к обычным антибиотикам. Инфекция *Staphylococcus aureus* на структурах кожа/кожа также может быть вызвана чувствительным к метициллину *Staphylococcus aureus* (MSSA).

Млекопитающие с риском развития абсцесса кожи, обусловленного *S. aureus*, могут быть вылечены в профилактическом режиме. Описанная здесь вакцинация будет снижать тяжесть, задерживать или препятствовать развитию симптомов. Млекопитающие имеют повышенный риск инфекции, если они госпитализированы или длительное время находятся в лечебном заведении, получают лечение антибиотиками или имеют иммунодефицит, включая детей с ВИЧ/СПИД или другими заболеваниями, которые ухудшают иммунную функцию, пациентов, имеющих частые контакты с системой здравоохранения, имеющих хроническое заболевание, другими липосомами, известными в данной области, такими как липосома нуклеиновой кислоты (например, которая описана в опубликованной Международной заявке № WO 93/24640), или полинуклеотид может быть связан с адьювантом. Липосомы, включающие катионные липиды, спонтанно и быстро реагируют с полианионами, такими как ДНК и РНК, результатом чего являются комплексы липосомы/нуклеиновой кислоты, которые захватывают до 100% полинуклеотида. Помимо этого, эти поликатионные комплексы сливаются с клеточными мембранами, что приводит к доставке в клетки полинуклеотида, который обходит разрушающие ферменты липосомного компартмента. В опубликованной Международной заявке № WO 94/27435 описаны композиции для генетической иммунизации, включающие катионные липиды и полинуклеотиды. Предпочтительно можно использовать агенты, которые способствуют клеточному приему полинуклеотидов, такие как ионы кальция, вирусные белки, агенты, способствующие электропорации и трансфекции. Жидкие, а также лиофилизированные формы, которые должны быть восстановлены, предпочтительно включают буферы в количествах, необходимых для подходящей регулировки pH раствора для инъекций.

В настоящем документе выражения "инфекция *Staphylococcus aureus* на коже или мягкой ткани", "инфекция *Staphylococcus aureus* на структуре кожа/кожа" используются взаимозаменяющими и относятся к инфекции на коже или мягкой ткани (например, целлюлиту, абсцессу мягкой ткани, дермонекрозу, миозиту или другим инфекциям), являющейся результатом поступления в организм *S. aureus* в месте, где кожа нарушена порезом, ссадиной, укусом или другой раной. В некоторых случаях инфекция *S. aureus* на структуре кожа/кожа является результатом *S. aureus*, живущего в организме, и может происходить спонтанно при отсутствии видимого места травмы или раны на коже. Такие инфекции могут влиять на слои кожи или более глубокие ткани, такие как мышечные и соединительные ткани (переплетающийся каркас ткани, который формирует связки, сухожилия и другие опорные структуры тела). Абсцессы кожи также могут появляться в тех областях кожи, где организм борется с инфекцией *S. aureus*. Более важными штаммами *S. aureus*, ответственными за инфекции на коже или мягкой ткани, является стойкий к антибиотикам *Staphylococcus*, известный как стойкий к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA); стойкие к ванкомицину и даптомицину штаммы *S. aureus* также могут вызывать инфекцию на структуре кожа/кожа. MRSA стойкий к обычным антибиотикам. Инфекция *Staphylococcus aureus* на структурах кожа/кожа также может быть вызвана чувствительным к метициллину *Staphylococcus aureus* (MSSA).

Млекопитающие с риском развития инфекции *S. aureus* на коже или мягкой ткани могут быть вылечены в профилактическом режиме. Альтернативно, млекопитающие могут получать лечение при присутствии симптомов инфекции *S. aureus* на коже или мягкой ткани. Описанная здесь вакцинация будет снижать тяжесть, задерживать или препятствовать развитию симптомов. Млекопитающие имеют повышенный риск инфекции, если они госпитализированы или длительное время находятся в лечебном заведении.

нии, получают лечение антибиотиками или имеют иммунодефицит, включая детей с ВИЧ/СПИД или другими заболеваниями, которые ухудшают иммунную функцию, пациентов, имеющих частые контакты с системой здравоохранения, имеющих хроническое заболевание, такое как диабет, рак, ВИЧ/СПИД, являющихся очень молодыми или очень старыми, часто использующими антибиотики, имеющих открытую рану, дерматит или поражения кожи, плохо питающиеся или плохо соблюдающих гигиену. Другие млекопитающие с риском включают проживающих в стесненных бытовых условиях военнослужащих, особенно в действующей армии, спортсменов и заключенных. Также риску развития инфекции *S. aureus* на коже или мягкой ткани подвержены те лица, которые раньше имели такие инфекции, или пациенты, которым назначены или проведена хирургическая или инвазивная медицинская операция.

Под "Als3p" понимается белок, имеющий аминокислотную последовательность, показанную на фиг. 1A, например, SEQ ID NO: 2.

Под "Als3p-фрагментом" или "фрагментом Als3p" понимается часть полипептида Als3p, содержащая меньше чем 1050, 1025, 1000, 975, 950 или 945 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагменты Als3p имеют в длину 300-350 или 250-500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет в длину меньше чем 1050, 1025, 1000, 975, 950 или 945, 940, 937, 936, 935, 934, 933, 932, 931 или 930, 920, 910, 900, 890, 880, 870, 860, 850, 840, 830, 820, 810, 800, 790, 780, 770, 760, 750, 740, 730, 720, 710, 700, 690, 680, 670, 660, 650, 640, 630, 620, 610, 600, 590, 580, 570, 560, 550, 540, 530, 520, 510, 500, 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 400, 390, 380, 370, 360, 350, 340, 330, 320, 310, 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 или 10 аминокислот и в некоторых случаях является иммуногенным.

Одним примером фрагмента Als3p является SEQ ID NO: 2, которая показана на фиг. 1A.

Помимо этого, фрагменты Als3p, например, могут содержать одну или несколько консервативных замен аминокислот в последовательности, показанной на фиг. 1A, например SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Другие желательные фрагменты Als3p содержат одну или несколько консервативных замен аминокислот в последовательности, показанной на фиг. 1A, например SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и/или по меньшей мере одну flankирующую аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 flankирующих аминокислот) на N- и/или C-конце последовательности, показанной на фиг. 1A, например SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Другие предпочтительные фрагменты Als3p содержат семь или больше непрерывных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 2, показанной на фиг. 1A.

Неограничивающие примеры фрагмента Als3p включают 1-40, 10-50, 20-60, 30-70, 40-80, 50-90, 60-100, 70-110, 80-120, 90-130, 100-140, 110-150, 120-160, 130-170, 140-180, 150-190, 160-200, 170-210, 180-220, 190-230, 200-240, 210-250, 220-260, 230-270, 240-280, 250-290, и 260-300, 270-310, 280-320 и 290-331 аминокислот последовательности, показанной на фиг. 1A, например SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2; и эти фрагменты имеют один или несколько из следующих признаков: одну или несколько консервативных замен аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 консервативных замен аминокислот) в последовательности, показанной на фиг. 1A, например SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2; одну или несколько аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 аминокислот), отсеченных от N- и/или C-конца последовательности, показанной на фиг. 1A, например SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2; и по меньшей мере одну flankирующую аминокислоту (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 flankирующих аминокислот) на N- и/или C-конце последовательности, показанной на фиг. 1A, например SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Под "по существу идентичной" понимается аминокислотная последовательность или нуклеинокислотная последовательность, которая имеет по меньшей мере 50% идентичность с контрольной последовательностью. Такая последовательность обычно по меньшей мере, например, на 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична контрольной последовательности на уровне аминокислот или уровне нуклеиновых кислот. В общем, для полипептидов длина последовательностей сравнения может составлять по меньшей мере пять аминокислот, например 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 или больше аминокислот, вплоть до полной длины полипептида. Для нуклеиновых кислот длина последовательностей сравнения обычно может составлять меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или больше нуклеотидов, вплоть до полной длины молекулы нуклеиновой кислоты. При этом понимается, что для целей определения идентичности последовательности при сравнении последовательности ДНК с последовательностью РНК нуклеотид тимин эквивалентен нуклеотиду урацилу.

Также рассматриваются нуклеинокислотные последовательности, которые кодируют выделенный белок Als3p или его фрагмент, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2, упомянутый в настоящем документе.

В том смысле, как это здесь используется, когда полипептидная или нуклеинокислотная последовательность упоминается как имеющая "по меньшей мере X% идентичности последовательности" с контрольной последовательностью, под этим понимается, что по меньшей мере X% аминокислот или нуклеотидов в полипептиде или нуклеиновой кислоте идентичны таковым в контрольной последовательности, когда такие последовательности оптимально выровнены. Оптимальное выравнивание последовательностей можно определить разными способами, которые известны в данной области, например, ис-

пользуя алгоритм выравнивания Смита-Уотермана (Smith et al., J. Mol. Biol. 147:195-7, 1981) и компьютерные программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990). Эти и другие алгоритмы выравнивания доступны посредством использования общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как "Best Fit" (Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics, 482-489, 1981), которое включено в GeneMatcher PlusTM (Schwarz and Dayhof, Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhoff, M.O., Ed p. 353-358, 1979), BLAST, BLAST-2, BLAST-P, BLAST-N, BLAST-X, WU-BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL или Megalign (DNASTAR). Помимо этого, специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения оптимального выравнивания по длине сравниваемых последовательностей.

Под "адьювантом" понимается одно или несколько веществ, которые вызывают стимуляцию иммунной системы. В этом контексте адьюvant используют для усиления иммунной реакции на один или несколько антигенов или антител вакцины. Адьювант может быть введен пациенту до, вместе или после введения вакцины или антитела. Примеры химических соединений, используемых в качестве адьювантов, включают, но без ограничения, соединения алюминия (например, квасцы, Альгидрогель), масла, блок-полимеры, комплексы, стимулирующие иммунную систему, витамины и минералы (например, витамин Е, витамин А, селен и витамин B12), Quil A (сапонины), компоненты клеточных стенок бактерий и грибков (например, липополисахариды, липопротеины и гликопротеины), гормоны, цитокины и кости-стимулирующие факторы.

Под "носителем" в контексте конъюгата понимается доля или частица, например KLH, CRM197, токсоида столбняка, токсоида дифтерии, фрагментов энтеротоксина В или белкового комплекса наружной мембранны N. meningitidis, которая подходит для связи с описанным здесь белком или его отображением.

Под "конъюгатом" понимается соединение, которое включает белок изобретения, конъюгированный с другой долей или частицей, например с KLH, CRM197, токсоидом столбняка, токсоидом дифтерии, фрагментами энтеротоксина В или белковым комплексом наружной мембранны N. meningitidis.

Под "иммуногенным" понимается любое вещество, которое способно индуцировать иммунную реакцию у пациента.

Под "иммуногенным количеством" в контексте вакцины понимается количество вакцины, требуемое для индукции иммунной реакции у пациента клинически релевантным способом. Иммуногенное количество вакцины, используемое при осуществлении на практике способов вакцинации, которые здесь описаны, изменяется в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего здоровья пациента. В конечном счете, решение по подходящему количеству и режиму дозировки принимает врач, выписывающий вакцину.

Под "выделенным" или "очищенным" понимается отделенное от других естественно сопровождающих компонентов. Обычно соединение (например, нуклеиновая кислота, полипептид, антитело или небольшая молекула), по существу, выделено, если оно по меньшей мере на 60 мас.% свободно от белков и/или встречающихся в природе органических молекул, с которыми оно естественно связано. Это определение также распространяется, например, на полипептид или молекулу нуклеиновой кислоты, выделенную из ее flankирующих последовательностей (например, для аминокислотной последовательности "выделенная" относится к последовательности, которая свободна от flankирующих аминокислот, с которыми эта последовательность естественно связана в полипептиде). В некоторых случаях соединение выделено по меньшей мере на 75, более предпочтительно по меньшей мере на 90 и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99 мас.%. Выделенное соединение, например полипептид, может быть получено стандартными способами, например экстракцией из натурального источника (например, очищение из клетки, инфицированной Candida); экспрессией рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующими Als3p, фрагмент или вариант Als3p или его составной белок, в любой стандартной системе экспрессии, включающей, но без ограничения, E. coli или Saccharomyces cerevisiae, или химическим синтезом полипептида. Чистота может быть измерена любым подходящим способом, например колоночной хроматографией, электрофорезом на поликарбонатном геле или анализом ЖХВР.

Под "связанным с" или "конъюгированным с" в контексте конъюгата понимается ковалентное или не ковалентное взаимодействие между полипептидом и носителем или сливающимся объектом. Не ковалентные взаимодействия включают, но без ограничения, водородную связь, ионные взаимодействия между заряженными группами, электростатическое связывание, ванн-дер-ваальсовы взаимодействия, гидрофобные взаимодействия между неполярными группами, липофобные взаимодействия и притяжения, основанные на LogP.

Термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяющими и относятся к любой цепи из двух и больше натуральных или ненатуральных аминокислот, независимо от посттрансляционной модификации (например, гликозилирования или фосфорилирования), составляющей весь или часть встречающегося в природе или не встречающегося в природе полипептида или пептида, который описан в настоящем документе.

Термины "фармацевтически приемлемый носитель" и "фармацевтически приемлемый наполнитель"

используются взаимозаменяющими и означают носитель или наполнитель, который физиологически приемлем для млекопитающего, получающего лечение, при сохранении терапевтических свойств соединения, с которым его вводят. Одним примером вещества фармацевтически приемлемого носителя является физиологический раствор. Другие физиологически приемлемые носители и их составы известны специалистам в данной области и описаны, например, в Фармацевтике Ремингтона (21-е изд.), под ред. Э. Геннаро, 2005, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, штат Пенсильвания.

Под "фармацевтической композицией" понимается композиция, содержащая полипептид, коньюгат, вакцину или антитело изобретения, вместе с фармацевтически приемлемым наполнителем, которая производится и продается с одобрения государственного регулирующего органа как часть терапевтического режима для лечения или профилактики заболевания или события у млекопитающего. Фармацевтические композиции могут иметь форму, например, для внутривенного введения (например, стерильный раствор, свободный от закупоривающих частиц и в системе растворителя, подходящей для внутривенного применения), для перорального введения (например, таблетка, капсула, овальная таблетка, желатиновая капсула или сироп) или любую другую форму, описанную в настоящем документе, например форму разовых доз.

Под "лечением" понимается медицинский уход за млекопитающим, например человеком или млекопитающим, не относящимся к человеческому роду, с намерением излечить, уменьшить, стабилизировать снизить вероятность или предотвратить заболевание, патологическое состояние, нарушение или событие путем введения фармацевтической композиции. Этот термин включает активное лечение, то есть лечение, специфически направленное на улучшение, или связанное с излечением заболевания, патологического состояния, нарушения или события, а также включает этиотропную терапию, то есть лечение, направленное на устранение причины соответствующего заболевания, патологического состояния, нарушения или события. Кроме того, этот термин включает паллиативное лечение, то есть лечение, предназначено для снижения симптомов, а не на излечение заболевания, патологического состояния, нарушения или события; симптоматическое лечение, то есть лечение, направленное на системные симптомы соответствующего заболевания, патологического состояния, нарушения или события; профилактическое лечение, то есть лечение, направленное на минимизацию или частичное или полное ингибирование развития соответствующего заболевания, патологического состояния, нарушения или события, например, у млекопитающего, которое еще не больно, но которое восприимчиво или имеет иной риск к конкретному заболеванию, патологическому состоянию, нарушению или событию; и поддерживающую терапию, то есть лечение, применяемое для дополнения другой специфической терапии, направленной на улучшение соответствующего заболевания, патологического состояния, нарушения или события.

Под "вакциной", как она здесь используется, понимается композиция, которая вызывает иммунную реакцию у пациента, которому она введена. Режим введения, доза и число введений могут быть оптимизированы специалистами в данной области известным способом.

Под термином "вакцинировать", как он здесь используется, понимается лечение млекопитающего путем введения вакцины, например, для предотвращения или уменьшения симптомов заболевания, патологического состояния, нарушения или события.

Другие признаки и преимущества изобретения станут очевидными из последующего подробного описания, чертежей и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А приведен листинг двух аминокислотных последовательностей Als3p, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

На фиг. 1В приведен листинг одной нуклеинокислотной последовательности Als3, SEQ ID NO: 3.

На фиг. 2 приведен набор фотографий, показывающих сравнительную кинетику эффективности NDV-3, оцененную путем получения изображений *in vivo*. Фотографии показывают мышей в каждой из групп дозировки в дни 2, 4 и 7 после инфицирования.

На фиг. 3 приведен график, показывающий, что NDV-3 ограничивает объем абсцесса MRSA у мышей на структуре кожа/кожа. График показывает средний объем (cm^3) абсцессов в контрольной группе и в группах дозировки 3, 10, 30 и 100 мкг NDV-3.

На фиг. 4 приведены две фотографии, показывающие, что NDV-3 ограничивает объем абсцесса MRSA у мышей на структуре кожа/кожа. Слева мышь из контрольной группы; справа мышь из группы дозировки 100 мкг NDV-3.

На фиг. 5 приведен график, показывающий, что NDV-3 подавляет пролиферацию MRSA у мышей на структуре кожа/кожа. График показывает среднее избыточное выделение/абсцесс для контрольной группы и для групп дозировки 3, 10, 30 и 100 мкг NDV-3.

На фиг. 6 приведен набор изображений, показывающих, что NDV-3 ограничивает пролиферацию MRSA и увеличивает число нейтрофилов. Приведенные данные взяты в группе дозировки 100 мкг NDV-3 на день 7 после инфицирования.

На фиг. 7 приведен набор изображений, показывающих, что NDV-3 увеличивает число Т-клеток CD3+ и индуцирует экспрессию IL-17. Приведенные данные взяты в группе дозировки 100 мкг NDV-3 на день 7 после инфицирования.

На фиг. 8 приведен набор изображений, показывающих, что NDV-3 стимулирует экспрессию IL-22 и реакцию β-дефензина. Приведенные данные взяты в группе дозировки 100 мкг NDV-3 на день 7 после инфицирования.

На фиг. 9 приведен график, показывающий площадь срединного бокового абсцесса у контрольных и вакцинированных мышей.

На фиг. 10 представлен график, показывающий объем срединного бокового абсцесса у контрольных и вакцинированных мышей.

На фиг. 11 представлен график, показывающий средний объем абсцесса из-за штаммов MRSA у контрольных и вакцинированных мышей на день 7 после инфицирования. Звездочками указано значительное уменьшение по сравнению с соответствующим контролем.

На фиг. 12 приведено составное изображение иммунофлуоресценции абсцесса MRSA у мыши, вакцинированной NDV-3 (100 мкг).

На фиг. 13 приведено составное изображение иммунофлуоресценции абсцесса MRSA от контрольной мыши.

Подробное описание

Как будет сказано ниже, белок 3 агглютинино-подобной последовательности (Als3p) позволяет вакцинировать от *S. aureus* млекопитающих, идентифицированных как имеющих риск развития инфекции *S. aureus* на коже или мягкой ткани.

В нижеприведенных анализы (в частности, в пилотном исследовании примера 1 и оптимизированном исследовании примера 2), предназначенных для оценки эффективности вакцины Als3p против развития инфекции *S. aureus* на коже или мягкой ткани на мышиной модели инфекции MRSA структуры кожа/кожа (на структуре кожа/кожа), организмы и способы описаны впервые.

Организмы.

Штаммы MRSA.

MRSA Xen30 (lux+) Roche-16

MRSA LAC-USA300 USA300

MRSA MW2 USA400

Штамм Xen30 *Staphylococcus aureus* использовали в этих исследованиях *in vivo*. Он получен из родительского штамма *S. aureus* MRSA-16 (Roche) и содержит оперон luxA-E в одном сайте хромосомной интеграции. Этот штамм MRSA продуцирует фермент люциферазу и альдегидный субстрат и конститутивно подает биолюминисцентный сигнал в метаболически активном состоянии. Его вирулентность эквивалентна другим штаммам MRSA в мышиной модели на структуре кожа/кожа, использованной как проверенная в пилотных исследованиях, и все испытанные штаммы имели в ином сходные фенотипы и характеристики роста. Log-фазные клетки (BHI; 37°C) были культивированы из количественно подтвержденных основных банков клеток с подтвержденной вирулентностью, собраны и суспендированы в фосфатном буфере, подвергнуты действию ультразвука и количественно определены спектрофотометрией до желательного числа КОЕ.

Способы.

Эффективность вакцины NDV-3 оценивали на мышах на модели структуры кожа/кожа против стойкого к метипиллину SA (MRSA): Xen30 (lux+); LACUSA300 или MW2 (USA400). NDV-3 является составом из рекомбинантного N-конца белка Als3 поверхности белка *Candida* (фиг. 1A; SEQ ID NO: 2) и адьюванта Альгидрогель® в фосфатном буферном физрастворе, pH 7, например, с дозой 0,5 мл, содержащей, например, 30-300 мкг белка Als3 и по выбору, кроме того, содержащей гидроксид алюминия в концентрации 1,0 мг Al/мл. Эффективность сравнивали между режимами NDV-3, вводимыми с адьювантом альгидрогелем (IM) в день 0 и как бустер-доза в день 21. Контрольные мыши получали только адьювант. Инфицирование путем подкожной инокуляции двух фланков (2×10^7 КОЕ) произошло через 14 суток после бустер-дозы. Площадь, объем и КОЕ абсцесса количественно определяли в течение нескольких суток после инфицирования. Изображения *in vivo* (IVIS) истечения абсцесса были получены на мышах, инфицированных Xen30. Реакции на сывороточный IgG (ELISA), IFN-γ и IL-17A (ELISpot) были количественно определены в параллельных режимах вакцины. Ткань IL-17A, IL-22, mβD-3, клетку CD3+ и сигналы нейтрофилов оценили в день 7 после инфицирования с помощью иммуногистохимии.

Вакцина.

Вакцинация NDV-3 была оценена для диапазона дозировки с использованием идентичного режима адьюванта альгидрогеля. Дозы 3, 10, 30, 100 или 300 мкг (IM) исследовали параллельно. После первичной вакцинации (день 0) ввели идентичную бустер-дозу в день 21 исследования. Мышей инфицировали через 14 суток после бустер-дозы (день 35 исследования).

Мышьяная модель структуры кожа/кожа.

Все исследования на животных выполняли согласно одобренной политике LABioMed использования животных Медицинского центра UCLA в Харборе. Мышей Balb/C (компании Harlan) вакцинировали, как сказано выше. Моделью подкожного абсцесса кожи/мягкой ткани для этих исследований послужила модифицированная модель Динга и др. (Ding et al.) (J Bacteriol 2008 190:7123-9) и/или Войича и др.

(Voyich et al.) (J Infect Dis 2006 194:1761-1770). В день 35 исследования мышей анестезировали, фланки выбрали и стерилизовали, и инокуляты 2×10^7 КОЕ (без гранул или матрикса) ввели в подкожный компартмент путем инъекции (100 мкл). В каждом исследовании использовали как минимум 20 мышей для контрольной или вакцинируемой групп.

Количественное определение абсцесса.

Площадь/объем абсцесса измеряли в каждом боку мыши в течение периода исследования вплоть до 14 суток после инфицирования. Для этого мышей анестезировали, и оценивали длину (l) и ширину (w) места поражения, чтобы количественно определить площадь абсцесса или дермонекроза (см^2). Объем абсцесса (см^3) вычислили согласно формулы для сферического эллипсоида: $[v=(\pi/6) \times l \times w^2]$.

Исследования изображений.

Штамм Xen30 MRSA имеет собственный оперон lux, интегрированный в его хромосому. Этот конструкт кодирует альдегидный субстрат и сам фермент люциферазу; таким образом, экзогенного субстрата люциферины не требуется (Kadurugamuwa et al., Infect Immun 2003 71:882-890). В выбранные дни исследования получали изображения *in vivo* (IVIS) контрольных и вакцинированных мышей, используя систему IVIS (компания Caliper Life Sciences, Inc.). Сигналы люминесценции фиксировали за период пять минут и анализировали, используя программное обеспечение Living Image, как фотоны/мин/абсцесс.

Количественная культура.

В определенные моменты времени после инфицирования мышей гуманно умерщвляли и обрабатывали для получения количественной культуры абсцессов. Каждый бок разрезали асептически, абсцесс удаляли и подготавливали для культивирования. Абсцессы гомогенизировали по отдельности и последовательно разбавляли в стерильном фосфатном буфере для количественной культуры на агаровых планшетах с овечьей кровью. Культуры инкубировали (37°C) в течение 24 ч и подсчитывали полученные колонии.

Иммунологические механизмы.

Множественные и комплементарные подходы использовали для оценки потенциальных коррелятов эффективности вакцины NDV-3 на мышиной модели с инфекцией MRSA на структуре кожа/кожа. Эти исследования были направлены на штамм Xen30, позволяющий корреляцию с данными системы IVIS в конечной точке 7 суток.

Количественное определение антитела.

Уровни антитела сывороточного IgG определяли в формате ELISA с 96 лунками для некоторого диапазона разбавлений. Значения представляют разбавление, скорректированное на геометрическое среднее, трех одинаковых анализов для сравнения иммунизированных сывороток с контрольной.

В. Количественное определение цитокина.

Реакции Т-клеток IFN- γ и IL-17A определяли путем ELISpot-анализа спленоцитов, выделенных из иммунизированных против контрольных мышей, и подвергали воздействию иммуногена NDV-3. Число клеток, образующих ореол, определяли количественно для 106 клеток, продуцирующих или IFN- γ , или IL-17A. Жизнеспособность клеток проверяли продуцированием IFN- γ после стимуляции форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) и иономицином по установленным протоколам.

Иммуногистохимия.

Иммунологические детерминанты, связанные с эффективностью вакцины, оценивали стандартными способами в тканях, полученных от вакцинированных и контрольных животных через 7 суток после инфицирования. Вкратце, для иммуногистохимических исследований вертикальные срезы 3 мкм, введенные в парафин, были депарафинизированы и повторно гидрированы, после чего был проведен поиск индуцированного теплом антигена в целевом растворе для поиска (компания Dako, Карпинтерия, Калифорния). Срезы инкубировали с двойным эндогенным блокирующим буфером (компания Dako) в течение 15 мин при комнатной температуре, чтобы блокировать активность эндогенной пероксидазы, и неспецифическое связывание антитела блокировали путем инкубации с 5% нормальной сывороткой, соответствующей первичному антителу. Затем срезы инкубировали в течение ночи при 4°C с первичным антителом, нацеленным на специфический антиген, представляющий интерес (табл. 1). Затем срезы промыли и инкубировали в течение 30 мин с подходящим вторичным антителом (табл. 1), либо конъюгированным с пероксидазой хрена, либо биотинилированным (компания Santa Cruz Biotechnology, Санта-Круз, Калифорния). Затем было достигнуто иммуногистохимическое проявление путем 30-минутного проявления в стрептавидине-пероксидазе хрена (компания Dako) и 3,3'-диаминонебензидине (ДАБ; компания Vector Laboratories, Берлингейм, Калифорния) и контрастно окрасили гематоксилином. Изображения получали, используя микроскоп Olympus BX43 с цифровой камерой для получения изображений.

Иммунофлуоресценция.

Для оценки воздействия вакцины NDV-3 на взаимосвязь иммунологических детерминант и *S. aureus* в контексте инфицирования *in vivo* исследования иммунофлуоресценции с использованием конфокальной микроскопии были выполнены установленными способами. Вкратце, срезы, введенные в парафин, были приготовлены, как сказано выше, и инкубированы с иммунофлуоресцентным буфером (1% бычий сывороточный альбумин и 2% фетальная телячья сыворотка) в течение 1 ч при комнатной темпе-

ратуре. Первичные антитела, направленные на представляющие интерес антигены-мишени (табл. 1), инкубировали со срезами тканей от контрольных и вакцинированных мышей при 4°C в течение ночи. Далее соответствующие вторичные антитела (табл. 1), разбавленные в буфере IFF (2 мкг/мл), инкубировали в течение 60 мин. Срезы затем промыли в фосфатном буфере и установили, используя Vectashield H-1500 (компания Vector Laboratories, Берлингейм, Калифорния) так, чтобы минимизировать фотообесцвечивание. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Leica SP2, используя аргоновый (488 нм), криptonовый (568 нм) и гелий-неоновый (633 нм) лазеры и конфокальное программное обеспечение версии 2.0 (компания Leica Instruments, Германия).

Таблица 1

Антитела, использованные для имmunогистологических
или иммунофлуоресцентных исследований

Первичные антитела

Антиген-мишень Ly-

6G (гранулоциты)

Мышиный β -дефензин-1 (mBD-1)

Мышиный β -дефензин-3 (mBD-3)

Мышиный тромбоцитарный фактор 4 (PF-4)

Staphylococcus aureus (мыши)

Staphylococcus aureus (кролика)

Стафилококковый белок A

CD3- γ

CD3- ϵ

IL-17

IL-22

Вторичные антитела

Конъюгированное с Alexa 488 ослиное антитело к кролику

Конъюгированное с Alexa 488 ослиное антитело к крысе

Конъюгированное с Alexa 555 козье антитело к крысе

Конъюгированное с Alexa 568 ослиное антитело к

кролику Конъюгированное с Alexa 633 ослиное антитело

к козе Конъюгированное с Alexa 647 ослиное антитело к

кролику Конъюгированный с Alexa 633 стрептавидин

Статистические анализы.

Различия в результатах экспериментов сравнили на основании оценок степеней, показывающих, что 16-20 мышей в группе дают степень >85%, чтобы детектировать 1 log-разницу в КОЕ на 1 г ткани, или площадь абсцесса 2 мм ($\alpha=0,05$; U-критерий Манна-Уитни. Значения Р указаны в табл. 2 и 3 (ниже)).

Пример 1.

В pilotном исследовании вакцинацию NDV-3 выполнили с уменьшенными параметрами на структуре кожа/кожа из-за MRSA с эквивалентной эффективностью в ограничении площади и объема абсцесса и КОЕ для штаммов Xen30, USA300 и MW2. Мышиную иммунную реакцию коррелировали с эффективностью защиты, связанной с дозой NDV-3. Эти результаты показаны в табл. 2 и на фиг. 2. Эти резуль-

таты показывают, что вакцина NDV-3 индуцировала жесткие реакции В- и Т-клеток, причем эти реакции соответствовали эффективности защиты от MRSA в мышиной модели на структуре кожа/кожа.

Таблица 2

**Эффективность NDV-3 в MRSA Xen30 на структуре
кожа/кожа и иммунная реакция в мышиных моделях**

| Abscess | Control | 3µg | 10µg | 30µg | 100µg | 300µg |
|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Area 7d | 1.88cm ² | 1.47cm ² * | 1.59cm ² * | 0.99cm ² †† | 0.77cm ² †† | 0.69cm ² †† |
| Volume 7d | 1.29cm ³ | 0.95cm ³ * | 0.96cm ³ ** | 0.46cm ³ †† | 0.34cm ³ †† | 0.29cm ³ †† |
| Flux 7d | 1.92x10 ⁵ | 1.48x10 ⁵ * | 1.81x10 ⁵ | 1.07x10 ⁵ * | 1.65x10 ⁵ * | 9.03x10 ⁴ †† |
| Median Log CFU 7d IM | 7.9 (7.6/8.0) [n=36] | 7.8 (7.8/7.8) [n=20] | 8.1 (7.8/7.8) [n=20] | 8.1 (7.9/7.9) [n=36] | 7.9 (7.5/8.0) [n=36] | 7.5† (7.4/7.8) [n=36] |
| Median Log CFU 14d IM | 1.70 (1.0/2.8) [n=48] | 0.05†† (0.05/1.3) [n=39] | ND | ND | 0.05†† (0.05/1.7) [n=39] | 1.48 (0.05/2.6) [n=17] |
| Median Log CFU 14d SubQ | 3.54 (2.6/6.9) [n=20] | 3.92 (3.2/5.5) [n=20] | ND | ND | 2.26** (1.8/3.6) [n=20] | 2.40** (1.4/3.8) [n=20] |
| Analyte | | | | | | |
| IgG | 1.0 GCU | 44.8 GCU†† | ND | 97.8 GCU†† | 81.8 GCU†† | ND |
| IFN-γ | 9.5 SPU | 12.8 SPU | ND | 21.9 SPU | 34.3 SPU* | ND |
| IL-17 | 18.9 SPU | 132.6 SPU†† | ND | 62.2 SPU | 161.2 SPU** | ND |

(25%/75% quartiles); *P < 0.5; **P < 0.1; †P < 0.05; ††P < 0.01; GCU, geometric / dilution corrected units; SPU, mean spot forming units / 10⁶ splenocytes; ^ limit of detection.

Abscess=абсцесс;

Area=площадь;

Volume=объем;

Flux=истечение;

Median Log CFU=логарифм медианного значения КОЕ;

7d=день 7;

14d=день 14;

Control=контрольные мыши;

µg=мкг;

cm=см;

quartiles=квартильные показатели;

GCU, geometric/dilution corrected units=значения, скорректированные на геометрическое среднее/разбавление;

SPU, mean spot forming units=среднее число клеток, образующих ореол;

splenocytes=спленоциты;

limit of detection=порог обнаружения.

Анализ.

Вакцина NDV-3 значительно уменьшила площадь, объем, люминесцентный сигнал абсцесса и плотности КОЕ в этой мышиной модели MRSA на структуре кожа/кожа. Эффективность NDV-3 была эквивалентна для каждого из штаммов MRSA, оцененных в данном исследовании. Иммунологические данные по вакцинированным мышам идентично инфицированным мышам показывают, что вакцина NDV-3 индуцирует жесткие реакции В- и Т-клеток, которые, как кажется, отражают связь между дозой и реакцией. Иммунологические данные по вакцинированным мышам идентично инфицированным мышам показывают, что вакцина NDV-3 индуцирует жесткие реакции В- и Т-клеток, которые отражают связь между дозой и реакцией. Совместно эти результаты дают доказательство того, что NDV-3 индуцирует смешанную реакцию Th1/Th17, которая, как кажется, главным образом связана с эффективностью защиты. Реакция антитела может способствовать защитным механизмам NDV-3. Эти результаты показывают, что вакцина NDV-3 пригодна в качестве средства для предотвращения или уменьшения инфекции MRSA или абсцессов на коже или иного у млекопитающих.

Пример 2.

Был проведен дальнейший оптимизированный анализ, и результаты суммированы в табл. 3 и на фиг. 3-8. Как и в примере 1, это исследование оценивало эффективность и иммунологические механизмы вакцины NDV-3 на мышиной модели инфекции структуры кожа/кожа, вызванной стойким к метициллину SA (MRSA). Величина абсцесса, плотность MRSA и число КОЕ сравнивали с течением времени между иммунизированной NDV-3 и контрольной группами. Концентрации IgG, IFN, IL-17A в сыворотке, индукцию ткани IL-17A, IL-22 и mβD-3 и инфильтрацию Т-клеток CD3+ Т или нейтрофилов, которые были опосредованы NDV-3, определяли параллельно. Иммунизация с помощью NDV-3 достигла эффективности защиты от MRSA в отношении площади, объема, бактериальной плотности и КОЕ абсцесса по сравнению с только адьювантом. Эффективность защиты NDV-3 соответствовала увеличениям в сывороточном IgG, сывороточных и тканевых биомаркерах поляризации Th1-Th17 и соответствующей инфильтрации нейтрофилов и пептидной индукции защиты организма-хозяина в случаях абсцессов. Эти данные также продемонстрировали, что иммунизация с помощью NDV-3 индуцирует жесткие механизмы В- и Т-клеток для эффективности защиты от MRSA в случаях кожи и слизистой.

Результаты.

Вакцина NDV-3 была эффективной против MRSA, что выразилось в площади, объеме и числе КОЕ абсцесса против только адьюванта (табл. 3). Эффективность, определенная по площади дермонекроза, и объем абсцесса были эквивалентны для всех испытанных штаммов. Значительное увеличение в сывороточном IgG, сывороточных и тканевых биомаркерах поляризации Th1 (INF- γ) и Th17 (IL-17) (табл. 3), инфильтрации нейтрофилов (Ly6G), выработке IL-22, а также индукции т β D-3 коррелировались с эффективностью защиты NDV-3 (фиг. 3-8).

Таблица 3

Эффективность NDV-3 и иммунная реакция против
MRSA Xen30 у мышей на структуре кожа/кожа

| Abscess | Control | 3 g | 10 g | 100 g |
|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Area d7 | 1.88cm ² | 1.47cm ² * | 1.59cm ² * | 0.77cm ² †† |
| Volume d7 | 1.29cm ³ | 0.95cm ³ * | 0.96cm ³ ** | 0.38cm ³ †† |
| Flux d7 | 3.22x10 ⁵ | 1.48x10 ⁵ * | 2.15x10 ⁵ * | 1.06x10 ⁵ ** |
| Geo Mean | 7.50 | 6.23 † | 6.68 † | 6.05 † |
| Log CFU | (8.0/7.4) ^a | (6.4/6.1) | (6.8/6.4) | (6.2/5.6) |
| d7 IM | [n=54] | [n=20] | [n=20] | [n=20] |
| Analyte | | | | |
| IgG | 1.0 GCU ^b | 44.8 GCU †† | ND | 81.8 GCU †† |
| IFN | 9.5 SFU ^c | 12.8 SFU | ND | 34.3 SFU * |
| IL-17 | 18.9 SFU | 132.6 SFU †† | ND | 161.2 SFU ** |

^a Mean variance=средняя дисперсия;

^b GCU, geometric/dilution corrected units=клетки, скорректированные на геометрическое среднее/разбавление;

^c SPU, mean spot forming units/10⁶ splenocytes=среднее число клеток, образующих ореол/10⁶ спленоцитов

*P<0,5; **P<0,1; †P<0,05; ††P<0,01;

Abscess=абсцесс;

Area=площадь;

Volume=объем;

Flux=истечение;

Geo Mean Log CFU=логарифм геометрического среднего КОЕ;

7d=день 7;

14d=день 14;

Control=контрольные мыши;

μg=мкг;

cm=см;

ND=нет данных.

Вывод.

NDV-3 индуцирует эффективную защиту от MRSA у мышей на структуре кожа/кожа. Иммунологические механизмы эффективности включали жесткие реакции В- и Т-клеток, совпадающие с парадигмами Th1-Th17, в которых нейтрофилы и защитные пептиды организма-хозяина нацелены и координированы на инфекцию.

Пример 3.

Был проведен дополнительный ряд экспериментов, чтобы оценить эффективность вакцины NDV-3 на мышиной модели на структуре кожа/кожа с инфекцией Xen30 MRSA и на сравнительных штаммах MRSA. Эксперименты выполнили так, как описано в примерах 1 и 2. Кинетика медианных данных эффективности вакцины против времени показана на фиг. 9 (медианная площадь бокового абсцесса у контрольных и вакцинированных мышей) и на фиг. 10 (средний объем бокового абсцесса у контрольных и вакцинированных мышей). Эти данные подтверждают, что вакцинация NDV-3 подавляет развитие абсцесса, в частности, при дозах больше чем 3 мкг.

Помимо этого, эффективность вакцины проверили на трех разных штаммах MRSA: Xen 30, USA300

и MW2. Для каждого штамма MRSA были проверены отрицательная контрольная группа и группа, получившая дозу 100 мкг. Был определен средний объем поражения в день 7 после инфицирования, который показан на фиг. 11. Каждый штамм был тем же инокулятом (2×10^7). Штамм MW2 показал низкую вирулентность в этих экспериментах.

Эти данные демонстрируют, что независимо от проверенного штамма MRSA вакцина NDV-3 имеет эквивалентную эффективность (например, снижение приблизительно на 50%) для ограничения объема абсцесса. Таким образом, эффективность NDV-3 не является специфической к штамму MRSA.

Пример 4.

В еще одной группе экспериментов были получены и проанализированы составные иммунофлуоресцентные изображения абсцессов MRSA. На фиг. 12 показано составное иммунофлуоресцентное изображение представительного абсцесса MRSA у мыши, вакцинированной NDV-3 (100 мкг), и на фиг. 13 показано составное иммунофлуоресцентное изображение представительного абсцесса MRSA у контрольной мыши.

На каждом из упомянутых изображений каждый компонент изображения относится к тому же поражению, увеличенному приблизительно 500-кратно. Если сигнал иммунофлуоресценции было трудно выделить при низкой степени увеличения, изображения получали для каждой части поражения с повышенной степенью увеличения, перемещаясь из эпидермиса кожи в субдерму и глубже в гиподерму. Таким образом, компоненты объединяли, чтобы проиллюстрировать непрерывную иммунофлуоресцентную карту *S. aureus* (синий цвет), нейтрофилы (красный цвет) и Т-клетки CD3+ (зеленый цвет) по всему поражению, при этом поддерживая степень увеличения, достаточную для разрешения иммунофлуоресценции. Компоненты изображений представляют функцию полей высокой степени, расположенных так, чтобы систематически фотографировать эквивалентные области в поражениях с NDV-3 и контрольных поражениях для сравнения иммунофенотипов абсцессов "голова к голове".

Как показано на фиг. 12 и 13, в абсцессе, вакцинированном NDV-3, мало организмов MRSA (синий цвет), и они ограничено эпидермисом при инфильтрации нейтрофилов (красный цвет), опосредованной притоком Т-клеток CD3+ (зеленый цвет). Напротив, в контрольном абсцессе много организмов MRSA, и они проникают в две разных области (эпидермис и гиподерма), соответствующа значительно меньшей инфильтрации нейтрофилов и клеток CD3+.

Хотя изображения, приведенные на фиг. 12 и 13, относятся к индивидуальным поражениям, они представляют поражения в вакцинированной и контрольной группах в целом и совпадают с количественными данными, описанными в предшествующих примерах.

Пример 5.

Описанные в настоящем документе композиции и способы могут быть использованы, например, для вакцинации человека с риском развития инфекции *Staphylococcus aureus* на коже или мягкой ткани от *Staphylococcus aureus*. Во-первых, необходимо идентифицировать человека с риском развития инфекции *S. aureus* на структуре кожа/кожа. Во-вторых, этому человеку необходимо ввести иммуногенное количество вакцины, включающей полипептид, содержащий Als3p, или его иммуногенный фрагмент, в фармацевтически приемлемой среде. Например, человеку можно ввести от одной до трех доз NDV-3, содержащих от 3 до 1000 мкг рекомбинантного N-конца поверхностного белка Als3 Candida (SEQ ID NO: 2) на одну дозу, при этом множественные дозы вводят с интервалами от двух недель до шести месяцев.

Ожидается, что после введения вакцины человек будет иметь пониженный риск развития инфекции *S. aureus* на структуре кожа/кожа в течение времени от одного месяца до нескольких лет или больше.

Также, человек, который идентифицирован как имеющий инфекцию *S. aureus* на структуре кожа/кожа, может получить лечение путем введения иммуногенного количества фармацевтической композиции, включающей полипептид, содержащий Als3p, или его иммуногенный фрагмент, в фармацевтически приемлемой среде. Например, человеку вводят от одной до трех доз NDV-3, содержащих от 3 до 1000 мкг рекомбинантного N-конца поверхностного белка Als3 Candida (SEQ ID NO: 2) на одну дозу, при этом множественные дозы вводят с интервалами от двух недель до шести месяцев.

Ожидается, что после введения этой фармацевтической композиции тяжесть инфекции *S. aureus* на структуре кожа/кожа человека будет понижена.

Пример 6.

Описанные в настоящем документе композиции и способы могут быть использованы, например, для вакцинации крупного рогатого скота с риском развития инфекции *Staphylococcus aureus* на коже или мягкой ткани от *Staphylococcus aureus*. Во-первых, необходимо идентифицировать животного с риском развития инфекции *S. aureus*, например мастита, на структуре кожа/кожа. Например, любой молочный крупный рогатый скот может считаться имеющим риск развития мастита, вызываемого *S. aureus*. Во-вторых, этому животному необходимо ввести иммуногенное количество вакцины, включающей полипептид, содержащий Als3p, или его иммуногенный фрагмент, в фармацевтически приемлемой среде. Например, животному можно ввести от одной до трех доз NDV-3, содержащих от 3 до 1000 мкг рекомбинантного N-конца поверхностного белка Als3 Candida (SEQ ID NO: 2) на одну дозу, при этом множественные дозы вводят с интервалами от двух недель до шести месяцев.

Ожидается, что после введения вакцины животное будет иметь пониженный риск развития инфек-

ции *S. aureus* на структуре кожи/кожа, например мастита.

Также крупный рогатый скот, который идентифицирован как имеющий инфекцию *S. aureus* на структуре кожи/кожа, может получить лечение путем введения иммуногенного количества фармацевтической композиции, включающей полипептид, содержащий Als3p, или его иммуногенный фрагмент, в фармацевтически приемлемой среде. Например, животному вводят от одной до трех доз NDV-3, содержащих от 3 до 1000 мкг рекомбинантного N-конца поверхностного белка Als3 Candida (SEQ ID NO: 2) на одну дозу, при этом множественные дозы вводят с интервалами от двух недель до шести месяцев.

Ожидается, что после введения этой фармацевтической композиции тяжесть инфекции *S. aureus* на структуре кожи/кожа, например мастита, будет понижена.

Другие варианты осуществления

Все публикации и патенты, упомянутые в вышеупомянутом описании изобретения, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были бы конкретно и по отдельности указаны как включенные путем ссылки. Хотя изобретение было описано выше в некоторых подробностях на иллюстрациях и примерах для его четкого понимания, специалисты в данной области легко поймут в свете вышеизложенного, что в него могут быть внесены определенные изменения и модификации без нарушения сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцина, содержащая от 30 до 300 мкг выделенного белка Als3, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, для лечения у млекопитающего абсцесса кожи, обусловленного *Staphylococcus aureus*.

2. Вакцина по п.1, где *Staphylococcus aureus* представляет собой резистентный к метициллину штамм *Staphylococcus aureus* (MRSA).

3. Вакцина по п.1, где *Staphylococcus aureus* представляет собой резистентный к ванкомицину штамм *Staphylococcus aureus* (VRSA).

4. Вакцина по п.1, где указанный белок конъюгирован с носителем.

5. Вакцина по п.4, где указанный носитель представляет собой гемоцианин фиссуреллы (KLH), CRM197, токсайд столбняка, токсайд дифтерии, фрагменты энтеротоксина В или белковый комплекс наружной мембранны *N. meningitidis*.

6. Вакцина по п.4, где указанный носитель представляет собой фаг, дрожжи, вирус, виросому или рекомбинантную вирусоподобную частицу.

7. Вакцина по п.1, выполненная в форме для внутримышечного, подкожного, внутрикожного, перорального или сублингвального введения или в форме для ингаляции в виде микрочастиц.

8. Вакцина по п.1, содержащая иммуностимулирующий адьювант.

9. Вакцина по п.1, дополнительно содержащая антибиотик.

10. Дозированная форма вакцины по п.1 объемом 0,5 мл в фосфатном буферном физрастворе, имеющем pH 7.

SEQ ID NO:1

```

1   MLCQYTLILLI YLSVATAKTTI TGTGFNSFNL TWSNAATVNY KGPCTPTWNA VLCWSLDCTS
61  ASPGCDFTLN MPCVFNFTTS QTSDVDTAHC VKYATCQFOA GEEFMIFSTL TCTVSNTLTP
101 SIKALGTVIII PIAFNGGTC SSVDLESDPS PTAGNIVVTF NGSGRKISIN VIEERSNDP
161 RGYLTDSRVL PSIMKVVLE VAPCANCYVT SGTMGFADL GQDLSKNSVQ QGKGRGLND
241 NYVYVSSSESF PTTKTCSSS FVYVYVYVPA GPPFVDAYT SATVNSNPT SYMPEVACG
301 GHVGRAPFL RWVYVYNSDA GSNGLVIVNT VVYVYVYVPA SATTLEDFPDR DNGKTIDILK
361 PDSIDNIVTO VPGSPNETTTE TEWVQSFAT TTIIIGPQGM TDIVLIRBPP NHVTTTTEWY
421 PPNHTUTTE YWQSOSYTTT TTAEPPGGTD TVLREPPHN TVTITTEWQO SYTTTTTVA
481 SESVTTSTF TAPPGGTDSV LIKEPPNPTV TTTEVNESEY TTTSSTETAPP GGTDLSVKE
541 PPNHTUTTE YWQSOSYTTT TTAEPPGGTD TVLREPPHN TVTITTEWQO SYTTTTTVA
601 PHGTTESVII REPPNPTVTE TEWVQSFAT TTIIIGPQGM TDIVLIRBPP NHVTTTTEWY
661 SOSYASVTTI TAPEGGETDYL LINSPPNHNTV TTTEVMEQSF ATTITVTAAPP GGTDDVIRE
721 PPNHTUTTE YWQSOSYTTT TTAEPPGGTD TVLREPPHN TVTITTEWQO SYTTTTTVA
781 PPGETDTVLI REPPNPTVTE TEWVQSFAT ATTIVAPPGG TDIVLIRBPP NHVTTTTEWY
841 PHYNTHTTIA STTWVIEKTT TTESCEGDK GGSWVSVTRP IWTIPNNIET PMVNTVWDT
901 TTESTSQPS GIFFSEGVSV ETESVPTTE SEVVFPTTKGN NENGPYESEPS
961 TNVKSSMDEN SEPTTAAAS TSTDIEINETI ATTGSEVAAS PIISSSADET TVTITTAEST
1021 SVIEOPTNNN GGGKARSAAT SPSTTTTANN DSVINGCTPT NGQSQSGSQYM SQTQQTLSQ
1081 QMTTSILVSLM MLTTFDGSGGS VIQHSTJWLG LITLISLFT

```

SEQ ID NO:2

```

1   KTITGVFNSF NSLITWSNAATV YNYKGPGPTP WNAVLCWSDL GTASPQGDTF TLNMPCVFKF
61  TTGTSOTSVLDT AHGCKVATCQ FOGECEMFTE STLTCTVSNT LTBSIKALCT VTLPLAENVG
121  GTGSSVLDLED SKCITPACTPNT VTFNDGKZK SINVDFPERSM VDPKCYLTDS RVPSLPLNKVS
181  TLFVAPQCAN GYTSGCTMGFA NTYGDVQIDC SNHIVGTCKG LDNWHPYSS ESFSYVKTCS
241  SNGIFITYKN VEAGYRPFDV AYISANTDWS YTLYSYANEYT CAGGYWQRAP FTIWRKTCYRN
301  SDAGSSNGIVI VATTRQVFTDS TTAVTTLFED PNROKTKTIE ILKPIPTTTI TTSYVGVTTS
361  YLTKTAPIGE TATVIVDLPY HTTITVSKK TGTTSTTH TNPTDSIDTV IVQVPL

```

Фиг. 1А

035513

SEQ ID NO:3

```

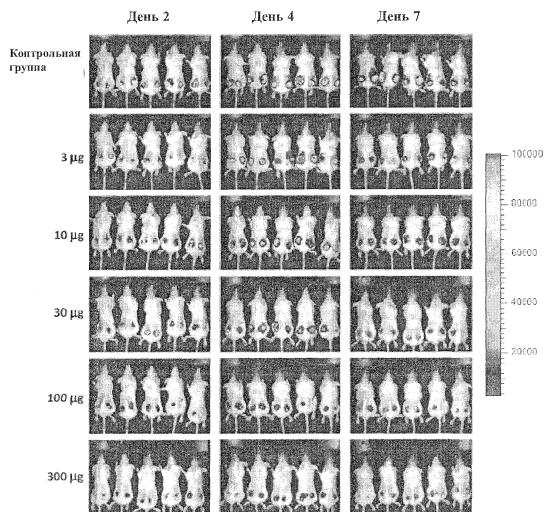
1      AAGACAATCAGTGTGTTCAACAGTTT AATTCAATGACTTGCTCTATGCTGCTACG
61     TATAAATTAAAGGGACAGGAACCCAACT TGGAAATGCCGTGTTGGGTTGGCTTTAGAT
121    GGTAACTAGTGGCAGTCCGGAGATCATTC ACATTTGAAATAGCCATGTTGTTAAATT
181    ACTACTCTCAAACATCTGTTGATTGACT GCTCATGGTGTAAATATGCTACATGTCAA
241    TTTCAGGCAGGTGAAAGAATTATGACCTT TCTACATTAAACATGACTGTGAGCAAACT
301    TTGACTCCATCTTAAGGCTTGGGTACT GTCACTTACCAACTGCAATTCACTGTAGGT
361    GGAACATGGTCTCTGTGATTGGAAGAT TCTAAATGTTTACTGCTGGTACTAACACA
421    GTTACATTTAAATGATGGTGGCCAAGAAAATC TCACATTAAATGTTGATTITGAAAGGTCAAAT
481    GTCGATCCAAGGGTACTTAACGTGATTC AGAGTTTATACAAAGTCTCAACAAAGTGTCA
541    ACTCTTTTGTIGCACACAAATGTGCAAAT GGTTCACACATCTGGTACAATGGGATTGCT
601    AACACTTATGGTCAAAATGACTGT TCAAATATTGATGTTGTTATTACAAAAGGA
661    TTGAATGATTGGAATTATCCGGTTTCACTT GAATATTGATGTTACACAAAACCTGTTCA
721    TCTAATGGTATCTTATCACATATAAAAC GTTCCCTGGGGTTATCGTCCATTGTTGAC
781    GCTTATATTCTGCTACAGATGTTATTG TGACACCTTGTCTATGCTAATGAAATATACT
841    TGTCGTTGGTATTGCAACGTCGACCT TTACACATTAAAGATGGACTGATCACAGAAAT
901    ACTGATGCTGGATCTAACGGTATTGTTATT GTGCGTACTACCAGAACAGTTCAGACAGT
961    ACTACCGCCGTGACCAACCTTACATCGAT CCTAACCCGGCACAAAACTAAGCAATTGAA
1021   AACACATGAAACCTATCCAACAAACTACAACT AACACATCATATGTTGGTGTGACTATTCC
1081   TACCTGACCAAACACTGCAAAATGGGAA ACTGGTACTGTTATGTTGATATTCCATAT
1141   CACACTTACCAACTGTTACCAAGTAATGG ACAGGAACAAATTACTTCCACCCACACAT
1201   ACTAATCCAACACTGACTCAATAGACACTGTC ATTGTACAAAGTCCACTGTGA

```

*stop codon

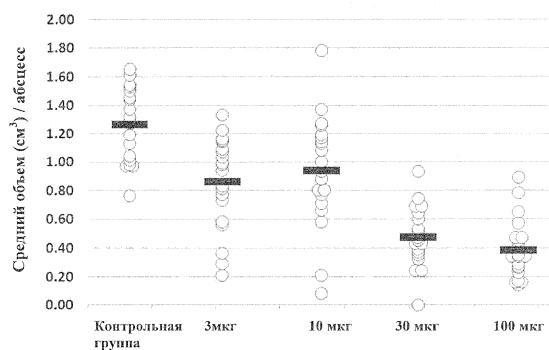
Фиг. 1В

Сравнительная кинетика эффективности NDV-3, оцененная путем получения изображений *in vivo*



Фиг. 2

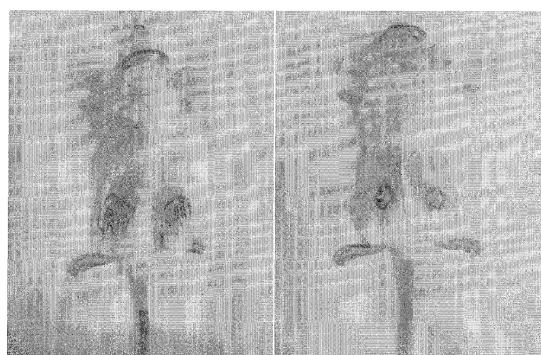
NDV-3 ограничивает объем абсцесса MRSA при инфекции системы кожи/кожа у мышей



Режим вакцинации

Фиг. 3

NDV-3 ограничивает объем абсцесса MRSA при инфекции системы
кожа/кожа у мыши

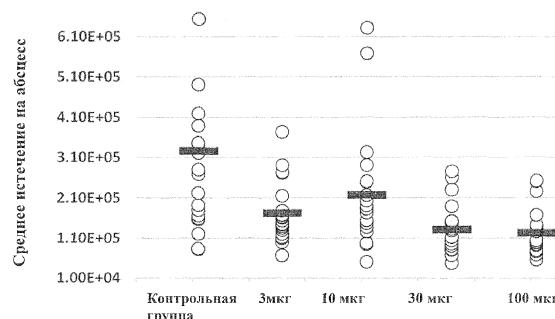


Контрольная мышь 100 мкг

Средний объем абсцесса (см³)

Фиг. 4

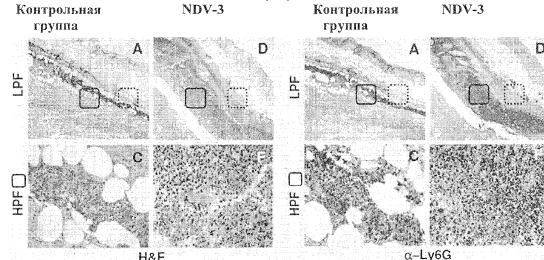
NDV-3 подавляет пролиферацию MRSA при инфекции системы кожа/кожа у мышей



Режим вакцинации

Фиг. 5

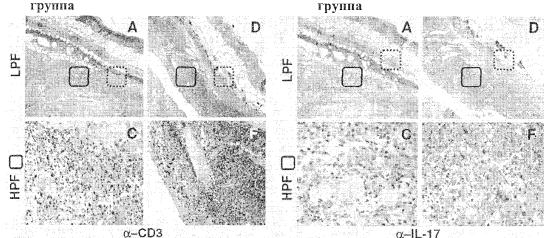
NDV-3 ограничивает пролиферацию MRSA и повышает число нейтрофилов



Данные по дозе 100 мкг в день 7 после инфицирования

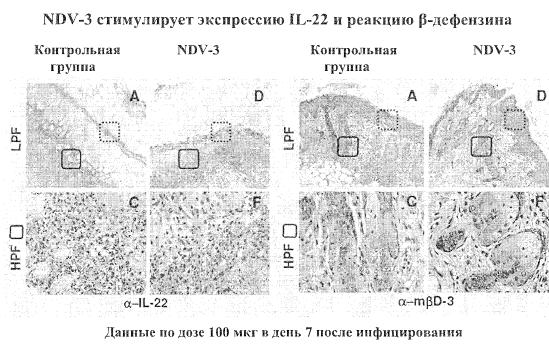
Фиг. 6

NDV-3 повышает число Т-клеток CD3+ и индуцирует экспрессию IL-17
Контрольная NDV-3 Контрольная NDV-3



Данные по дозе 100 мкг в день 7 после инфицирования

МКГ в день 71



Фиг. 8

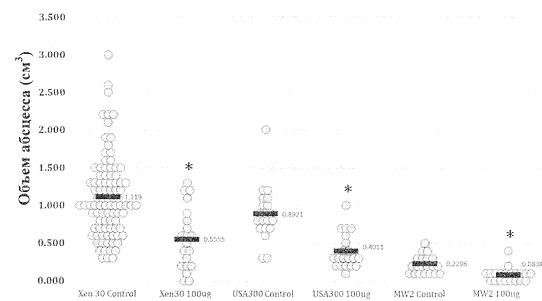


Фиг. 9



Фиг. 10

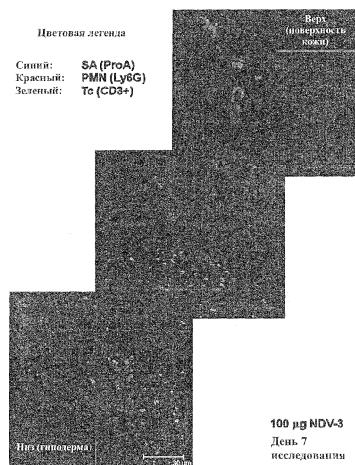
Средний объем абсцесса в день 7 из-за штаммов MRSA у контрольных против вакцинированных мышей (cm^3)



Штаммы MRSA против режима вакцинации

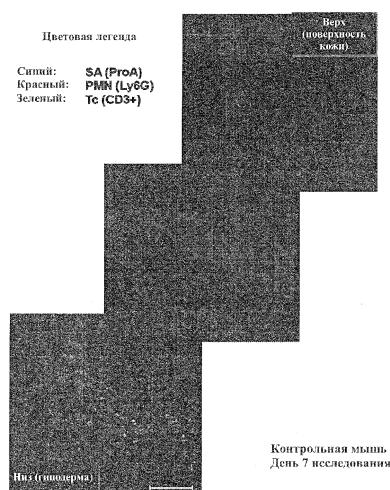
Фиг. 11

Абсцесс MRSA у мыши, вакцинированной NDV-3 (100 мкг)



Фиг. 12

Абсцесс MRSA у контрольной мыши



Фиг. 13

