



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012120706/15, 20.10.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
20.10.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
20.10.2009 GB 0918392.2

(43) Дата публикации заявки: 27.11.2013 Бюл. № 33

(45) Опубликовано: 10.08.2015 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EI DEMELLAWY MA., et al., Role of humoral immune response to group A streptococcal pyrogenic exotoxins in rheumatic fever. Egypt J Immunol. 2004;11(2):157-64. EP 1 864 996 A1, 12.12.2007. WO 90/00201 A1, 11.01.1990. OLIVE C., Progress in M-protein-based subunit vaccines to prevent rheumatic fever and rheumatic heart disease. Curr Opin Mol Ther. 2007 Feb;9(1):25-34

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 21.05.2012

(86) Заявка РСТ:  
IB 2010/054753 (20.10.2010)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2011/048561 (28.04.2011)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

МАРГАРИТ И РОС Иммакулада (IT),  
ВАЛЕРИО Регуцци (IT),  
АХМЕД Сохаил (IT),  
ГРАНДИ Гвидо (IT),  
БАРТОЛИНИ Эрика (IT)

(73) Патентообладатель(и):

НОВАРТИС АГ (CH)

## (54) ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается способа лечения или профилактики RHD, связанного с инфекцией GAS, включающего введение пациенту по меньшей мере одного антигена GAS, выбранного из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или их функциональные эквиваленты.

Группа изобретений также касается способа диагностики RHD, связанного с инфекцией GAS, у пациента; белкового чипа для диагностики RHD, связанного с инфекцией GAS, у пациента; набора, содержащего указанный белковый чип и инструкции для применения в диагностике пациентов с наличием или с риском развития ревматического порока сердца, связанного с

инфекцией GAS. Группа изобретений инфекцией GAS; точную диагностику RHD. 6 н. и  
обеспечивает лечение RHD, связанного с 7 з.п. ф-лы, 7 ил., 1 табл., 1 пр.

R U 2 5 5 9 5 8 4 C 2

R U 2 5 5 9 5 8 4 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 559 584** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

*A61K* 38/16 (2006.01)

*A61K* 39/09 (2006.01)

*A61P* 9/00 (2006.01)

*G01N* 33/569 (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012120706/15, 20.10.2010

(24) Effective date for property rights:  
20.10.2010

Priority:

(30) Convention priority:  
20.10.2009 GB 0918392.2

(43) Application published: 27.11.2013 Bull. № 33

(45) Date of publication: 10.08.2015 Bull. № 22

(85) Commencement of national phase: 21.05.2012

(86) PCT application:  
IB 2010/054753 (20.10.2010)

(87) PCT publication:  
WO 2011/048561 (28.04.2011)

Mail address:  
129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

**MARGARIT I ROS Immakulada (IT),**  
**VALERIO Reguttsi (IT),**  
**AKhMED Sokhail (IT),**  
**GRANDI Gvido (IT),**  
**BARTOLINI Ehrika (IT)**

(73) Proprietor(s):

**NOVARTIS AG (CH)**

## (54) DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC METHODS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine and deals with a method of treating or preventing RHD, associated with GAS infection, which includes the introduction to a patient of at least one GAS antigen, selected from a group, including amino acid sequences SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8 or their functional equivalents. The group of inventions also deals with a method of diagnosing GAS-infection-associated RHD in the patient; a protein chip for the

diagnostics of GAS-infection-associated RHD in the patient; a set, containing the said protein chip and instructions for application in the diagnostics of patients with the presence or with a risk of development of a rheumatic heart disease, associated with GAS infection.

EFFECT: group of inventions provides the treatment of GAS-infection-associated RHD; accurate RHD diagnostics.

13 cl, 7 dwg, 1 tbl, 1 ex

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области идентификации пациентов с ревматическим пороком сердца (RHD), связанным с инфекцией *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* группы A; GAS) и идентификации пациентов с риском развития RHD, связанного с инфекцией GAS. Изобретение также относится к способам и композициям для профилактики и лечения RHD, связанного с инфекцией GAS.

## ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Патоген человека *Streptococcus* группы A (*Streptococcus pyogenes*, GAS) широко известен как основная причина общего фарингита. Кроме того, инфекции этой бактерией могут приводить к тяжелым инвазивным заболеваниям, а также к негнойным аутоиммунным осложнениям. Острая ревматическая лихорадка (ARF) представляет собой многоочаговое аутоиммунное заболевание, возникающее у 0,1-3% индивидуумов после нелеченой инфекции GAS.

ARF диагностируют по обновленным критериям Джонса, которые впервые опубликованы в 1944 годы. По обновленным критериям Джонса диагноз ARF можно поставить при наличии двух больших критериев (мигрирующий полиартрит; кардит; подкожные узелки; ревматоидная эритема; хорея Сиденгама), или одного большого критерия и большого критерия и двух малых критериев (лихорадка; артралгия; повышенные скорость оседания эритроцитов или С-реактивный белок; лейкоцитоз; ECG, демонстрирующая признаки блокады сердца), наряду с признаками инфекции GAS.

Основным клинически значимым осложнением ARF является ревматический порок сердца (RHD). RHD может приводить к опасному поражению сердца с миокардитом или вальвулитом, приводящим к гибели или протезированию клапанов. Во всех развивающихся странах, RHD остается основной причиной приобретенных заболеваний сердца у индивидуумов в возрасте <50 лет. В развитых странах, ARF и RHD являются менее частыми вследствие доступности антибиотиков для лечения инфекций GAS. Однако в середине 1980-х годов сообщалось о возврате ARF и RHD в некоторых областях Соединенных Штатов Америки, и что они продолжали существовать в межгорной области, окружающей Salt Lake City, UT.

В настоящее время для подтверждения наличия у пациента развитого RHD после диагноза ARF применяют тесты, такие как ЭКГ и эхокардиограмма. В настоящее время, не существует доступных анализов для идентификации индивидуумов с наличием или с риском развития RHD в результате инфекции GAS.

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способам идентификации индивидуумов с наличием или с риском развития RHD в результате инфекции GAS. Изобретение также относится к белковым чипам, которые можно использовать в таких способах. Изобретение также относится к способам и композициям для профилактики и лечения RHD, связанного с инфекцией GAS.

### Способы диагностики

Изобретение относится к способу диагностики у пациента ревматического порока сердца (RHD), связанного с инфекцией GAS, или идентификации пациента с риском развития RHD, связанного с инфекцией GAS, где указанный способ включает стадии:

а) приведения биологического образца, взятого у пациента, в контакт по меньшей мере с одним антигеном GAS в условиях, подходящих для связывания любых антител, присутствующих в биологическом образце, по меньшей мере с одним антигеном GAS, и

б) сравнения реакционной способности антител в биологическом образце, взятом у пациента, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS с реакционной способностью антител в контрольном биологическом образце, взятом у

здорового индивидуума, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS, где меньшая реакционная способность в биологическом образце, взятом у пациента, по сравнению с контрольным биологическим образцом, взятым у здорового индивидуума, указывает на то, что пациент страдает ревматическим пороком сердца (RHD), связанным с инфекцией GAS, или что у пациента существует риск развития RHD, связанного с инфекцией GAS.

В одном из аспектов изобретение относится к способу диагностики у пациента ревматического порока сердца (RHD), связанного с инфекцией GAS, или идентификации пациента с риском развития RHD, связанного с инфекцией GAS, где указанный способ включает стадии:

а) приведения биологического образца, взятого у пациента, в контакт по меньшей мере с одним антигеном GAS, выбранным из группы, включающей аминокислотные последовательности

SEQ ID NO:1 (GAS5),  
SEQ ID NO:2 (GAS5F),  
SEQ ID NO:3 (GAS25),  
SEQ ID NO:4 (GAS40),  
SEQ ID NO:5 (GAS57),  
SEQ ID NO:6 (GAS97),  
SEQ ID NO:7 (GAS380) и  
SEQ ID NO:8 (SpeA),

или их функциональные эквиваленты, в условиях, подходящих для связывания любых антител, присутствующих в биологическом образце, по меньшей мере с одним антигеном GAS или с их функциональными эквивалентами;

б) оценки реакционной способности любых антител в биологическом образце, взятом у пациента, связывающихся по меньшей мере с одним антигеном GAS или с их функциональными эквивалентами, и

с) сравнения реакционной способности на стадии б) с реакционной способностью антител в контрольном биологическом образце, взятом у здорового индивидуума, связывающихся по меньшей мере с одним антигеном GAS или с их функциональными эквивалентами,

где меньшая реакционная способность в биологическом образце, взятом у пациента, по сравнению с реакционной способностью в контрольном биологическом образце, взятом у здорового индивидуума, указывает на то, что пациент страдает ревматическим пороком сердца (RHD), связанным с инфекцией GAS, или что у пациента существует риск развития RHD, связанного с инфекцией GAS.

Термин "ревматический порок сердца (RHD)" включает состояния, поражающие сердце после острой ревматической лихорадки, включая повреждение митрального клапана и/или аортального клапана, миокардит и перикардит.

Анализ образцов сыворотки пациентов, пораженных RHD, и здоровых индивидуумов привел к неожиданному открытию того, что сыворотки пациентов, пораженных RHD, демонстрируют значительно меньшую реакционную способность в отношении определенных антигенов GAS по сравнению с реакционной способностью сывороток здоровых пациентов. Эти открытия предоставили первое обоснование того, что реакционная способность в отношении антигенов GAS можно использовать для

различения сывороток, получаемых у здоровых индивидуумов, и сывороток, получаемых от пациентов, страдающих RHD. В частности выявлено, что сыворотки, получаемые от пациентов с RHD, демонстрируют меньшую реакционноспособность с восемью антигенами GAS, указанными в таблице 1 ниже:

Таблица 1  
Антигены GAS, применяемые в способах диагностики по изобретению

SEQ ID NO	Внутреннее обозначение GAS	Номер Spy	Номер gi
1	GAS5	spy0019	gi-15674263
2	GAS5F	spy0019 (фрагмент из аминокислот 224-398)	gi-15674263
3	GAS25	spy0167	gi-15674372
4	GAS40	spy0269	gi-15674449
5	GAS57	spy0416	gi-15674549
6	GAS97	spy1801	gi-15675636
7	GAS380	spy1813	gi-15675644
8	SpeA	spyM3_1301	gi-21910837

Таким образом, детекцию низкой реакционноспособности в отношении этих восьми антигенов GAS в образцах, взятых у пациентов, по сравнению с реакционноспособностью в контрольных образцах, взятых у здоровых индивидуумов, можно использовать для диагностики RHD, связанной с инфекцией GAS или для идентификации пациентов с повышенным риском развития RHD, связанного с инфекцией GAS. И наоборот, детекция реакционноспособности антител в отношении этих восьми антигенов GAS в образце, взятом у пациента, являющейся сходной с реакционноспособностью, присутствующей в контрольном образце, взятом у здорового индивидуума, указывает на то, что пациент не страдает RHD и у него снижен риск развития RHD, связанного с инфекцией GAS.

Способы по изобретению могут включать приведение биологического образца, взятого у пациента, в контакт с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или всеми 8 антигенами GAS, перечисленными выше, или с их функциональными эквивалентами.

Когда биологический образец, взятый у пациента, приводят в контакт с 2 из антигенов GAS, способы могут включать приведение образца в контакт с: SEQ ID NO:1 и 2; SEQ ID NO:1 и 3; SEQ ID NO:1 и 4; SEQ ID NO:1 и 5; SEQ ID NO:2 и 3; SEQ ID NO:2 и 4; SEQ ID NO:2 и 5; SEQ ID NO:3 и 4; SEQ ID NO:3 и 5; SEQ ID NO:4 и 5 или их функциональными эквивалентами. Способы также могут включать приведение образца в контакт с SEQ ID NO:1 и 6; SEQ ID NO:1 и 7; SEQ ID NO:1 и 8; SEQ ID NO:2 и 6; SEQ ID NO:2 и 7; SEQ ID NO:2 и 8; SEQ ID NO:3 и 6; SEQ ID NO:3 и 7; SEQ ID NO:3 и 8; SEQ ID NO:4 и 6; SEQ ID NO:4 и 7; SEQ ID NO:4 и 8; SEQ ID NO:5 и 6; SEQ ID NO:5 и 7; SEQ ID NO:5 и 8; SEQ ID NO:6 и 7; SEQ ID NO:6 и 8, или SEQ ID NO:7 и 8 или с их функциональными эквивалентами.

Когда биологический образец, взятый у пациента, приводят в контакт с 3 из антигенов GAS, способы могут включать приведение образца в контакт с любой комбинацией из 3 антигенов GAS из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. Например, способы могут включать приведение образца в контакт с SEQ ID NO:1, 2 и 3; SEQ ID NO:1, 3 и 4; SEQ ID NO:1, 4 и 5; SEQ ID NO:2, 3 и 4; SEQ ID NO:2, 4 и 5; SEQ ID NO:3, 4 и 5 или с их функциональными эквивалентами.

Когда биологический образец, взятый у пациента, приводят в контакт с 4 из антигенов GAS, способы могут включать приведение образца в контакт с любой комбинацией из 4 антигенов GAS из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. Например, способы могут включать приведение образца в контакт с: SEQ ID NO:1, 2, 3 и 4; SEQ ID NO:2, 3, 4 и 5; SEQ ID NO:

1, 3, 4 и 5 или с их функциональными эквивалентами.

Когда биологический образец, взятый у пациента, приводят в контакт с 5 из антигенов GAS, способы могут включать приведение образца в контакт с любой комбинацией из 5 антигенов GAS из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. Например, способы могут включать

приведение образца в контакт с SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 и 5 или с их функциональными эквивалентами.

Когда биологический образец, взятый у пациента, приводят в контакт с 6 из антигенов GAS, способы могут включать приведение образца в контакт с любой комбинацией из 6 антигенов GAS из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8.

Когда биологический образец, взятый у пациента, приводят в контакт с 7 из антигенов GAS, способы могут включать приведение образца в контакт с: SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, и 7; SEQ ID NO:1, 3, 4, 5, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 5, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6 и 8 или с их функциональными эквивалентами.

Альтернативно, биологический образец, взятый у пациента, можно приводить в контакт со всеми 8 антигенами GAS, т.е. с SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 или с их функциональными эквивалентами.

Реакционноспособность антител, связывающихся с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или всеми 8 этими антигенами GAS или их функциональными эквивалентами в биологическом образце, взятом у пациента, сравнивают с реакционноспособностью антител, связывающихся с этими антигенами GAS в контрольном биологическом образце, взятом у здорового индивидуума. Контрольный биологический образец, взятый у здорового индивидуума, приводят в контакт с той же комбинацией антигенов GAS что и биологический образец, взятый у пациента. Как правило, средняя реакционноспособность антител, связывающихся с комбинациями этих антигенов GAS, в контрольных биологических образцах, взятых у здоровых индивидуумов, уже определена. Подходящие способы оценки реакционноспособности антител известны в данной области и более подробно описаны ниже.

#### Детекция антител:

Все способы по изобретению, описанные выше, включают оценку реакционноспособности антител, т.е. детекцию антител, связывающихся с антигенами GAS, и титров этих антител. Способы детекции антител, связывающихся с антигенами и определения титров антител хорошо известны специалистам в данной области и можно использовать любой из таких способов.

Например, антиген или антигены GAS (или функциональные эквиваленты) можно иммобилизовать в известных положениях на поверхности, такой как поверхность чипа, как описано ниже. Иммобилизованные антигены можно инкубировать с иммобилизованными антигенами в условиях, позволяющих связывание с антигенами любых антител, присутствующих в образце. Подходящий период инкубации может составлять приблизительно 1 час. После отмывки с удалением любых несвязавшихся антител, можно проводить детекцию антител, связывающихся с антигенами, с использованием молекулы, связывающейся и распознающей связанные антитела.

Например, стадия оценки реакционноспособности любых антител, связывающихся с антигенами GAS, в любом из способов, описанных выше, может включать приведение биологического образца и антигенов GAS в контакт с меченым вторичным антителом, таким как меченое антитело против IgG, в условиях, подходящих для связывания вторичного антитела с любыми антителами в биологическом образце, связанными с иммобилизованными антигенами GAS.

Вторичное антитело, такое как антитело против IgG, можно метить такой флуоресцентной или ферментной меткой, что посредством детекции метки осуществляют детекцию связывания вторичного антитела и, таким образом, присутствия антител против антигенов GAS в биологическом образце. Когда метка представляет собой флуоресцентную метку, сравнение интенсивности флуоресценции можно использовать для оценки относительной реакционной способности антител и, таким образом, определения того, демонстрирует ли конкретный образец, взятый у пациента, сниженную реакционную способность антител по сравнению с контрольным биологическим образцом. Можно ожидать, что фоновая интенсивность флуоресценции составляет приблизительно 5000. Учитывая стандартное отклонение, на присутствие в образце антитела, связывающегося с антигеном GAS, может указывать интенсивность флуоресценции по меньшей мере 15000. Интенсивность флуоресценции по меньшей мере 30000 можно рассматривать как свидетельство высокой реакционной способности, указывающий на высокий титр антител, связывающихся с антигеном GAS, в образце. Таким образом, в определенных аспектах изобретения интенсивность флуоресценции 15000-30000 может указывать на низкую реакционную способность, вероятно связанную с RHD.

Описанные выше способы можно проводить на белковом чипе, таком как чипы, более подробно описанные ниже или с использованием стандартных способов ELISA или дот-блоттинга.

Биологические образцы:

Биологические образцы, которые можно тестировать в способах по изобретению, могут представлять собой любой образец, для которого известно, что он содержит антитела против антигенов GAS. Примеры подходящих образцов представляют собой образцы слюны, образцы крови или образцы сыворотки. В частности, образец может представлять собой образец сыворотки.

Биологический образец, взятый у пациента, получают у пациента-человека. Пациент-человек, может представлять собой взрослого, подростка в возрасте приблизительно от 12 до приблизительно 18 лет или ребенка до 12 лет. У пациента могут выявлять клинические симптомы острого ревматизма, включая мигрирующий полиартрит; кардит; подкожные узелки; ревматоидную эритему; хорею Сиденгама, лихорадку; артралгию; повышенные скорость оседания эритроцитов или С-реактивный белок; лейкоцитоз или ЭКГ, демонстрирующую признаки блокады сердца. У пациента могут выявлять признаки текущей инфекции GAS. В некоторых случаях у пациента могут отсутствовать симптомы текущей инфекции GAS и острого ревматизма.

Контрольный биологический образец можно получать у здорового индивидуума из того же географического положения, что и биологический образец, взятый у пациента.

Способы по изобретению можно проводить *in vitro*. Способы по изобретению могут дополнительно включать стадию получения биологического образца у пациента.

Белковые чипы:

Для облегчения скрининга биологических образцов на несколько антигенов GAS одновременно, антигены GAS, используемые в способах по изобретению, можно представлять на одном или нескольких белковых чипах. Например, каждый из антигенов GAS можно представлять на отдельном чипе или на одном чипе можно представлять несколько антигенов GAS одновременно. По дополнительному аспекту изобретения предоставлены белковые чипы. Эти чипы пригодны для использования в любом из описанных выше способов.

Изобретение относится к белковому чипу, содержащему по меньшей мере два антигена GAS с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:1,



SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8 или их функциональных эквивалентов.

Белковый чип может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 из этих антигенов GAS или их функциональных эквивалентов.

5 Когда чип содержит 2 антигена GAS, он может содержать антигены, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO:1 и 2; SEQ ID NO:1 и 3; SEQ ID NO:1 и 4; SEQ ID NO:1 и 5; SEQ ID NO:2 и 3; SEQ ID NO:2 и 4; SEQ ID NO:2 и 5; SEQ ID NO:3 и 4; SEQ ID NO:3 и 5; SEQ ID NO:4 и 5, или их функциональные эквиваленты.

Альтернативно, чип может содержать антигены, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 и 6; SEQ ID NO:1 и 7; SEQ ID NO:1 и 8; SEQ ID NO:2 и 6; SEQ ID NO:2 и 7; SEQ ID NO:2 и 8; SEQ ID NO:3 и 6; SEQ ID NO:3 и 7; SEQ ID NO:3 и 8; SEQ ID NO:4 и 6; SEQ ID NO:4 и 7; SEQ ID NO:4 и 8; SEQ ID NO:5 и 6; SEQ ID NO:5 и 7; SEQ ID NO:5 и 8; SEQ ID NO:6 и 7; SEQ ID NO:6 и 8 или SEQ ID NO:7 и 8 или их функциональные эквиваленты

15 Когда чип содержит 3 антигена GAS, он может содержать любую комбинацию из 3 антигенов GAS SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. Например, чип может содержать антигены GAS: SEQ ID NO:1, 2 и 3; SEQ ID NO:1, 3 и 4; SEQ ID NO:1, 4 и 5; SEQ ID NO:2, 3 и 4; SEQ ID NO:2, 4 и 5; SEQ ID NO:3, 4 и 5 или их функциональные эквиваленты.

Когда чип содержит 4 антигена GAS, он может содержать любую комбинацию из 4 антигенов GAS из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. Например, чип может содержать антигены GAS: SEQ ID NO:1, 2, 3 и 4; SEQ ID NO:2, 3, 4 и 5; SEQ ID NO:1, 3, 4 и 5 или их функциональные эквиваленты.

Когда чип содержит 5 антигенов GAS, он может содержать любую комбинацию из 5 антигенов GAS из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. Например, чип может содержать антигены GAS: SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 и 5 или их функциональные эквиваленты.

Когда чип содержит 6 антигенов GAS, он может содержать любую комбинацию из 6 антигенов GAS из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8.

Когда чип содержит 7 антигенов GAS, он может содержать антигены GAS: SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7; SEQ ID NO:1, 3, 4, 5, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 5, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6 и 8 или их функциональные эквиваленты.

Альтернативно, чип может содержать все 8 антигенов GAS, т.е. SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 или их функциональные эквиваленты.

Белковый чип может содержать дополнительные антигены GAS.

35 В способе по изобретению можно использовать любой тип белкового чипа, известный в данной области. Получение белковых чипов описано в Cretich, M., Damin F., et al., (Biomolecular Engineering 23, 77-88 (2006)) и Zhu, H & Snyder, M. (Current Opinion in Chemical Biology, 7:55-63 (2003)).

Например, белковый чип может представлять собой предметное стекло, на котором закреплены антиген или антигены. В его простейшей форме чип может представлять собой предметное стекло, на котором представлен простой антиген, получаемое просто посредством покрытия предметных стекол микроскопа аминосиланом (Ansorge, Faulstich), добавления к стеклам содержащего антиген раствора и высушивания. Стекла, покрытые аминосиланом, для покрытия антигеном можно получать из Telechem и Pierce.

Альтернативно, на чипе могут быть представлены несколько антигенов. Например, на покрытые нитроцеллюлозой стекла можно точно наносить нанолитры нескольких антигенов GAS. На таких чипах могут быть представлены повторы каждого антигена

GAS. Точки антигенов в таких чипах могут составлять приблизительно 150 мкм в диаметре и содержать ~0,35 нг белка.

Другие типы белковых чипов включают 3D слой геля и чипы с микролунками. Как очевидно читателю-специалисту, по настоящему изобретению вполне могут оказаться пригодными для использования типы белковых чипов, которые еще сконструированы, но которые будут разработаны в будущем.

Изобретение дополнительно относится к набору, содержащему белковый чип по изобретению и инструкции для использования чипа для диагностики пациентов с наличием или с риском развития ревматического порока сердца, связанного с инфекцией GAS.

Способы и композиции для лечения и профилактики RHD

В настоящее время, для всех пациентов с диагнозом ARF рекомендована профилактика антибиотиком (как правило, пенициллином) в течение периода по меньшей мере 5 лет после диагноза для снижения риска последующей инфекции GAS и развития RHD. Идентификация, пациентов у которых существует риск RHD и не существует риска RHD, позволяет подбирать медицинское лечение для пациентов, у которых диагностирована ARF.

Изобретение дает возможность, что когда способом по изобретению пациента идентифицируют как страдающего RHD, связанным с инфекцией GAS, с риском развития RHD, связанного с инфекцией GAS, пациента можно лечить антибиотиками. И наоборот, когда пациента способом по изобретению идентифицируют как пациента с низким риском развития RHD, связанного с инфекцией GAS, лечение антибиотиками может быть необязательным.

Понимание авторами изобретения того, что сыворотки здоровых индивидуумов демонстрируют высокую реакционную способность в отношении антигенов GAS, описываемую выше, позволяет предположить, что антитела против этих антигенов GAS могут играть защитную роль в профилактике развития RHD. Таким образом, изобретение относится к композиции, содержащей по меньшей мере один антиген GAS, выбранный из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или их функциональные эквиваленты. Изобретение также относится к композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело, специфически связывающееся по меньшей мере с одним антигеном GAS, выбранным из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или их функциональные эквиваленты. Эти композиции могут представлять собой иммуногенные композиции, например, вакцинные композиции.

По дополнительному аспекту изобретение относится к способу лечения или профилактики RHD, связанного с инфекцией GAS, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту по меньшей мере одного антигена GAS, выбранного из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или их функциональные эквиваленты. Изобретение дополнительно относится по меньшей мере к одному антигену GAS, выбранному из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или их функциональные эквиваленты, для применения для лечения или профилактики RHD, связанного с инфекцией GAS. Изобретение также относится к использованию по меньшей мере одного антигена GAS, выбранного из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или их функциональные эквиваленты, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики RHD, связанного с инфекцией GAS. Альтернативно, можно использовать молекулы

нуклеиновой кислоты, кодирующие эти антигены GAS.

Изобретение также относится к способу лечения или профилактики RHD, связанного с инфекцией GAS, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту по меньшей мере одного антитела, специфически связывающегося по меньшей мере с одним антигеном GAS, выбранным из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или их функциональные эквиваленты. Изобретение дополнительно относится по меньшей мере к одному антителу, специфически связывающемуся по меньшей мере с одним антигеном GAS, выбранным из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или их функциональные эквиваленты, для применения для лечения или профилактики RHD, связанного с инфекцией GAS. Изобретение также относится к использованию по меньшей мере одного антитела, специфически связывающегося по меньшей мере с одним антигеном GAS, выбранным из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или их функциональные эквиваленты, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики RHD, связанного с инфекцией GAS.

Как правило, антитела по изобретению специфически связываются с антигеном GAS с аффинностью 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 100 пМ или выше. Термин "антитело" включает интактные молекулы иммуноглобулинов, а также их фрагменты, которые способны к связыванию полипептида. Они включают гибридные (химерные) молекулы антител [1, 2]; фрагменты F(ab')<sub>2</sub> и F(ab) и молекулы Fv; нековалентные гетеродимеры [3, 4]; молекулы одноцепочечных Fv (sFv) [5]; конструкции димерных и тримерных фрагментов антител; минитела [6, 7]; молекулы гуманизированных антител [8-10] и любые функциональные фрагменты, получаемые из таких молекул, а также антитела, получаемые нетрадиционными способами, такими как фаговый дисплей. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой моноклональные антитела. Способы получения моноклональных антител хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой гуманизированные антитела или антитела человека полностью.

В композициях и способах лечения по изобретению можно использовать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 антигенов GAS, описанных выше, или антитела, которые специфически связываются с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или всеми 8 из этих антигенов GAS. Можно использовать комбинации антигенов GAS и антител, специфично связывающихся с этими антигенами.

Примеры комбинаций антигенов GAS, которые можно использовать в композициях и способах лечения по этому аспекту изобретения включают SEQ ID NO:1 и 2; SEQ ID NO:1 и 3; SEQ ID NO:1 и 4; SEQ ID NO:1 и 5; SEQ ID NO:2 и 3; SEQ ID NO:2 и 4; SEQ ID NO:2 и 5; SEQ ID NO:3 и 4; SEQ ID NO:3 и 5; SEQ ID NO:4 и 5; SEQ ID NO:1 и 6; SEQ ID NO:1 и 7; SEQ ID NO:1 и 8; SEQ ID NO:2 и 6; SEQ ID NO:2 и 7; SEQ ID NO:2 и 8; SEQ ID NO:3 и 6; SEQ ID NO:3 и 7; SEQ ID NO:3 и 8; SEQ ID NO:4 и 6; SEQ ID NO:4 и 7; SEQ ID NO:4 и 8; SEQ ID NO:5 и 6; SEQ ID NO:5 и 7; SEQ ID NO:5 и 8; SEQ ID NO:6 и 7; SEQ ID NO:6 и 8, или SEQ ID NO:7 и 8; SEQ ID NO:1, 2 и 3; SEQ ID NO:1, 3 и 4; SEQ ID NO:1, 4 и 5; SEQ ID NO:2, 3 и 4; SEQ ID NO:2, 4 и 5; SEQ ID NO:3, 4 и 5; SEQ ID NO:1, 2, 3 и 4; SEQ ID NO:2, 3, 4 и 5; SEQ ID NO:1, 3, 4 и 5; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 и 5; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7; SEQ ID NO:1, 3, 4, 5, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 5, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 6, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 7 и 8; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6 и 8 или их функциональные эквиваленты. Также можно использовать антитела, связывающиеся с этими комбинациями антигенов GAS.

Композиции и способы, описанные выше, в основном могут быть подходящими при

лечении и профилактики инфекции GAS, а также при лечении и профилактики RHD, связанного с инфекцией GAS.

Состав композиций для лечения и профилактики RHD

Как подробно описано выше, композиции по изобретению могут быть подходящими в качестве вакцин. Вакцины по изобретению могут быть профилактическими (т.е. для профилактики инфекции) или терапевтическими (т.е. для лечения инфекции), но, как правило, являются профилактическими.

Таким образом, композиции могут быть фармацевтически приемлемыми. Как правило, кроме антигенов они включают дополнительные компоненты, например, как правило, они включают один или несколько фармацевтических носителей и/или эксципиентов.

Как правило, композиции вводят человеку в водной форме. Однако перед введением композиция может находиться в неводной форме. Например, хотя некоторые вакцины производят в водной форме, а затем их заполняют и распределяют и вводят также в водной форме, другие вакцины при производстве лиофилизируют и восстанавливают в водную форму во время использования. Таким образом, композиция по изобретению может быть высушенной, такой как лиофилизированный состав.

Композиция может содержать консерванты, такие как тиомерсал или 2-феноксэтанол. Однако, предпочтительно, чтобы вакцина по существу не содержала (т.е. содержала менее 5 мкг/мл) веществ с ртутью, например, не содержала тиомерсала. Более типичными являются вакцины не содержащие ртути. Особенно предпочтительными являются вакцины, не содержащие консервантов.

Для улучшения термостабильности композиция может содержать термозащитное средство. Дополнительные подробности о таких средствах предоставлены далее.

Для контроля тоничности, как правило, она содержит физиологическую соль, такую как натриевая соль. Как правило, используют хлорид натрия (NaCl), который может присутствовать в количестве 1-20 мг/мл, например, приблизительно  $10 \pm 2$  мг/мл NaCl. Другие соли, которые могут присутствовать, включают хлорид калия, дигидрофосфат калия, дегидрат двузамещенного фосфата натрия, хлорид магния, хлорид кальция и т.д.

Как правило, осмоляльность композиции составляет от 200 мосмоль/кг до 400 мосмоль/кг, более часто 240-360 мосмоль/кг, а более типично находится в диапазоне 290-310 мосмоль/кг.

Композиции могут содержать один или несколько буферов. Характерные буферы включают: фосфатный буфер; буфер Tris; боратный буфер; сукцинатный буфер; гистидиновый буфер (в частности, с адъювантом гидроксидом алюминия) или цитратный буфер. Как правило, буферы добавляют в диапазоне 5-20 мМ.

Как правило, pH композиции составляет 5,0-8,1, а более характерно 6,0-8,0 например, 6,5 и 7,5, или 7,0-7,8.

Как правило, композиция является стерильной. Как правило, композиция также является апирогенной, например, содержащей <1 ЕЭ (единиц эндотоксинов, стандартный показатель) на дозу, например, <0,1 ЕЭ на дозу. Часто композиция не содержит глутена.

Композиция может содержать вещество для одной иммунизации, или может содержать вещество для нескольких иммунизаций (т.е. набор из "нескольких доз"). Для средств из нескольких доз типичным является введение консерванта. В качестве альтернативы (или дополнительно к) введению консерванта в композиции из нескольких доз, композиции могут содержаться в контейнере с асептическим адаптером для извлечения вещества.

Как правило, вакцины для человека вводят в объеме дозирования приблизительно 0,5 мл, хотя детям можно вводить половину дозы (т.е. приблизительно 0,25 мл).

Композиции по изобретению также могут содержать одно или несколько иммунорегулирующих средств. Часто одно или несколько иммунорегулирующих средств содержат один или несколько адъювантов. Адъюванты могут включать адъювант ТН1 и/или адъювант ТН2, дополнительно описываемые далее.

Адъюванты, которые можно использовать в композициях по изобретению, в качестве неограничивающих примеров включают:

А. Композиции, содержащие неорганические вещества

Композиции, содержащие неорганические вещества, подходящие для использования в качестве адъювантов по изобретению, включают соли неорганических кислот, такие как соли алюминия и кальциевые соли (или их смеси). Кальциевые соли включают фосфат кальция (например, частицы "САР", описываемые в ссылке 11). Соли алюминия включают гидроксиды, фосфаты, сульфаты и т.д., где соли находятся в любой подходящей форме (например, геля, кристаллической, аморфной и т.д.). Часто используют адсорбцию к этим солям. Композиции, содержащие неорганические вещества, также можно формулировать в виде частиц соли металла [12].

Можно использовать адъюванты, известные как гидроксид алюминия и фосфат алюминия. Эти названия являются общепринятыми, но их используют только для удобства, так как ни одно не является точным описанием действительно присутствующего химического соединения (например, см. главу 9 ссылки 13)). В изобретении можно использовать любые "гидроксидные" или "фосфатные" адъюванты, которые, как правило, используют в качестве адъювантов. Адъюванты, известные как "гидроксид алюминия", как правило, представляют собой соли гидроксида алюминия, которые, как правило, по меньшей мере частично являются кристаллическими. Адъюванты, известные как "фосфат алюминия", как правило, представляют собой гидроксифосфаты алюминия, часто также содержащие небольшое количество сульфата (т.е. сульфат гидроксифосфата алюминия). Их можно получать посредством осаждения, а условия реакции и концентрации при осаждении влияют на степень замещения фосфата на гидроксил в соли.

Для адъювантов гидроксида алюминия типична волокнистая морфология (например, как видно на микрофотографии с трансмиссионного электронного микроскопа). рI адъювантов гидроксида алюминия, как правило, составляет приблизительно 11 т.е. сам адъювант обладает положительным поверхностным зарядом при физиологическом рН. Опубликованная адсорбционная емкость для адъювантов гидроксида алюминия составляет 1,8-2,6 мг белка на мг  $Al^{+++}$  при рН 7,4.

Как правило, молярное отношение  $PO_4/Al$  адъювантов фосфата алюминия составляет 0,3-1,2, например, 0,8-1,2, как правило,  $0,95 \pm 0,1$ . Как правило, фосфат алюминия является аморфным, особенно в форме гидроксифосфатных солей. Типичный адъювант представляет собой аморфный гидроксифосфат алюминия с молярным отношением  $PO_4/Al$  0,84-0,92, содержащий 0,6 мг  $Al^{3+}$ /мл. Как правило, фосфат алюминия является частицей (например, пластиновидная морфология как видно на микрофотографиях с трансмиссионного электронного микроскопа). Типичные диаметры частиц после адсорбции любого антигена находятся в диапазоне 0,5-20 мкм (например, приблизительно 5-10 мкм). Опубликованная адсорбционная емкость для адъювантов фосфата алюминия составляет 0,7-1,5 мг белок на мг  $Al^{+++}$  при рН 7,4.

Точка нулевого заряда (PZC) фосфата алюминия обратно пропорционально связана

со степенью замещения фосфата гидроксидом, и эта степень замещения может варьировать в зависимости от условий реакции и концентрации реагентов, используемых для получения соли посредством осаждения. PZC также изменяется при изменении концентрации свободных ионов фосфата в растворе (больше фосфата = более кислая PZC) или при добавлении буфера, такого как гистидиновый буфер (делает PZC более основной). Как правило, PZC фосфатов алюминия, используемых по изобретению, составляет 4,0-7,0, например, 5,0-6,5 например, приблизительно 5,7.

Суспензии солей алюминия, используемые для получения композиций по изобретению, могут содержать буфер (например, фосфатный или гистидиновый или буфер Tris), но это не всегда необходимо. Суспензии часто являются стерильными и апирогенными. Суспензия может содержать свободные водные фосфатные ионы, например, присутствующие в концентрации 1,0-20 мМ, например, 5-15 мМ, например, приблизительно 10 мМ. Суспензии также может содержать хлорид натрия.

По изобретению можно использовать смесь гидроксида алюминия и фосфата алюминия. В этом случае может присутствовать больше фосфата алюминия, чем гидроксида, например, при массовом отношении по меньшей мере 2:1, например,  $\geq 5:1$ ,  $\geq 6:1$ ,  $\geq 7:1$ ,  $\geq 8:1$ ,  $\geq 9:1$  и т.д.

Концентрация  $Al^{+++}$  в композиции для введения млекопитающему, как правило, составляет менее 10 мг/мл, например,  $\leq 5$  мг/мл,  $\leq 4$  мг/мл,  $\leq 3$  мг/мл,  $\leq 2$  мг/мл,  $\leq 1$  мг/мл и т.д. Предпочтительно, диапазон составляет 0,3-1 мг/мл. Предпочтительно, 0,85 мг/дозу.

Особенно предпочтительны фосфаты алюминия, особенно в композициях, содержащих антиген сахарид H. influenzae, и типичный адъювант представляет собой аморфный гидроксифосфат алюминия с молярным отношением  $PO_4/Al$  0,84-0,92, добавляемый при 0,6 мг  $Al^{3+}$ /мл. Можно использовать адсорбцию с низкой дозой фосфата алюминия, например, 50-100 мкг  $Al^{3+}$  на конъюгат на дозу. Когда в композиции присутствует более одного конъюгата, не всем конъюгатам необходимо быть адсорбированными.

### В. Масляные эмульсии

Композиции масляных эмульсий, подходящие для использования в качестве адъювантов по изобретению, включают эмульсии сквален-вода, такие как MF59 [глава 10 ссылки 13; также см. ссылку 14] (5% сквалена, 0,5% Tween 80, и 0,5% Span 85, формулируемых в субмикронные частицы с использованием микрофлюидизатора). Также можно использовать полный адъювант Фрейнда (CFA) и неполный адъювант Фрейнда (IFA).

Известны различные эмульсионные адъюванты "масло-в-воде", и, как правило, они содержат по меньшей мере одно масло и по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество, где масло(а) и поверхностно-активное вещество(а) являются биологически разлагаемыми (метаболизруемыми) и биологически совместимыми. Как правило, для получения стабильных эмульсий капли масла в эмульсии в диаметре составляют менее 5 мкм, и в идеале имеют субмикронный диаметр, где этих малых размеров достигают с использованием микрофлюидизера. Предпочтительными являются капли с размером менее 220 нм, так как их можно подвергать стерилизации фильтрованием.

Эмульсия может содержать масла, такие как масла животного происхождения (такие как из рыб) или из овощных источников. Источники для растительных масел включают орехи, семена и зерна. Примерами ореховых масел являются арахисовое масло, соевое масло, кокосовое масло и оливковое масло, доступные чаще всего. Например, можно

использовать масло жожоба, получаемое из бобов жожоба. Масла семян включают сафлоровое масло, хлопковое масло, масло семян подсолнечника, масло семян кунжута и т.п. В группе зерновых наиболее легкодоступным является кукурузное масло, но также можно использовать масло других зерен злаков, таких как пшеница, овес, рожь, рис, тэфф, тритикале и т.п. Сложные эфиры глицерина и 1,2-пропандиола с 6-10 углеродными жирными кислотами, хотя они не встречаются в маслах семян в природе, можно получать посредством гидролиза, разделения и этерификации подходящих веществ, начиная от масла орехов и семян. Жиры и масла из молока млекопитающих являются метаболизируемыми и, таким образом, их можно использовать в практическом осуществлении настоящего изобретения. Способы разделения, очистка, омыления и другие способы, необходимые для получения чистых масел из животных источников, хорошо известны в данной области. Большинство рыб содержат метаболизируемые масла, которые можно легко выделять. Например, масло печени трески, масла печени акул и китовый жир, такой как спермацет, являются примерами некоторых масел рыб, которые можно использовать в настоящем документе. Ряд масел с разветвленной цепью синтезируют биохимически из 5-углеродных изопреновых единиц и, как правило, обозначают как терпеноиды. Масло печени акулы содержит разветвленные, ненасыщенные терпеноиды, известные как сквален, 2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексан, который особенно предпочтителен в настоящем документе. Также предпочтительным маслом является сквалан, насыщенный аналог сквалена. Масла рыб, включая сквален и сквалан, являются легкодоступными в коммерческих источниках, или их можно получать известными в данной области способами. Другими предпочтительными маслами являются токоферолы (см. ниже). Можно использовать смеси масел.

Поверхностно-активные вещества можно классифицировать по их "HLB" (гидрофильно/липофильному балансу). HLB предпочтительных поверхностно-активных веществ по изобретению составляет по меньшей мере 10, например, по меньшей мере 15, например, по меньшей мере 16. Изобретение можно использовать с поверхностно-активными веществами, включающими в качестве неограничивающих примеров: поверхностно-активные вещества сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана (как правило, обозначаемые как Tween), особенно полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO) и/или бутиленоксида (BO), продаваемые под торговой маркой DOWFAX™, такие как линейные блок-сополимеры EO/PO; октоксинолы, которые могут варьировать по числу повторяющихся этокси (окси-1,2-этандинных) групп, где особый интерес представляет октоксинол-9 (Triton X-100, или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол); (октилфеноксиполиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин (лецитин); нонилфенолэтоксилаты, такие как тергитол (Tergitol™) серии NP; простые жирные эфиры полиоксиэтилена, получаемые из лаурилового, цетилового, стеарилового и олеилового спиртов (известные как поверхностно-активные вещества Brij), такие как простой монолауриловый эфир триэтиленгликоля (Brij 30); и сложные сорбитановые эфиры (общеизвестные как SPAN), такие как триолеат сорбитана (Span 85) и сорбитанмонолаурат. Предпочтительными являются неионные поверхностно-активные вещества. Предпочтительными поверхностно-активными веществами для включения в эмульсию являются Tween 80 (полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат), Span 85 (триолеат сорбитана), лецитин и Triton X-100.

Можно использовать смеси поверхностно-активных веществ, например, смеси Tween 80/Span 85. Также подходит комбинация сложного эфира полиоксиэтиленсорбитана,

такого как полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (Tween 80), и октоксирола, такого как трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол (Triton X-100). Другая подходящая комбинация включает лаурет 9 и сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана и/или октоксирола.

Предпочтительные количества поверхностно-активных веществ (% по массе) представляют собой: сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана (такие как Tween 80) - от 0,01 до 1%, в частности приблизительно 0,1%; октил- или нонилфеноксиполиэтоксиэтанола (такие как Triton X-100 или другие детергенты в ряду Triton) - от 0,001 до 0,1%, в частности, 0,005-0,02%; простые эфиры полиоксиэтилена (такие как лаурет 9) 0,1-20%, например, 0,1-10% и, в частности, 0,1-1% или приблизительно 0,5%.

Средний размер капли предпочтительных эмульсионных адъювантов составляют <1 мкм, например, ≤750 нм, ≤500 нм, ≤400 нм, ≤300 нм, ≤250 нм, ≤220 нм, ≤200 нм или менее. Эти размеры капель можно подходящим способом получать такими способами, как микрофлюидизация.

Конкретные эмульсионные адъюванты "масло-в-воде", подходящие по изобретению, в качестве неограничивающих примеров включают:

- Субмикронную эмульсию сквалена, Tween 80 и Span 85. Композиция эмульсии по объему может составлять приблизительно 5% сквалена, приблизительно 0,5% полисорбата 80 и приблизительно 0,5% Span 85. В единицах массы, эти соотношения принимают вид 4,3% сквалена, 0,5% полисорбата 80 и 0,48% Span 85. Этот адъювант известен как "MF59" [15-17], как более подробно описано в главе 10 ссылки 18 и главе 12 ссылки 19. Эмульсия MF59, предпочтительно, содержит цитратные ионы например, 10 мМ буфер цитрата натрия.

- Эмульсию сквалена, токоферола и полисорбата 80 (Tween 80). Эмульсия может содержать фосфатно-солевой буфер. Она также может содержать Span 85 (например, в количестве 1%) и/или лецитин. Эти эмульсии могут содержать 2-10% сквалена, 2-10% токоферола и 0,3-3% Tween 80, и массовое отношение сквалена:токоферола, как правило, составляет ≤1, так как это обеспечивает более стабильную эмульсию. Сквален и Tween 80 могут находиться в объемном отношении приблизительно 5:2 или в массовом отношении приблизительно 11:5. Одну из таких эмульсий можно получать, растворяя Tween 80 в PBS с получением 2% раствора, затем смешивая 90 мл этого раствора со смесью (5 г DL-α-токоферола и 5 мл сквалена), затем подвергая смесь микрофлюидизации. Получаемая эмульсия может содержать субмикронные капли масла, например, со средним диаметром 100-250 нм, часто приблизительно 180 нм. Эмульсия также может содержать 3-де-О-ацилированный монофосфорилипид А (3d-MPL). Другая подходящая эмульсия этого типа в расчете на дозу для человека может содержать 0,5-10 мг сквалена, 0,5-11 мг токоферола и 0,1-4 мг полисорбата 80 [20].

- Эмульсию сквалена, токоферола и детергента Triton (например, Triton X-100). Эмульсия также может содержать 3d-MPL (см. ниже). Эмульсия может содержать фосфатный буфер.

- Эмульсию, содержащую полисорбат (например, полисорбат 80), детергент Triton (например, Triton X-100) и токоферол (например, α-токоферолсукцинат). Эмульсия может содержать эти три компонента в массовом отношении приблизительно 75:11:10 (например, 750 мкг/мл полисорбата 80, 110 мкг/мл Triton X-100 и 100 мкг/мл α-токоферолсукцината), и эти концентрации должны включать любой вклад в эти компоненты от антигенов. Эмульсия также может содержать сквален. Эмульсия также может содержать 3d-MPL (см. ниже). Водная фаза может содержать фосфатный буфер.

- Эмульсию сквалана, полисорбата 80 и полоксамера 401 ("Плюроник™ L121").



Эмульсию можно формулировать в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4. Эта эмульсия является пригодным носителем для доставки мурамилдипептидов, и ее используют с треонил-MDP в адьюванте "SAF-1" [21] (0,05-1% Thr-MDP, 5% сквалана, 2,5% плуроника L121 и 0,2% полисорбата 80). Ее также можно использовать без Thr-MDP, как в адьюванте "AF" [22] (5% сквалана, 1,25% плуроника L121 и 0,2% полисорбата 80). Предпочтительной является микрофлюидизация.

- Эмульсию, содержащую сквален, водный растворитель, гидрофильное неионное поверхностно-активное вещество простого эфира алкилполиоксиэтилена (например, простой полиоксиэтилен(12)цетостеариловый эфир) и гидрофобное неионное поверхностно-активное вещество (например, сложный сорбитановый эфир или сложный эфир маннида, такой как сорбитанмоноолеат или "Span 80"). Как правило, эмульсия является термообратимой и/или содержит по меньшей мере 90% масляных капель (по объему) с размером менее 200 нм [23]. Эмульсия также может содержать одно или несколько из: альдита; криопротектора (например, сахара, такого как додецилмальтозид и/или сахароза) и/или алкилполиглицозид. Эмульсия может содержать агонист TLR4 [24]. Такие эмульсии могут являться лиофилизированными.

- Эмульсию сквалена, полоксамера 105 и Abil-Care [25]. Конечная концентрация (масса) этих компонентов в вакцины с адьювантом составляет 5% сквалена, 4% полоксамера 105 (полиол-плуроник) и 2% Abil-Care 85 (диметикон Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16; каприловый/каприновый триглицерид).

- Эмульсию, содержащую 0,5-50% масла, 0,1-10% фосфолипида и 0,05-5% неионного поверхностно-активного вещества. Как описано в ссылке 26, предпочтительные фосфолипидные компоненты представляют собой фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерин, фосфатидная кислота, сфингомиелин и кардиолипин. Подходящими являются субмикронные размеры капель.

- Субмикронную эмульсию "масло-в-воде" неметаболизуемого масла (такого как легкое минеральное масло) и по меньшей мере одного поверхностно-активного вещества (такого как лецитин, Tween 80 или Span 80). Можно включать добавки, такие как сапонин QuilA, холестерин, конъюгат сапонин-липофил (такой как GPI-0100, описанный в ссылке 27, получаемый добавлением алифатического амина в дезацилсапонин посредством карбоксильной группы глюкуроновой кислоты), бромид диметилдиоктадециламмония и/или N,N-диоктадецил-N,N-бис-(2-гидроксиэтил)пропандиамин.

- Эмульсию, в которой сапонин (например, QuilA или QS21) и стерол (например, холестерин) связаны в виде спиральных мицелл [28].

- Эмульсию, содержащую минеральное масло, неионный липофильный этоксилированный жирный спирт и неионное гидрофильное поверхностно-активное вещество (например, этоксилированный жирный спирт и/или блок-сополимер полиоксиэтилена-полиоксипропилена) [29].

- Эмульсию, содержащую минеральное масло, неионный гидрофильный этоксилированный жирный спирт и неионное липофильное поверхностно-активное вещество (например, этоксилированный жирный спирт и/или блок-сополимер полиоксиэтилена-полиоксипропилена) [29].

В некоторых вариантах осуществления эмульсию можно смешивать с антигеном без подготовки, в момент доставки, и, таким образом, адьювант и антиген можно хранить отдельно в упакованной или распространяемой вакцине, готовой для конечного составления в момент использования. В других вариантах осуществления эмульсию смешивают с антигеном при производстве, и, таким образом, композицию упаковывают

в жидкой форме с адъювантом. Как правило, антиген находится в водной форме, такой как вакцина, и его окончательно получают, смешивая две жидкости. Соотношение объемов двух жидкостей для смешивания может варьировать (например, от 5:1 до 1:5), но, как правило, приблизительно составляет 1:1. Когда в приведенных выше описаниях конкретных эмульсий указаны концентрации компонентов, как правило, эти концентрации указаны для неразбавленной композиции, и, таким образом, концентрация после смешивания с раствором антигена будет уменьшаться.

Когда композиция содержит токоферол, можно использовать любые токоферолы из  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  или  $\xi$ , но предпочтительны  $\alpha$ -токоферолы. Токоферол может принимать несколько форм, например, различных солей и/или изомеров. Соли включают органические соли, такие как сукцинат, ацетат, никотинат и т.д. Можно использовать D- $\alpha$ -токоферол и DL- $\alpha$ -токоферол. Токоферолы преимущественно включают в вакцины для применения у пожилых людей (например, в возрасте 60 лет или старше), так как опубликовано, что витамин Е обладает положительным действием на иммунный ответ в этой группе пациентов [30]. Он также обладает свойствами антиоксиданта, что может помочь стабилизировать эмульсии [31]. Предпочтительный  $\alpha$ -токоферол представляет собой DL- $\alpha$ -токоферол, а предпочтительная соль этого токоферола представляет собой сукцинат. Выявлено, что соль янтарной кислоты *in vivo* взаимодействует со связанными с TNF лигандами.

С. Составы с сапонином [глава 22 ссылки 13]

Также в качестве адъювантов по изобретению можно использовать составы с сапонином. Сапонины представляют собой гетерогенную группу стероловых гликозидов и тритерпеноидных гликозидов, которые выявлены в коре, листьях, стеблях, корнях и даже цветах широкого диапазона видов растений. В качестве адъювантов широко исследовали сапонин из коры дерева *Quillaia saponaria* Molina. Сапонин также можно коммерческим способом получать из *Smilax ornata* (сассапариль), *Gypsophilla paniculata* (перекати поле) и *Saponaria officinalis* (мыльный корень). Адъюванты из составов с сапонином включают очищенные составы, такие как QS21, а также липидные составы, такие как ISCOM. QS21 продают как стимулон (Stimulon<sup>TM</sup>).

Композиции сапонины очищали с использованием ВЭЖХ и ВЭЖХ-ОФ. С использованием этих способов идентифицированы конкретные очищенные фракции, включающие QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B и QH-C. В некоторых случаях сапонин представляет собой QS21. Способ получения QS21 описан в ссылке 32. Составы с сапонином также могут содержать стерол, так как холестерин [33],

Можно использовать комбинации сапонинов и холестерина с формированием уникальных частиц, называемых иммуностимулирующими комплексами (ISCOM) [глава 23 ссылки 13]. Как правило, ISCOM также содержат фосфолипид, такой как фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин. В ISCOM можно использовать любой известный сапонин. В некоторых вариантах осуществления ISCOM содержит одно или несколько из QuilA, QHA и QHC. ISCOM дополнительно описаны в ссылках 33-35. Необязательно в ISCOMS можно не добавлять дополнительного детергента [36].

Обзор получения адъювантов на основе сапонины можно найти в ссылках 37 и 38.

D. Виросомы и вирусоподобные частицы

Также в качестве адъювантов по изобретению можно использовать виросомы и вирусоподобные частицы (VLP). Эти структуры, как правило, содержат один или несколько белков вируса, необязательно комбинированных или формулированных с фосфолипидом. Как правило, они являются непатогенными, нереплицирующимися и, как правило, не содержат ничего из природного генома вируса. Вирусные белки можно

рекомбинантно получать или выделять из целых вирусов. Эти вирусные белки, пригодные для использования в виросомах или VLP, включают белки, получаемые из вируса гриппа (такие как HA или NA), вируса гепатита В (такие как коровые белки или белки капсида), вируса гепатита Е, вируса кори, вируса Синдбис, ротавируса, вируса ящура, ретровируса, норовируса, вируса папилломы человека, ВИЧ, РНК-фагов, фага Q $\beta$  (такие как белки оболочки), фага GA, фага fr, фага AP205 и Ту (такие как белок ретротранспозона Ту р1). VLP дополнительно описаны в ссылках 39-44. Виросомы дополнительно описаны, например, в ссылке 45.

#### Е. Производные бактерий или микроорганизмов

Адьюванты, подходящие для использования по изобретению, включают производные бактерий или микроорганизмов, такие как нетоксические производные липополисахарида (LPS) энтеробактерий, производные липида А, иммуностимулирующие олигонуклеотиды и рибозилирующие АДФ токсины и их детоксицированные производные.

Нетоксические производные LPS включают монофосфориллипид А (MPL) и 3-О-деацилированный MPL (3dMPL). 3dMPL представляет собой смесь 3 де-О-ацилированного монофосфориллипид А с 4, 5 или 6 ацилированными цепями. Предпочтительная "малая частица", формируемая 3 де-О-ацилированным монофосфориллипидом А, описана в ссылке 46. Такие "малые частицы" 3dMPL являются достаточно малыми для стерилизации фильтрованием через 0,22 мкм мембрану [46]. Другие нетоксические производные LPS включают миметики монофосфориллипид А, такие как аминоксилглюкозаминидфосфатные производные, например, RC-529 [47,48].

Производные липида А включают производные липида А *Escherichia coli*, такие как OM-174. OM-174 описан, например, в ссылках 49 и 50.

Иммуностимулирующие олигонуклеотиды, подходящие для использования в качестве адьювантов по изобретению, включают нуклеотидные последовательности, содержащие мотив CpG (динуклеотидная последовательность, содержащая неметилованный цитозин, фосфатной связью связанный с гуанозином). Также известно, что иммуностимулирующими являются двухцепочечные РНК и олигонуклеотиды, содержащие палиндромные последовательности или последовательности поли(dG).

CpG могут содержать модификации/аналоги нуклеотидов, такие как тиофосфатные модификации, и могут быть двухцепочечными или одноцепочечными. В ссылках 51, 52 и 53 описаны возможные замены аналогами, например, замена гуанозина 2'-дезоксигуанозином. Адьювантное действие олигонуклеотидов CpG дополнительно описано в ссылках 54-59.

Последовательность CpG может быть направлена на TLR9, такой как мотив GTCGTT или TTCGTT [60]. Последовательность CpG может быть специфичной для индукции иммунного ответа Th1, такой как ODN CpG-A, или она может быть более специфичной для индукции В-клеточного ответа, такой как ODN CpG-B. ODN CpG-A и CpG-B описаны в ссылках 61-63. В некоторых вариантах осуществления CpG представляет собой ODN CpG-A.

В других вариантах осуществления олигонуклеотид CpG конструируют так, чтобы 5'-конец был доступным для распознавания рецептором. Необязательно, две олигонуклеотидные последовательности CpG можно соединять по их 3'-концам с формированием "иммуномеров". См., например, ссылки 60 и 64-66.

Подходящим адьювантом CpG является CpG7909, также известный как ProMune<sup>TM</sup> (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Другим является CpG1826. В качестве альтернативы или в дополнение использованию последовательностей CpG, можно использовать

последовательности TrG [67], и в этих олигонуклеотиды может отсутствовать неметилированные мотивы CpG. Иммуностимулирующий олигонуклеотид может быть богатым по пиримидинам. Например, он может содержать более одного последовательного тимидинового нуклеотида (например, TTTT, как описано в ссылке 5 67), и/или он может содержать композицию нуклеотидов с >25% тимидина (например, >35%, >40%, >50%, >60%, >80% и т.д.). Например, он может содержать более одного последовательного цитозинового нуклеотида (например, CCCC, как описано в ссылке 67), и/или он может содержать состав нуклеотидов с >25% цитозина (например, >35%, >40%, >50%, >60%, >80% и т.д.). Эти олигонуклеотиды могут не содержать 10 неметилированный мотив CpG. Как правило, иммуностимулирующие олигонуклеотиды содержат по меньшей мере 20 нуклеотидов. Они могут содержать менее 100 нуклеотидов.

Особенно подходящий адъювант на основе иммуностимулирующих олигонуклеотидов известен как IC-31<sup>TM</sup> [68]. Таким образом, адъювант, используемый по изобретению может содержать смесь (i) олигонуклеотида (например, из 15-40 нуклеотидов), 15 содержащего по меньшей мере один (а предпочтительно несколько) мотивов CpI (т.е. цитозина, связанного с инозином с формированием динуклеотида), и (ii) поликатионного полимера, такого как олигопептид (например, из 5-20 аминокислот), содержащего по меньшей мере одну (а предпочтительно несколько) последовательность(и) трипептида Lys-Arg-Lys. Олигонуклеотид может представлять собой дезоксинуклеотид, содержащий 20 26-членную последовательность 5'-(IC)<sub>13</sub>-3' (SEQ ID NO:427). Поликатионный полимер может представлять собой пептид, содержащий 11-членную аминокислотную последовательность KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO:426). Олигонуклеотид и полимер могут формировать комплексы, например, как описано в ссылках 69 и 70.

В качестве адъювантов по изобретению можно использовать бактериальные 25 рибозилирующие АДФ токсины и их детоксицированные производные. В некоторых вариантах осуществления белок получают из E.coli (термолабильный энтеротоксин E.coli "LT"), холеры ("СТ") или коклюша ("РТ"). Использование детоксицированных рибозилирующих АДФ токсинов в качестве слизистых адъювантов описано в ссылке 71, а в качестве парентеральных адъювантов - в ссылке 72. Токсин или токсин, как 30 правило, находится в форме голотоксина, содержащего субъединицы А и В. В некоторых вариантах осуществления субъединица А содержит детоксицирующую мутацию; субъединица В часто не мутирована. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой детоксицированный мутант LT, такой как LT-K63, LT-R72 и LT-G192. Использование рибозилирующих АДФ токсинов и их детоксицированных 35 производных, в частности, LT-K63 и LT-R72, в качестве адъювантов можно найти в ссылках 73-80. Подходящий мутант СТ представляет собой или СТ-E29H [81]. Числовые ссылки на замены аминокислот, как правило, основаны на выравниваниях субъединиц А и В рибозилирующих АДФ токсинов, проводимых в ссылке 82, конкретно, в полном 40 объеме включенной в настоящий документ в качестве ссылки.

#### 40 F. Иммуномодуляторы человека

Иммуномодуляторы человека, подходящие для использования в качестве адъювантов по изобретению, включают цитокины, такие как интерлейкины (например, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [83], и т.д.) [84], интерфероны (например, интерферон γ), макрофагальный колониестимулирующий фактор и фактор некроза опухоли. 45 Предпочтительным иммуномодулятором является IL-12.

#### G. Биоадгезивные и мукоадгезивные средства

Также в качестве адъювантов по изобретению можно использовать биоадгезивные и мукоадгезивные средства. Подходящие биоадгезивные средства включают микросферы

этерифицированной гиалуроновой кислоты [85] или мукоадгезивные средства, такие как поперечно-сшитые производные поли(акриловой кислоты), поливинилового спирта, поливинилпирролидона, полисахаридов и карбоксиметилцеллюлозы. Также в качестве адъювантов по изобретению можно использовать хитозан и его производные [86].

#### 5 Н. Микрочастицы

Также в качестве адъювантов по изобретению можно использовать микрочастицы. Предпочтительными являются микрочастицы (т.е. частицы с диаметром от ~100 нм до ~150 мкм, в некоторых вариантах осуществления с диаметром от ~200 нм до ~30 мкм, например, с диаметром от ~500 нм до ~10 мкм), получаемые из веществ, которые  
10 являются биологически разлагаемыми и нетоксическими (например, поли( $\alpha$ -гидроксикислота), полигидроксимасляная кислота, сложный полиортоэфир, полиангидрид, поликапролактон и т.д.), с сополимером лактида с гликолидом, необязательно, обрабатываемые так, чтобы иметь отрицательно заряженную поверхность (например, SDS) или положительно заряженную поверхность (например,  
15 катионным детергентом, таким как СТАВ).

#### I. Липосомы (главы 13 и 14 ссылки 13)

Примеры липосомных составов, подходящих для использования в качестве адъювантов, описаны в ссылках 87-89.

#### J. Составы простых эфиров полиоксиэтилена и сложных эфиров полиоксиэтилена

20 Адъюванты, подходящие для использования по изобретению, включают простые эфиры полиоксиэтилена и сложные эфиры полиоксиэтилена [90]. Такие составы дополнительно включают поверхностно-активные вещества сложного эфира полиоксиэтиленсорбитана в комбинации с октоксинолом [91], а также поверхностно-активные вещества простых эфиров или сложных эфиров полиоксиэтиленалкила в  
25 комбинации по меньшей мере с одним дополнительным неионным поверхностно-активным веществом, таким как октоксинол [92]. Предпочтительные простые эфиры полиоксиэтилена выбраны из следующей группы: простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (лаурет 9), простой полиоксиэтилен-9-стеариловый эфир, простой полиоксиэтилен-8-стеариловый эфир, простой полиоксиэтилен-4-лауриловый эфир, простой  
30 полиоксиэтилен-35-лауриловый эфир и простой полиоксиэтилен-23-лауриловый эфир.

#### К. Фосфазены

Можно использовать фосфазен, такой как поли[ди(карбоксилатфеноксифосфазен)] ("PCPP"), как описано, например, в ссылках 93 и 94.

#### L. Мурамилпептиды

35 Примеры мурамилпептидов, подходящих для использования в качестве адъювантов по изобретению, включают N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетилнормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (nor-MDP) и N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси) этиламин MTP-PE).

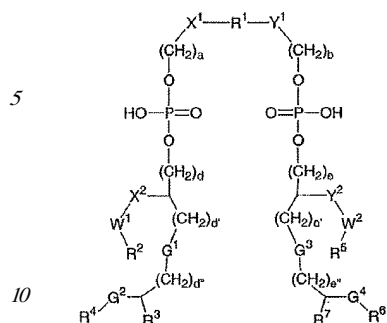
#### 40 М. Имидазохинолоновые соединения.

Примеры имидазохинолоновых соединений, подходящих для использования в качестве адъювантов по изобретению, включают имиквимод (Imiquimod) ("R-837") [95,96], резиквимод (Resiquimod) ("R-848") [97] и их аналоги и их соли (например, гидрохлоридные соли). Дополнительные подробности об иммуностимулирующих  
45 имидазохинолинах можно найти в ссылках 98-102.

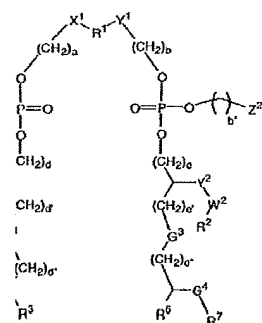
#### N. Замещенные карбамиды

Замещенные карбамиды, подходящие в качестве адъювантов, включают соединения формул I, II или III или их соли:

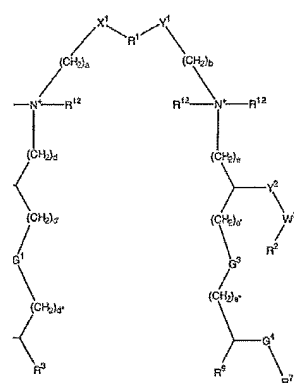
I



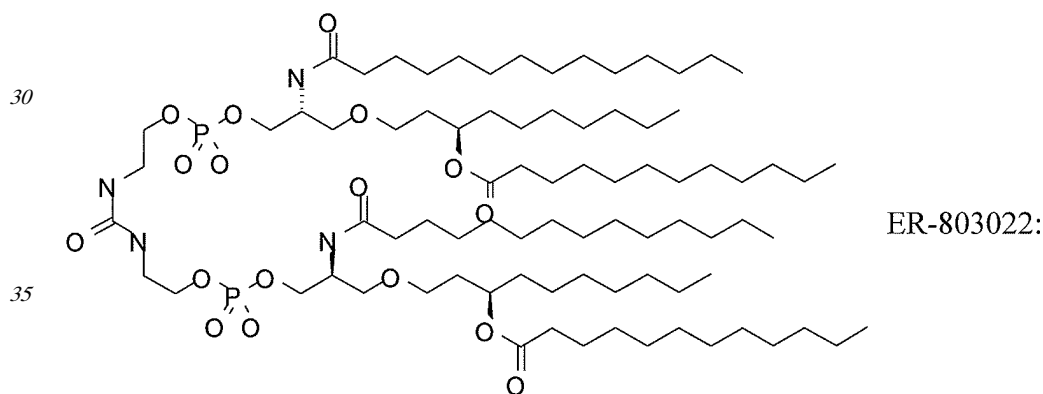
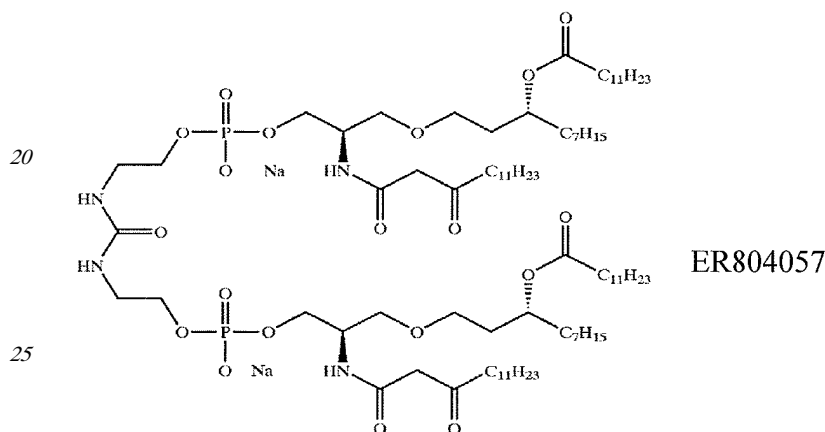
II



III



как определено в ссылке 103, такие как, например, "ER 803058", "ER 803732", "ER 804053", "ER 804058", "ER 804059", "ER 804442", "ER 804680", "ER 804764", "ER 803022" или "ER 804057":



#### О. Дополнительные адьюванты

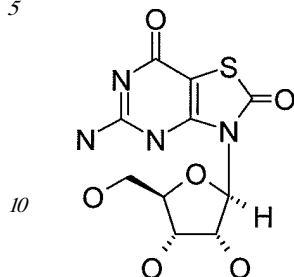
Дополнительные адьюванты, которые можно использовать по изобретению, включают:

- Фосфатное производное аминокликозаминаида, такое как RC-529 [104,105],
- Тиосемикарбазоновое соединение, такое как тиосемикарбазоновые соединения, описываемые в ссылке 106. Способы формулирования, производства и скрининга активных соединений также описаны в ссылке 106. Тиосемикарбазоны являются особенно эффективными при стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови человека для продукции цитокинов, таких как TNF-α.
- Триптантриновое соединение, такое как триптантриновые соединения, описываемые в ссылке 107. Способы формулирования, производства и скрининга активных соединений

также описаны в ссылке 107. Тиосемикарбазоны являются особенно эффективными при стимуляции моноклеарных клеток периферической крови человека для продукции цитокинов, таких как TNF- $\alpha$ .

- Аналог нуклеозида, такой как: (а) изаторабин (ANA-245; 7-тиа-8-оксогуанозин):

5



10

и его пролекарственные средства; (b) ANA975; (c) АНК-025-1; (d) ANA380; (e) соединения, описываемые в ссылках 108-110, локсорибин (7-аллил-8-оксогуанозин) [111].

15

- Соединения, описываемые в ссылке 112, включая: ацилпиперазиновые соединения, индолдионовые соединения, тетрагидраизохинолиновые (THIQ) соединения, бензоциклодионовые соединения, аминоксавиниловые соединения, аминоксавинидазолхинолиновые (ABIQ) соединения [113,114], гидрофталамидные соединения, бензофеноновые соединения, изоксазоловые соединения, стероловые соединения, хиразириновые соединения, пирроловые соединения [115], антрахиноновые соединения, хиноксалиновые соединения, триазиновые соединения, пиразалопиримидиновые соединения и бензасоловые соединения [116].

20

- Соединения, содержащие липиды, связанные с фосфатсодержащим ациклическим каркасом, такие как антагонист TLR4 E5564 [117,118].

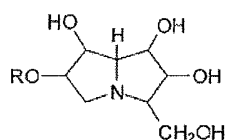
25

- Полиоксидоновый полимер [119,120] или другое N-окисленное полиэтиленпиперазиновое производное.

- Метилинозин-5'-монофосфат ("MIMP") [121].

- Полигидроксированное пирролизидиновое соединение [122], такое как соединение формулы:

30



35

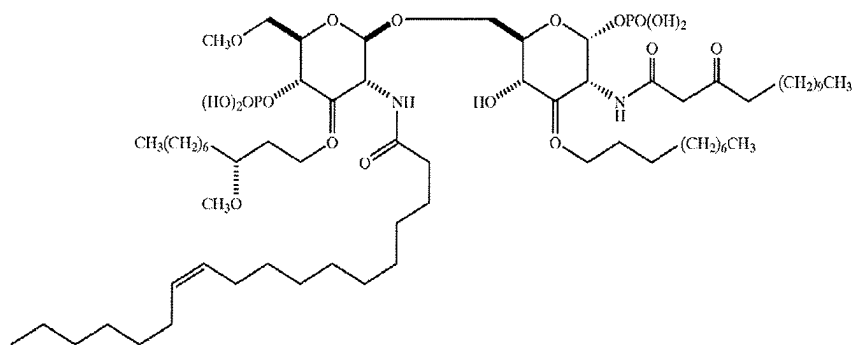
где R выбран из группы, включающей водород, неразветвленные или разветвленные, незамещенные или замещенные, насыщенные или ненасыщенные ацильные, алкильные (например, циклоалкильные), алкенильные, алкинильные и арильные группы или их фармацевтически приемлемые соли или производные. Примеры в качестве неограничивающих примеров включают: казуарин, казуарин-6- $\alpha$ -D-глюкопираноза, 3-эпи-казуарин, 7-эпи-казуарин, 3,7-ди-эпи-казуарин и т.д.

40

- Лиганд CD1d, такой как  $\alpha$ -гликозилцерамид [123-130] (например,  $\alpha$ -галактозилцерамид), содержащий фитосфингозин  $\alpha$ -гликозилцерамиды, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-( $\alpha$ -D-галактопиранозил)-2-(N-гексакозаноиламино)-1,3,4-октадекантриол], CRONY-101, 3"-O-сульфогалактозилцерамид и т.д.

45

- Гамма-инулин [131] или его производное, такое как альгаммулин.



#### Комбинации адъювантов

Изобретение также может содержать комбинации одного или нескольких из адъювантов, указанных выше. Например, по изобретению можно использовать следующие композиции адъювантов: (1) сапонин и эмульсия "масло-в-воде" [132]; (2) сапонин (например, QS21) + нетоксическое производное LPS (например, 3dMPL) [133]; (3) сапонин (например, QS21) + нетоксическое производное LPS (например, 3dMPL) + холестерин; (4) сапонин (например, QS21) + 3dMPL + IL-12 (необязательно + стерол) [134]; (5) комбинации 3dMPL, например, с QS21 и/или эмульсиями "масло-в-воде" [135]; (6) SAF, содержащий 10% сквалана, 0,4% Tween 80<sup>TM</sup>, 5% плуроник-блок-полимер L121 и thr-MDP, микрофлюидизированные в субмикронную эмульсию или перемешанные на центрифуге типа "вортекс" с получением эмульсии с большим размером частиц. (7) адъювантную систему Ribi<sup>TM</sup> (RAS), (Ribi Immunochem), содержащую 2% сквалана, 0,2% Tween 80 и один или несколько компонентов стенки бактериальной клетки из группы, состоящей из монофосфорилипидов A (MPL), димиколата трегалозы (TDM) и каркаса клеточной стенки (CWS), предпочтительно, MPL+CWS (Detox<sup>TM</sup>); и (8) одну или несколько солей неорганических кислот (такие как соль алюминия)+нетоксическое производное LPS (такое как 3dMPL).

Другие вещества, которые действуют в качестве иммуностимулирующих средств, описаны в главе 7 ссылки 13.

Типичным является использование адъюванта с гидроксидом алюминия и/или фосфатом алюминия, и антигенов, которые, как правило, адсорбируются на эти соли. Другим характерным адъювантом является фосфат кальция. Другие комбинации адъювантов включают комбинации адъювантов Th1 и Th2, таких как CpG и алюминий или резиквимод и алюминий. Можно использовать комбинацию фосфата алюминия и 3dMPL.

Композиции по изобретению могут вызывать клеточный иммунный ответ, а также гуморальный иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать долговечные (например, нейтрализующие) антитела и клеточный иммунитет, который может быстро отвечать при воздействии пневмококка.

Полагают, что, в основном, для инициации и/или усиления клеточного и гуморального иммунитета необходимы два типа Т-клеток, CD4 и CD8 клетки. CD8 Т-клетки могут экспрессировать корецептор CD8, и их, как правило, обозначают как цитотоксические Т-лимфоциты (CTL). CD8 Т-клетки способны распознавать антигены, представленные на молекулах МНС класса I, и взаимодействовать с ними.

CD4 Т-клетки могут экспрессировать корецептор CD4, и их, как правило, обозначают как клетки Т-хелперы. CD4 Т-клетки способны распознавать антигенные пептиды, связанные с молекулами МНС класса II. После взаимодействия с молекулой МНС класса II, CD4 клетки могут секретировать такие факторы, как цитокины. Эти секретируемые цитокины могут активировать В-клетки, цитотоксические Т-клетки, макрофаги и другие



клетки, участвующие в иммунном ответе. Клетки Т-хелперы или CD4<sup>+</sup>-клетки можно дополнительно подразделять на две функционально различающихся субпопуляции: с фенотипом TH1 и с фенотипом TH2, которые отличаются по их цитокинам и эффекторной функции.

Активированные TH1 клетки усиливают клеточный иммунитет (включая увеличение продукции специфичных для антигена CTL) и, таким образом, имеют особое значение в ответе на внутриклеточные инфекции. Активированные TH1 клетки могут секретировать одно или несколько из IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\beta$ . Иммунный ответ TH1 может приводить к локальным воспалительным реакциям посредством активированных макрофагов, клеток NK (естественных киллеров) и CD8 цитотоксических Т-клеток (CTL). Иммунный ответ TH1 также может воздействовать на усиление иммунного ответа, посредством стимуляции роста В- и Т-клеток IL-12. Стимулированные TH1 В-клетки могут секретировать IgG2a.

Активированные TH2 клетки увеличивают продукцию антител и, таким образом, имеют значение в ответе на внеклеточные инфекции. Активированные TH2 клетки могут секретировать одно или несколько из IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10. Иммунный ответ TH2 может приводить к продукции IgG1, IgE, IgA и В-клеток памяти для защиты в будущем.

Усиленный иммунный ответ может включать один или несколько из развитых иммунного ответа TH1 и иммунного ответа TH2.

Иммунный ответ TH1 может включать одно или несколько из увеличения количества CTL, увеличения количества одного или нескольких из цитокинов, связанных с иммунным ответом TH1 (таких как IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\beta$ ), увеличение количества активированных макрофагов, увеличения активности NK или увеличения продукции IgG2a. В некоторых вариантах осуществления развитый иммунный ответ TH1 включает увеличение продукции IgG2a.

Иммунный ответ TH1 можно вызывать с использованием адъюванта TH1. Как правило, адъювант TH1 вызывает увеличенные уровни продукции IgG2a относительно иммунизации антигеном без адъюванта. Адъюванты TH1, подходящие для использования по изобретению, могут включать, например, составы сапонины, виросомы и вирусоподобные частицы, нетоксические производные липополисахарида (LPS) энтеробактерий, иммуностимулирующие олигонуклеотиды. Характерными адъювантами TH1 для применения по изобретению являются иммуностимулирующие олигонуклеотиды, такие как олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG.

Иммунный ответ TH2 может включать одно или несколько из увеличения количества одного или нескольких из цитокинов, связанных с иммунным ответом TH2 (таких как IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10), или увеличения продукции IgG1, IgE, IgA и В-клеток памяти. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ TH2 включает увеличение продукции IgG1.

Иммунный ответ TH2 можно вызывать с использованием адъюванта TH2. Адъювант TH2, как правило, вызывает увеличенные уровни продукции IgG1 относительно иммунизации антигеном без адъюванта. Адъюванты TH2, подходящие для использования по изобретению, включают, например, содержащие неорганические вещества композиции, масляные эмульсии и рибозилирующие АДФ токсины и их детоксицированные производные. Характерными адъювантами TH2 для применения по изобретению являются содержащие неорганические вещества композиции, такие как соли алюминия.

В некоторых вариантах осуществления изобретение включает композицию,

содержащую комбинацию адъюванта ТН1 и адъюванта ТН2. Часто такая композиция вызывает усиленный ответ ТН1 и усиленный ответ ТН2, т.е., увеличивает продукцию IgG1 и IgG2a относительно иммунизации без адъюванта. Как правило, композиция, содержащая комбинацию адъювантов ТН1 и ТН2, вызывает увеличенный иммунный  
 5 ответ ТН1 и/или увеличенный иммунный ответ ТН2 относительно иммунизации одним адъювантом (т.е., относительно иммунизации только адъювантом ТН1 или иммунизации только адъювантом ТН2).

Иммунный ответ может представлять собой один из иммунных ответа ТН1 и иммунного ответа ТН2 или оба. Иммунный ответ может предусматривать один из  
 10 усиленного ответа ТН1 или усиленного ответа ТН2 или оба.

Усиленный иммунный ответ может представлять собой один из системного иммунного ответа и слизистого иммунного ответа или оба. Иммунный ответ может предусматривать один из усиленного системного иммунного ответа и усиленного слизистого иммунного ответа или оба. Как правило, слизистый иммунный ответ представляет собой иммунный  
 15 ответ ТН2. Как правило, слизистый иммунный ответ включает увеличение продукции IgA.

Композиции можно получать в виде инъектируемого препарата, в жидких растворах или суспензиях. Также можно получать твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования до инъекции в жидких носителях (например, лиофилизированная  
 20 композиция или композиция лиофилизированная посредством распыления). Композицию можно получать для местного введения, например, в виде мази, крема или порошка. Композицию можно получать для перорального введения, например, в виде таблетки или капсулы, в виде спрея или в виде сиропа (необязательно ароматизированных). Композицию можно получать для легочного введения, например, в виде ингалятора с  
 25 использованием тонкодисперсного порошка или спрея. Композицию можно получать в виде суппозитория или пессария. Композицию можно получать для назального, ушного или глазного введения, например, в виде капель. Композиция может находиться в форме набора, разработанного так, чтобы восстанавливать комбинированную композицию непосредственно перед введением млекопитающему. Такие наборы могут  
 30 содержать один или несколько антигенов в жидкой форме и один или несколько лиофилизированных антигенов.

Когда композиция предназначена для получения непосредственно перед использованием (например, когда компонент представлен в лиофилизированной форме) и присутствует в наборе, набор может содержать два флакона, или он может содержать  
 35 один готовый заполненный шприц и один флакон, где перед инъекцией содержимое шприца используют для реактивации содержимого флакона.

Композиции, используемые в качестве вакцин, содержат иммунологически эффективное количество антигена(ов), а также любые другие компоненты по мере необходимости. Под "иммунологически эффективным количеством" подразумевают,  
 40 что введение этого количества индивидууму, в однократной дозе или как часть серии, является эффективным для лечения или профилактики. Это количество варьирует в зависимости от состояния здоровья и физического состояния индивидуума, подлежащего лечению, возраста, таксономической группы индивидуума, подлежащего лечению (например, не являющийся человеком примат, примат и т.д.), способности иммунной  
 45 системы индивидуума синтезировать антитела, желаемой степени защиты, состава вакцины, оценки медицинского состояния лечащим врачом и других значимых факторов. Полагают, что количество будет попадать в относительно широкий диапазон, который можно определять посредством стандартных исследований. Когда в композицию

включены более одного антигена, тогда два антигена могут присутствовать в той же дозе, что и другой, или в различных дозах.

Как указано выше, композиция может содержать термозащитное средство, и этот компонент может быть особенно пригодным в композициях с адъювантами (особенно в тех, которые содержат неорганический адъювант, такой как соль алюминия). Как описано в ссылке 136, жидкое термозащитное средство можно добавлять в водную вакцинную композицию для снижения ее точки замерзания, например, для снижения точки замерзания до температуры ниже 0°C. Таким образом, композицию можно хранить при температуре ниже 0°C, но выше ее точки замерзания, для ингибирования теплового разрушения. Также термозащитное средство обеспечивает замораживание композиций при защите адъювантов с неорганическими солями от агломерации или осаждения после замораживания и оттаивания, а также может защищать композицию от повышенных температур, например, выше 40°C. Исходную водную вакцину и жидкое термозащитное средство можно смешивать так, что жидкое термозащитное средство составляет 1-80% от объема конечной смеси. Подходящие термозащитные средства должны быть безопасны для введения человеку, легко смешиваться/растворяться в воде, и не должны повреждать другие компоненты (например, антиген и адъювант) в композиции. Примеры включают глицерин, пропиленгликоль и/или полиэтиленгликоль (PEG). Средняя молекулярная масса подходящих PEG может находиться в диапазоне 200-20000 Да. В одном из вариантов осуществления средняя молекулярная масса полиэтиленгликоля составляет приблизительно 300 Да ("PEG-300").

Изобретение относится к композиции, содержащей: (i) один или несколько антигенов и (ii) термозащитное средство. Эту композицию можно составлять, смешивая (i) водную композицию, содержащую один или несколько антигенов, с (ii) термозащитным средством. Затем смесь можно хранить, например, ниже 0°C, при 0-20°C, при 20-35°C, при 35-55°C или более. Ее можно хранить в жидкой или замороженной форме. Смесь может быть лиофилизированной. Альтернативно композицию можно составлять, смешивая (i) высушенную композицию, содержащую один или несколько антигенов, с (ii) жидкой композицией, содержащей термозащитное средство. Таким образом, компонент (ii) можно использовать для восстановления компонента (i).

Функциональные эквиваленты:

SEQ ID NO, используемые для идентификации антигенов GAS, которые можно использовать в способах, белковых чипах и в медицинских применениях по изобретению, описанных выше, представляют собой полноразмерные последовательности этих антигенов GAS.

Способы, белковые чипы и медицинские применения по изобретению не ограничены применением этих полноразмерных антигенов GAS, но также включают любой "функциональный эквивалент" любого из этих антигенов GAS.

Как применяют в настоящем документе термин "функциональный эквивалент" предназначен для включения вариантов антигенов GAS с полноразмерными последовательностями, представленными в списке последовательностей, которые сохраняют способность взаимодействовать с антителами к полноразмерному антигену GAS, присутствующему в биологическом объекте, и которые, таким образом, можно использовать вместо полноразмерных антигенов GAS.

Таким образом, термин "функциональный эквивалент" включает фрагменты полноразмерных антигенов GAS, с последовательностями, приведенными в списке последовательностей. Такие фрагменты могут сохранять способность связываться с антителами, которые связываются с полноразмерными антигенами GAS.

Функциональные эквиваленты по изобретению могут связываться с антителами, получаемыми к полноразмерному антигену GAS с аффинностью по меньшей мере  $10^{-7}$  М.

Фрагменты включают по меньшей мере  $n$  последовательных аминокислот последовательностей полноразмерных антигенов GAS, где  $n$  представляет собой 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Фрагменты могут содержать эпитоп из полноразмерной последовательности антигена GAS. Дополнительно во фрагментах могут отсутствовать одна или несколько аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) на С-конце и/или одна или несколько аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) на N-конце полноразмерной последовательности. Например, фрагменты, которые можно использовать в способах и чипах по изобретению, включают фрагменты, в которых отсутствуют лидерные последовательности и/или трансмембранные последовательности, представленные в полноразмерных антигенах GAS.

Дополнительные примеры фрагментов, которые можно использовать в способах и чипах по изобретению, включают N-концевые фрагменты. Примеры таких фрагментов включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9 (которая представляет собой N-концевой фрагмент последовательности SEQ ID NO:5), и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:10 (которая представляет собой N-концевой фрагмент SEQ ID NO:4).

Также термин "функциональный эквивалент" включает варианты полноразмерных белков GAS с заменами аминокислот и фрагменты таких вариантов. Варианты могут обладать 50% или большей идентичностью (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более) с последовательностями полноразмерных антигенов GAS, предоставленными в настоящем документе. По сравнению с последовательностью антигена GAS, приведенной в списке последовательностей, варианты могут содержать консервативные аминокислотные замены. Такие характерные замены находятся в числе Ala, Val, Leu и Ile; в числе Ser и Thr; в числе кислых остатков Asp и Glu; в числе Asn и Gln; в числе основных остатков Lys и Arg или в числе ароматических остатков Phe и Tyr.

Термин "функциональный эквивалент" дополнительно включает более протяженные варианты антигенов GAS, включающие слитые белки, содержащие дополнительные молекулы, которые химически или генетически связаны с антигеном GAS. Например, к антигену GAS можно присоединять метку, облегчающую его локализацию на белковом чипе или облегчающую детекцию, когда он связан с антителом. Примеры таких меток включают аналитически детектируемый реагент, такой как радиоактивный изотоп, флуоресцентную молекулу или фермент. Альтернативно, антиген GAS можно сливать с доменом, облегчающим его исходную очистку, таким как гистидиновый домен или домен GST.

Также термин "функциональный эквивалент" включает миметики антигенов GAS, вариантов и фрагментов, описанных выше, которые структурно сходны с антигенами GAS и сохраняют способность связываться с антителами против полноразмерных антигенов GAS.

Общая часть

Термин "содержащий" включает "включающий", а также "состоящий" например, композиция "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может включать что-нибудь дополнительно, например, X+Y.

Выражение "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, которая

"по существу не содержит" Y может совсем не содержать Y. Если необходимо, выражение "по существу" в определении по изобретению может быть пропущено.

Термин "приблизительно" по отношению к числовому значению x означает, например,  $x \pm 10\%$ .

5 Если конкретно не указано, способ, включающий стадию смешивания двух или более компонентов, не требует никакого конкретного порядка смешивания. Таким образом, компоненты можно смешивать в любом порядке. Когда присутствуют три компонента, тогда два компонента можно комбинировать друг с другом, а затем комбинацию можно комбинировать с третьим компонентом и т.д.

10 Идентичность полипептидных последовательностей предпочтительно, определяют по алгоритму поиска гомологии Смита-Ватермана, как применяют в программе MPSRCH (Oxford Molecular), с использованием поиска аффинных пропусков с параметрами штраф за создание пропуска = 12 и штраф за продление пропуска = 1.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

15 Фигура 1. Возрастное распределение пациентов с ревматическим пороком сердца (RHD) и йеменских здоровых доноров крови (YHD), у которых собирали сыворотки. Представлены выбранные для исследования образцы сыворотки совпадающих по возрасту индивидуумов.

Фигура 2. Получение и подтверждение белковых микрочипов. А, анализ SDS-PAGE  
20 очищенных рекомбинантных белков GAS, окрашенных Кумасси. На дорожке 1 находятся маркеры молекулярной массы. В, Типичное изображение чипа после инкубации с сывороткой человека и с мечеными  $\text{Cu}^3$  антителами против IgG человека и мечеными  $\text{Cu}^5$  антителами против IgM человека. Выделены повторы тестируемых антигенов и отрицательных и положительных контролей IgG и IgM. С, графическое  
25 представление контрольной кривой IgG человека. Ниже графика представлено изображение чипа с различными концентрациями IgG, выявляемое при инкубации с антителами против IgG человека- $\text{Cu}^3$ . D, Способ нормализации данных на основе сигмовидной кривой. Данные нормализовали с использованием сигмовидной контрольной кривой (черной), выравнивая по эталонной сигмовидной кривой (красная;  
30 id, идеальная сигмовидная кривая; P и P', точки пересечения ненормализованных, Val, и нормализованных, N(Val), значений MFI на экспериментальной и эталонной сигмовидных кривых; HL, значения, соответствующие нормализованным значениям MFI 30000; LL представляют собой нормализованные значения MFI 15000.

Фигура 3. Процент йеменских и итальянских здоровых доноров сыворотки с высоким  
35 ответом ( $\text{MFI} > 30000$ ) на антигены GAS. Антигены представлены в порядке снижения ответа.

Фигура 4. Сравнение иммунореактивности 40 YHD (темно-серый на фигуре 4) и 43 RHD (светло-серый на фигуре 4) сывороток совпадающих по возрасту отобранных людей. Нормализованные значения FI (MFI) подвергали неконтролируемой двумерной  
40 иерархической кластеризации с использованием специализированного программного обеспечения (программное обеспечение TIGR Multiexperiment Viewer (MeV) (<http://www.tigr.org/software/tm4/mev.html>) с определением профилей распознавания антигенов в двух группах сывороток, что привело к идентификации двух основных групп с высоким распознаванием антигенов (1 и 2 на фигуре 4А, также представлено на фигуре 4В). Этот  
45 кластерный анализ распределял сыворотки от высокой реакционной способности (слева) к меньшей реакционной способности (справа). Можно различить две основные группы сывороток с группой с высокой реакционной способностью, в основном включающей сыворотки здоровых доноров (А слева на фигуре 4), и второй группой,

демонстрирующей меньшую реакционную способность и в основном включающей сыворотки пациентов с RHD (группа В на фигуре 4).

5 Фигура 5. Применение кластерного анализа К-средних с классификацией антигенов GAS, присутствующих на чипе в 10 кластеров (от КА1 до КА10), вызывающих сходные профили распознавания. Идентифицировано, что четыре из кластеров антигенов (номера КА1, КА5, КА9, КА10) содержали антигены с большими значениями флуоресценции, чем остальные кластеры. В кластере КА1 наиболее реактивные сыворотки содержали большое количество YHD, что позволяет предполагать наличие на чипе группы антигенов, реакционную способность которых обеспечивает установление различий 10 между сыворотками, получаемыми у здоровых доноров, и сыворотками, получаемыми у пациентов с RHD.

Фигура 6. Идентификация кластеров антигенов, обеспечивающих установление различий между здоровыми контролями и пациентами с RHD. Сыворотки из кластера КА1 на фигуре 6 дополнительно классифицировали на основе их профилей 15 распознавания с различными группами антигенов с использованием одномерного иерархического кластерного анализа, обеспечивающего определение двух кластеров сывороток HS1 (фиолетовая рамка) и HS2 (синяя рамка). Количества сывороток, полученных у здоровых контролей, и сывороток, полученных у пациентов, присутствующие или отсутствующие в каждом из двух кластеров, указаны на фигуре 20 6В. Большинство YHD можно найти в кластере с высокой реакционной способностью, синий, кластер HS2, тогда как большинство сывороток RHD находятся в кластере с низкой реакционной способностью, фиолетовый, кластер HS1. Возможность установить отличия между двумя группами сывороток с использованием теста этого типа определяли по специфичности и чувствительности (фигура 6С). Для этой конкретной 25 группы антигенов, получали значения специфичности и чувствительности 0,73 и 0,69. На фигуре 6С также представлен идеальный теоретический пример максимума специфичности и чувствительности (значения 1).

Фигура 7. Анализ, описанный на фигуре 6, применяли для других кластеров антигенов: КА5 (В), КА9 (С), КА10 (D), КА5+М9 (Е), GAS5+GAS5F+GAS25+GAS40 (F), GAS5+ 30 GAS5F+GAS25+GAS40+GAS57 (G), GAS5+GAS25+GAS40+GAS57 (H), GAS5F+GAS25+GAS40+GAS57 (I). Для каждого кластера представлены значения специфичности и чувствительности.

## СПОСОБЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Введение

35 Авторы разработали белковый микрочип, содержащий 130 антигенов рекомбинантных белков GAS. Чип являлся устройством для выбора антигенов, вызывающий высокий ответ антителами у пациентов с фарингитом, а также позволял выявить высокий ответ против антигенов GAS в сыворотках, полученных у пациентов с тиковым заболеванием, убедительно свидетельствуя, что зависимость от антигенов GAS 40 индукция аутоантител у чувствительных индивидуумов может быть вовлечена в возникновение тиковых нарушений (Bombaci M, et al. 2009 PLoS ONE 4, 7: e6332. doi: 10.1371).

В настоящем изобретении авторы использовали белковый микрочип для анализа иммунного ответа на 130 рекомбинантных белков GAS у пациентов с RHD и здоровых 45 доноров с целью идентификации профилей распознавания антигенов, позволяющих авторам различить две группы. Этот подход привел к идентификации кластера антигенов, высокораспознаваемых здоровыми донорами, но не пациентами с RHD, что может определять основу для диагностического теста.

## Материалы и способы

### Сыворотки человека

Сыворотки у пациентов с ревматическим пороком сердца собирали у 60 пациентов мужского или женского пола из ближневосточного государства (Йемен) в возрасте 11-40 лет с наличием клинических симптомов RHD.

Известно, что титры антител против GAS варьируют в зависимости от ряда факторов, включая возраст и географическое происхождение. Фактически, титры антител к GAS у здоровых людей в раннем детском возрасте являются низкими, достигая пика у детей в возрасте от 5 до 15 лет, снижаясь в позднеподростковом возрасте и раннем периоде взрослого возраста, а затем после этого выходя на плато. По этой причине, сравнение между сыворотками в группах с ревматическим пороком сердца (RHD) и здоровых контрольных йеменских доноров (YHD) проводили с использованием групп одного и того же возрастного диапазона (в возрасте 17-40 лет), таким образом, исключая сыворотки пациентов с RHD в возрасте 11-16 лет, для которых контрольных сывороток в наличии не было. Конечное количество сывороток, используемых для сравнения, составляло 40 YHD и 43 RHD.

На фигуре 1 представлен анализ распределения двух доступных групп и групп, выбранных для исследования.

Кроме того, в качестве дополнительного к здоровым йеменцам сравнения, использовали коллекцию из 20 сывороток, полученных у здоровых доноров итальянцев (IHD), учитывая более частое использование профилактики инфекций GAS антибиотиками в указанной выше западной группе.

Все образцы сыворотки являлись остаточными, полученными при регулярном медицинском контроле при диагностике RHD или при заборе крови, и были предоставлены Department of Child and Adolescent Neuropsychiatry, University La Sapienza, Rome.

### Микрочип белков GAS

Белковый чип получали, нанося на нитроцеллюлозный чип 130 рекомбинантных белков, в основном выбранных из генома GAS SF370 M1 (для подробного описания получения чипа см. фигуру 2).

Чипы инкубировали с различными сыворотками и оценивали реакционную способность, определяя общий IgG, связывающийся с каждым нанесенным белком с использованием флуоресцентно меченых антител против IgG человека и измеряя значения получаемой интенсивности флуоресценции (FI). Для каждого стекла значения MFI белка нормализовали по сигмовидной скорректированной стандартной кривой IgG, используемой в качестве эталона (фигура 2).

Распознавание антигенов тестируемыми сыворотками считали положительным, когда значения MFI являлись равными или большими 15000, соответствующими значению фона плюс 2 стандартные отклонения. Значения MFI равные или большие 30000 рассматривали как высокий ответ. На чип наносили 120 сывороток, полученных у пациентов (20 сывороток итальянских здоровых доноров (IHD), 40 йеменских здоровых доноров (YHD) и 60 йеменских пациентов с RHD (RHD)).

### Результаты

Антигены GAS, распознаваемые сыворотками, полученными у здоровых доноров: ответ антителами выше у йеменцев, чем у итальянцев

Ответ антителами к GAS в группах, принадлежащих различным географическим областям, исследовали с использованием 40 сывороток, полученных у здоровых доноров крови из Йемена и 20 здоровых доноров из Италии. На фигуре 3 представлен процент

сывороток, полученных у здоровых доноров, с высоким ответом на антигены GAS. Как показано, фоновый ответ против стрептококков намного выше в образцах, полученных у йеменцев, чем в образцах, полученных у итальянцев, и в отношении количества высокораспознаваемых антигенов, и в отношении количества

5 высокоположительных сывороток.

Дифференциальная иммунореактивность антигенов GAS у здоровых йеменцев и йеменских пациентов с RHD

Авторы сравнивали иммунореактивность 40 YHD (темно-серый на фигуре 4) и 43 RHD (светло-серый на фигуре 4) сывороток выбранных совпадающих по возрасту  
10 людей. Для определения профилей распознавания антигенов двух групп сывороток, нормализованные значения FI (MFI) подвергали неконтролируемой двумерной иерархической кластеризации с использованием специализированного программного обеспечения (программное обеспечение TIGR Multiexperiment Viewer (MeV) (<http://www.tigr.org/software/tm4/mev.html>)).

15 Кластерное представление профилей распознавания антител идентифицировало две основных группы высокораспознаваемых антигенов (1 и 2 на фигуре 4). Группа 1 включала GAS5F (предполагаемый секретируемый белок), GAS25 (предшественник стрептолизина O), GAS40 (предполагаемый поверхностный предотвращающий белок), M1, GAS179 (предполагаемая эстераза), GAS97 (гомолог предшественника  
20 иммуногенного секретируемого белка), GAS193 (предшественник неиммуногенного секретируемого белка). Группа 2 включала 5 различных М-белков (M12, M23, M2, M3 и M9), GAS57 (предполагаемая протеинкиназа клеточной оболочки), GAS380 (гипотетический белок) и SpeI.

Кроме того, как показано на фигуре 4, этот кластерный анализ распределял  
25 сыворотки от высокой реакционной способности (слева) до меньшей реакционной способности (справа). Фактически, можно различить две основные группы сывороток, группу с высокой реакционной способностью, в основном включающую сыворотки, полученные у здоровых доноров (А слева на фигуре 4), и вторую группу, демонстрирующую меньшую реакционную способность и включающую в основном  
30 сыворотки, полученные у пациентов с RHD (группа В на фигуре 4).

Затем авторы применяли кластерный анализ К-средних для классификации антигенов GAS, присутствующих на чипе по 10 кластерам (КА1-КА10 на фигуре 5), вызывающих сходные профили распознавания. Кластеризация k-средних представляет собой статистический способ, предназначенный для разбиения n наблюдений на k кластеров  
35 в которых каждое наблюдение принадлежит к кластеру с ближайшим средним. Он сходен с алгоритмом максимизации ожидаемого правдоподобия для смеси гауссиан в том, что они оба пытаются отыскать центры природных кластеров в данных.

Как показано на фигуре 5, четыре из идентифицированных кластеров антигенов (номера КА 1, КА 5, КА 9, КА 10) содержали антигены с более высокими значениями  
40 флуоресценции, чем оставшиеся кластеры. Представляет интерес, что даже несмотря на то, что кластеризация была одномерной, т.е. предназначенной для классификации антигенов, а не для классификации сывороток, авторы выявили, что в кластере КА 1 наиболее реакционноспособные сыворотки содержали большое количество YHD. Это наблюдение позволило предположить наличие на чипе группы антигенов,  
45 реакционноспособность которых обеспечивает установление различий между сыворотками, получаемыми у здоровых доноров, и сыворотками, получаемыми у пациентов с RHD

Затем авторы попробовали более точно определить группу антигенов, позволяющих



им различать здоровых индивидуумов и пациентов с кардиопатией. Для этой цели сыворотки дополнительно классифицировали на основе их профилей распознавания по различным группам антигенов с использованием одномерного иерархического кластерного анализа.

Этот тип анализа впервые применяли к группе антигенов, включенных в кластер KA1 на фигуре 5, что позволило на первом иерархическом уровне определить два кластера сывороток, HS1 и HS2, соответствующих фиолетовой (HS1) и синей (HS2) рамкам на фигуре 6А. Количества сывороток, полученных у здоровых индивидуумов, и сывороток, полученных у пациентов, присутствующие или отсутствующие в каждом из двух кластеров, приведены на фигуре 6В. Как представлено, большинство YHD можно найти в кластере с высокой реакционноспособностью, синий, кластер HS2, тогда как большинство сывороток RHD находятся в кластере с низкой реакционноспособностью, фиолетовый, кластер HS1. Возможность установить отличия между двумя группами сывороток с использованием теста определяли по специфичности и чувствительности. На фигуре 6С представлен идеальный теоретический пример максимума специфичности и чувствительности (значения 1). Как представлено, для данной конкретной группы антигенов авторы получили значения специфичности и чувствительности 0,73 и 0,69.

Тот же тип анализа применяли для антигенов в кластерах KA5, KA9, KA10 и KA5+M9. Тот же тип анализа также применяли для других групп антигенов, включающих GAS5+GAS5F+GAS25+GAS40, GAS5+GAS5F+GAS25+GAS40+GAS57, GAS5+GAS25+GAS40+GAS57, GAS5F+GAS25+GAS40+GAS57. Результаты обобщены на фигуре 7А-I.

Как представлено, кластер, обеспечивающий наибольшие значения специфичности и чувствительности, включал антигены кластера KA1 (GAS5, GAS40, GAS5F, GAS57, GAS97, GAS380 и SpeA) и антигены GAS5, GAS25, GAS40 и GAS57, тогда как наименьшие значения получали для кластера, включающего варианты M GAS.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Авторы полагают, что этот тип анализа с использованием антигенов GAS5, GAS25, GAS40 и GAS57 может обеспечивать основу для более точной диагностики RHD и позволяет предсказывать вероятность развития RHD у пациента с ARF, таким образом, обеспечивая медицинским специалистам руководство в принятии решения о лучшей профилактической терапии пациентов с ARF.

### ССЫЛКИ

- [1] Winter *et al.*, (1991) *Nature* 349:293-99
- [2] US 4,816,567.
- [3] Inbar *et al.*, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69:2659-62.
- [4] Ehrlich *et al.*, (1980) *Biochem* 19:4091-96.
- [5] Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5897-83.
- [6] Pack *et al.*, (1992) *Biochem* 31, 1579-84.
- [7] Cumber *et al.*, (1992) *J. Immunology* 149B, 120-26.
- [8] Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332, 323-27.
- [9] Verhoeyan *et al.*, (1988) *Science* 239, 1534-36.
- [10] GB 2,276,169.
- [11] US patent 6355271.

- [12] WO00/23105.
- [13] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [14] WO90/14837.
- [15] WO90/14837.
- 5 [16] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [17] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [18] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [19] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- 10 [20] WO2008/043774.
- [21] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [22] Hariharan *et al.* (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- [23] US-2007/014805.
- [24] US-2007/0191314.
- 15 [25] Suli *et al.* (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.
- [26] WO95/11700.
- [27] US patent 6,080,725.
- [28] WO2005/097181.
- [29] WO2006/113373.
- 20 [30] Han *et al.* (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference*, Paris, 9-10 June 2005.
- [31] US- 6630161.
- [32] US 5,057,540.
- [33] WO96/33739.
- 25 [34] EP-A-0109942.
- [35] WO96/11711.
- [36] WO00/07621.
- [37] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [38] Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- 30 [39] Niikura *et al.* (2002) *Virology* 293:273-280.
- [40] Lenz *et al.* (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [41] Pinto *et al.* (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [42] Gerber *et al.* (2001) *J Virol* 75:4752-4760.
- [43] WO03/024480.
- 35 [44] WO03/024481.
- [45] Gluck *et al.* (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [46] EP-A-0689454.
- [47] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [48] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- 40 [49] Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [50] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [51] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [52] WO02/26757.
- [53] WO99/62923.
- 45 [54] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.

- [12] WO00/23105.
- [13] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [14] WO90/14837.
- [15] WO90/14837.
- 5 [16] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [17] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [18] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [19] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- 10 [20] WO2008/043774.
- [21] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [22] Hariharan *et al.* (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- [23] US-2007/014805.
- [24] US-2007/0191314.
- 15 [25] Suli *et al.* (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.
- [26] WO95/11700.
- [27] US patent 6,080,725.
- [28] WO2005/097181.
- [29] WO2006/113373.
- 20 [30] Han *et al.* (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference*, Paris, 9-10 June 2005.
- [31] US- 6630161.
- [32] US 5,057,540.
- [33] WO96/33739.
- 25 [34] EP-A-0109942.
- [35] WO96/11711.
- [36] WO00/07621.
- [37] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [38] Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- 30 [39] Niikura *et al.* (2002) *Virology* 293:273-280.
- [40] Lenz *et al.* (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [41] Pinto *et al.* (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [42] Gerber *et al.* (2001) *J Virol* 75:4752-4760.
- [43] WO03/024480.
- 35 [44] WO03/024481.
- [45] Gluck *et al.* (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [46] EP-A-0689454.
- [47] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [48] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- 40 [49] Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [50] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [51] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [52] WO02/26757.
- [53] WO99/62923.
- 45 [54] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.

- [55] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [56] WO98/40100.
- [57] US 6,207,646.
- [58] US 6,239,116.
- 5 [59] US 6,429,199.
- [60] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [61] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [62] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [63] WO01/95935.
- 10 [64] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [65] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [66] WO03/035836.
- [67] WO01/22972.
- [68] Schellack *et al.* (2006) *Vaccine* 24:5461-72.
- 15 [69] Kamath *et al.* (2008) *Eur J Immunol* 38:1247-56.
- [70] Riedl *et al.* (2008) *Vaccine* 26:3461-8.
- [71] WO95/17211.
- [72] WO98/42375.
- [73] Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- 20 [74] Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [75] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [76] Scharton-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [77] Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [78] Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- 25 [79] Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [80] Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [81] Tebbey *et al.* (2000) *Vaccine* 18:2723-34.
- [82] Domenighini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [83] WO99/40936.
- 30 [84] WO99/44636.
- [85] Singh *et al.* (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [86] WO99/27960.
- [87] US 6,090,406.
- [88] US 5,916,588.
- 35 [89] EP-A-0626169.
- [90] WO99/52549.
- [91] WO01/21207.
- [92] WO01/21152.
- [93] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- 40 [94] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [95] US 4,680,338.
- [96] US 4,988,815.
- [97] WO92/15582.
- [98] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- 45 [99] Wu *et al.* (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
- [100] Vasilakos *et al.* (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.

- [55] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [56] WO98/40100.
- [57] US 6,207,646.
- [58] US 6,239,116.
- 5 [59] US 6,429,199.
- [60] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [61] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [62] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [63] WO01/95935.
- 10 [64] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [65] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [66] WO03/035836.
- [67] WO01/22972.
- [68] Schellack *et al.* (2006) *Vaccine* 24:5461-72.
- 15 [69] Kamath *et al.* (2008) *Eur J Immunol* 38:1247-56.
- [70] Riedl *et al.* (2008) *Vaccine* 26:3461-8.
- [71] WO95/17211.
- [72] WO98/42375.
- [73] Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- 20 [74] Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [75] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [76] Scharton-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [77] Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [78] Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- 25 [79] Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [80] Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [81] Tebbey *et al.* (2000) *Vaccine* 18:2723-34.
- [82] Domenighini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [83] WO99/40936.
- 30 [84] WO99/44636.
- [85] Singh *et al.* (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [86] WO99/27960.
- [87] US 6,090,406.
- [88] US 5,916,588.
- 35 [89] EP-A-0626169.
- [90] WO99/52549.
- [91] WO01/21207.
- [92] WO01/21152.
- [93] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- 40 [94] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [95] US 4,680,338.
- [96] US 4,988,815.
- [97] WO92/15582.
- [98] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- 45 [99] Wu *et al.* (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
- [100] Vasilakos *et al.* (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.

[101] US patents 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 and 6924293.

[102] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.

[103] WO03/011223.

[104] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.

[105] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.

[106] WO2004/060308.

[107] WO2004/064759.

[108] US 6,924,271.

[109] US2005/0070556.

[110] US 5,658,731.

[111] US patent 5,011,828.

[112] WO2004/87153.

[113] US 6,605,617.

[114] WO02/18383.

[115] WO2004/018455.

[116] WO03/082272.

[117] Wong *et al.* (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.

[118] US2005/0215517.

[119] Dyakonova *et al.* (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.

[120] FR-2859633.

[121] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.

[122] WO2004/064715.

[123] De Libero *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496

[124] US patent 5,936,076.

[125] Oki *et al.*, *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640

[126] US2005/0192248

[127] Yang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 3818-3822

[128] WO2005/102049

[129] Goff *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 13602-13603

[130] WO03/105769

[131] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.

[132] WO99/11241.

[133] WO94/00153.

[134] WO98/57659.

[135] European patent applications 0835318, 0735898 and 0761231.

[136] WO2006/110603.

#### Формула изобретения

1. Способ лечения или профилактики RHD, связанного с инфекцией GAS, включающий введение пациенту по меньшей мере одного антигена GAS, выбранного из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или их функциональные эквиваленты.

2. Применение по меньшей мере одного антигена GAS, выбранного из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, или его функционального эквивалента для лечения или профилактики RHD, связанного с инфекцией GAS.

3. Способ диагностики ревматического порока сердца (RHD), связанного с инфекцией GAS, у пациента, где указанный способ включает стадии:

а) приведения биологического образца, взятого у пациента, в контакт по меньшей мере с одним антигеном GAS, выбранным из группы, включающей аминокислотные последовательности

SEQ ID NO: 1 (GAS5),  
 SEQ ID NO: 2 (GAS5F),  
 SEQ ID NO: 3 (GAS25),  
 SEQ ID NO: 4 (GAS40),  
 SEQ ID NO: 5 (GAS57),  
 SEQ ID NO: 6 (GAS97),  
 SEQ ID NO: 7 (GAS380) и  
 SEQ ID NO: 8 (SpeA),

или их функциональными эквивалентами в условиях, подходящих для связывания любых антител, присутствующих в биологическом образце, по меньшей мере с одним антигеном GAS или с его функциональными эквивалентами; и

б) сравнения реакционной способности антител в биологическом образце, взятом у пациента, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS с реакционной способностью антител в контрольном биологическом образце, взятом у здорового индивидуума, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS,

где меньшая реакционная способность в биологическом образце, взятом у пациента, по сравнению с контрольным биологическим образцом, взятым у здорового индивидуума, указывает на то, что пациент страдает ревматическим пороком сердца (RHD), связанным с инфекцией GAS, или что у пациента существует риск развития RHD, связанного с инфекцией GAS.

4. Способ идентификации пациента с риском развития RHD, связанного с инфекцией GAS, где указанный способ включает стадии:

а) приведения биологического образца, взятого у пациента, в контакт по меньшей мере с одним антигеном GAS, выбранным из группы, включающей аминокислотные последовательности

SEQ ID NO: 1 (GAS5),  
 SEQ ID NO: 2 (GAS5F),  
 SEQ ID NO: 3 (GAS25),  
 SEQ ID NO: 4 (GAS40),  
 SEQ ID NO: 5 (GAS57),  
 SEQ ID NO: 6 (GAS97),  
 SEQ ID NO: 7 (GAS380) и  
 SEQ ID NO: 8 (SpeA),

или их функциональными эквивалентами в условиях, подходящих для связывания любых антител, присутствующих в биологическом образце, по меньшей мере с одним антигеном GAS или с его функциональными эквивалентами; и

б) сравнения реакционной способности антител в биологическом образце, взятом у пациента, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS с реакционной способностью антител в контрольном биологическом образце, взятом у здорового индивидуума, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS,

где меньшая реакционная способность в биологическом образце, взятом у пациента, по сравнению с контрольным биологическим образцом, взятым у здорового индивидуума, указывает на то, что пациент страдает ревматическим пороком сердца

(RHD), связанным с инфекцией GAS, или что у пациента существует риск развития RHD, связанного с инфекцией GAS.

5. Способ по п. 3 или 4, где стадия а) включает приведение образца в контакт с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 из антигенов GAS, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или их функциональные эквиваленты.

6. Способ по п. 3 или 4, где стадия а) включает приведение образца в контакт с 3 антигенами GAS, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3; SEQ ID NO: 1, 3 и 4; SEQ ID NO: 1, 4 и 5; SEQ ID NO: 2, 3 и 4; SEQ ID NO: 2, 4 и 5 или SEQ ID NO: 3, 4 и 5 или их функциональные эквиваленты.

7. Способ по п. 3 или 4, где стадия а) включает приведение образца в контакт с 4 антигенами GAS, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4; или SEQ ID NO: 2, 3, 4 и 5; SEQ ID NO: 1, 3, 4 и 5 или их функциональные эквиваленты.

8. Способ по п. 3 или 4, где стадия а) включает приведение образца в контакт с 5 антигенами GAS, содержащими аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 и 5.

9. Способ по п. 3 или 4, где биологический образец представляет собой образец сыворотки.

10. Способ по п. 3 или 4, где биологический образец берут у подростка или у ребенка.

11. Способ по п. 3 или 4, где антигены GAS представлены на одном или нескольких белковых чипах.

12. Белковый чип для диагностики ревматического порока сердца (RHD), связанного с инфекцией GAS, у пациента, содержащий по меньшей мере два антигена GAS с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8, или их функциональные эквиваленты.

13. Набор, содержащий белковый чип по п. 12 и инструкции для применения в диагностике пациентов с наличием или с риском развития ревматического порока сердца, связанного с инфекцией GAS.



## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> NOVARTIS AG  
 <120> ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ  
 <130> P053675WO  
 <150> GB 0918392.2  
 <151> 2009-10-20  
 <160> 10  
 <170> SeqWin99, version 1.02  
 <210> 1  
 <211> 398  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Streptococcus pyogenes  
 <400> 1  
 Met Lys Lys Arg Ile Leu Ser Ala Val Leu Val Ser Gly Val Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Ala Ala Thr Thr Val Gly Ala Glu Asp Leu Ser Thr Lys Ile Ala  
 20 25 30  
 Lys Gln Asp Ser Ile Ile Ser Asn Leu Thr Thr Glu Gln Lys Ala Ala  
 35 40 45  
 Gln Asn Gln Val Ser Ala Leu Gln Ala Gln Val Ser Ser Leu Gln Ser  
 50 55 60  
 Glu Gln Asp Lys Leu Thr Ala Arg Asn Thr Glu Leu Glu Ala Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Lys Arg Phe Glu Gln Glu Ile Lys Ala Leu Thr Ser Gln Ile Val Ala  
 85 90 95  
 Arg Asn Glu Lys Leu Lys Asn Gln Ala Arg Ser Ala Tyr Lys Asn Asn  
 100 105 110  
 Glu Thr Ser Gly Tyr Ile Asn Ala Leu Leu Asn Ser Lys Ser Ile Ser  
 115 120 125  
 Asp Val Val Asn Arg Leu Val Ala Ile Asn Arg Ala Val Ser Ala Asn  
 130 135 140  
 Ala Lys Leu Leu Glu Gln Gln Lys Ala Asp Lys Val Ser Leu Glu Glu  
 145 150 155 160  
 Lys Gln Ala Ala Asn Gln Thr Ala Ile Asn Thr Ile Ala Ala Asn Met  
 165 170 175  
 Ala Met Ala Glu Glu Asn Gln Asn Thr Leu Arg Thr Gln Gln Ala Asn  
 180 185 190  
 Leu Val Ala Ala Thr Ala Asn Leu Ala Leu Gln Leu Ala Ser Ala Thr  
 195 200 205  
 Glu Asp Lys Ala Asn Leu Val Ala Gln Lys Glu Ala Ala Glu Lys Ala  
 210 215 220  
 Ala Ala Glu Ala Leu Ala Gln Glu Gln Ala Ala Lys Val Lys Ala Gln

225		230		235		240
Glu Gln Ala Ala	Gln Gln Ala Ala	Ser Val Glu Ala Ala	Lys Ser Ala			
	245	250	255			
Ile Thr Pro Ala	Pro Gln Ala Thr	Pro Ala Ala Gln Ser	Ser Asn Ala			
	260	265	270			
Ile Glu Pro Ala	Ala Leu Thr Ala	Pro Ala Ala Pro	Ser Ala Gly Pro			
	275	280	285			
Gln Thr Ser Tyr Asp	Ser Ser Asn Thr Tyr	Pro Val Gly Gln Cys Thr				
	295	300				
Trp Gly Ala Lys Ser	Leu Ala Pro Trp Ala	Gly Asn Asn Trp Gly Asn				
305	310	315	320			
Gly Gly Gln Trp Ala	Tyr Ser Ala Gln Ala	Ala Gly Tyr Arg Thr Gly				
	325	330	335			
Ser Thr Pro Met Val	Gly Ala Ile Ala	Val Trp Asn Asp Gly Gly Tyr				
	340	345	350			
Gly His Val Ala Val	Val Val Val Glu Val	Gln Ser Ala Ser Ser Ile Arg				
	355	360	365			
Val Met Glu Ser Asn Tyr	Ser Gly Arg Gln Tyr	Ile Ala Asp His Arg				
	375	380				
Gly Trp Phe Asn Pro	Thr Gly Val Thr Phe	Ile Tyr Pro His				
385	390	395				
<210>	2					
<211>	175					
<212>	BEJOK					
<213>	Streptococcus pyogenes					
<400>	2					
Ala Ala Ala Glu Ala	Leu Ala Gln Glu	Gln Ala Ala Lys Val Lys Ala				
1	5	10	15			
Gln Glu Gln Ala	Ala Gln Gln Ala	Ser Val Glu Ala Ala Lys Ser				
	20	25	30			
Ala Ile Thr Pro	Ala Pro Gln Ala Thr	Pro Ala Ala Gln Ser Ser Asn				
	35	40	45			
Ala Ile Glu Pro	Ala Ala Leu Thr Ala	Pro Ala Ala Pro Ser Ala Gly				
	50	55	60			
Pro Gln Thr Ser Tyr Asp	Ser Ser Asn Thr Tyr	Pro Val Gly Gln Cys				
65	70	75	80			
Thr Trp Gly Ala	Lys Ser Leu Ala Pro	Trp Ala Gly Asn Asn Trp Gly				
	85	90	95			
Asn Gly Gly Gln Trp	Ala Tyr Ser Ala Gln	Ala Ala Gly Tyr Arg Thr				
	100	105	110			
Gly Ser Thr Pro	Met Val Gly Ala Ile	Ala Val Trp Asn Asp Gly Gly				
	115	120	125			
Tyr Gly His Val	Ala Val Val Val	Glu Val Gln Ser Ala Ser Ser Ile				
	130	135	140			

Arg Val Met Glu Ser Asn Tyr Ser Gly Arg Gln Tyr Ile Ala Asp His  
 145 150 155 160  
 Arg Gly Trp Phe Asn Pro Thr Gly Val Thr Phe Ile Tyr Pro His  
 165 170 175  
 <210> 3  
 <211> 571  
 <212> BEJOK  
 <213> Streptococcus pyogenes  
 <400> 3  
 Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu  
 35 40 45  
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 85 90 95  
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys  
 100 105 110  
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly  
 115 120 125  
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp  
 130 135 140  
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala  
 165 170 175  
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala  
 180 185 190  
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly  
 195 200 205  
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn  
 210 215 220  
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met  
 245 250 255  
 Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys  
 260 265 270

Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly  
 275 280 285  
 Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val  
 290 295 300  
 Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val  
 305 310 315 320  
 Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro  
 325 330 335  
 Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu  
 340 345 350  
 Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala  
 355 360 365  
 Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu  
 370 375 380  
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu  
 385 390 395 400  
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile  
 405 410 415  
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser  
 420 425 430  
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn  
 435 440 445  
 Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys  
 450 455 460  
 Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu  
 465 470 475 480  
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys  
 485 490 495  
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr  
 500 505 510  
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg  
 515 520 525  
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu  
 530 535 540  
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 565 570  
 <210> 4  
 <211> 873  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Streptococcus pyogenes  
 <400> 4  
 Met Asp Leu Glu Gln Thr Lys Pro Asn Gln Val Lys Gln Lys Ile Ala

1	5	10	15
Leu Thr Ser Thr Ile Ala Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly Val Ser His	20	25	30
Gln Val Lys Ala Asp Asp Arg Ala Ser Gly Glu Thr Lys Ala Ser Asn	35	40	45
Thr His Asp Asp Ser Leu Pro Lys Pro Glu Thr Ile Gln Glu Ala Lys	50	55	60
Ala Thr Ile Asp Ala Val Glu Lys Thr Leu Ser Gln Gln Lys Ala Glu	65	70	75
Leu Thr Glu Leu Ala Thr Ala Leu Thr Lys Thr Thr Ala Glu Ile Asn	85	90	95
His Leu Lys Glu Gln Gln Asp Asn Glu Gln Lys Ala Leu Thr Ser Ala	100	105	110
Gln Glu Ile Tyr Thr Asn Thr Leu Ala Ser Ser Glu Glu Thr Leu Leu	115	120	125
Ala Gln Gly Ala Glu His Gln Arg Glu Leu Thr Ala Thr Glu Thr Glu	130	135	140
Leu His Asn Ala Gln Ala Asp Gln His Ser Lys Glu Thr Ala Leu Ser	145	150	155
Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ser Ala Glu Thr Thr Arg Ala Gln Asp Leu	165	170	175
Val Glu Gln Val Lys Thr Ser Glu Gln Asn Ile Ala Lys Leu Asn Ala	180	185	190
Met Ile Ser Asn Pro Asp Ala Ile Thr Lys Ala Ala Gln Thr Ala Asn	195	200	205
Asp Asn Thr Lys Ala Leu Ser Ser Glu Leu Glu Lys Ala Lys Ala Asp	210	215	220
Leu Glu Asn Gln Lys Ala Lys Val Lys Lys Gln Leu Thr Glu Glu Leu	225	230	235
Ala Ala Gln Lys Ala Ala Leu Ala Glu Lys Glu Ala Glu Leu Ser Arg	245	250	255
Leu Lys Ser Ser Ala Pro Ser Thr Gln Asp Ser Ile Val Gly Asn Asn	260	265	270
Thr Met Lys Ala Pro Gln Gly Tyr Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Leu	275	280	285
Glu Ala Ser Gly Tyr Ile Gly Ser Ala Ser Tyr Asn Asn Tyr Tyr Lys	290	295	300
Glu His Ala Asp Gln Ile Ile Ala Lys Ala Ser Pro Gly Asn Gln Leu	305	310	315
Asn Gln Tyr Gln Asp Ile Pro Ala Asp Arg Asn Arg Phe Val Asp Pro	325	330	335
Asp Asn Leu Thr Pro Glu Val Gln Asn Glu Leu Ala Gln Phe Ala Ala	340	345	350

His Met Ile Asn Ser Val Arg Arg Gln Leu Gly Leu Pro Pro Val Thr  
 355 360 365  
 Val Thr Ala Gly Ser Gln Glu Phe Ala Arg Leu Leu Ser Thr Ser Tyr  
 370 375 380  
 Lys Lys Thr His Gly Asn Thr Arg Pro Ser Phe Val Tyr Gly Gln Pro  
 385 390 395 400  
 Gly Val Ser Gly His Tyr Gly Val Gly Pro His Asp Lys Thr Ile Ile  
 405 410 415  
 Glu Asp Ser Ala Gly Ala Ser Gly Leu Ile Arg Asn Asp Asp Asn Met  
 420 425 430  
 Tyr Glu Asn Ile Gly Ala Phe Asn Asp Val His Thr Val Asn Gly Ile  
 435 440 445  
 Lys Arg Gly Ile Tyr Asp Ser Ile Lys Tyr Met Leu Phe Thr Asp His  
 450 455 460  
 Leu His Gly Asn Thr Tyr Gly His Ala Ile Asn Phe Leu Arg Val Asp  
 465 470 475 480  
 Lys His Asn Pro Asn Ala Pro Val Tyr Leu Gly Phe Ser Thr Ser Asn  
 485 490 495  
 Val Gly Ser Leu Asn Glu His Phe Val Met Phe Pro Glu Ser Asn Ile  
 500 505 510  
 Ala Asn His Gln Arg Phe Asn Lys Thr Pro Ile Lys Ala Val Gly Ser  
 515 520 525  
 Thr Lys Asp Tyr Ala Gln Arg Val Gly Thr Val Ser Asp Thr Ile Ala  
 530 535 540  
 Ala Ile Lys Gly Lys Val Ser Ser Leu Glu Asn Arg Leu Ser Ala Ile  
 545 550 555 560  
 His Gln Glu Ala Asp Ile Met Ala Ala Gln Ala Lys Val Ser Gln Leu  
 565 570 575  
 Gln Gly Lys Leu Ala Ser Thr Leu Lys Gln Ser Asp Ser Leu Asn Leu  
 580 585 590  
 Gln Val Arg Gln Leu Asn Asp Thr Lys Gly Ser Leu Arg Thr Glu Leu  
 595 600 605  
 Leu Ala Ala Lys Ala Lys Gln Ala Gln Leu Glu Ala Thr Arg Asp Gln  
 610 615 620  
 Ser Leu Ala Lys Leu Ala Ser Leu Lys Ala Ala Leu His Gln Thr Glu  
 625 630 635 640  
 Ala Leu Ala Glu Gln Ala Ala Ala Arg Val Thr Ala Leu Val Ala Lys  
 645 650 655  
 Lys Ala His Leu Gln Tyr Leu Arg Asp Phe Lys Leu Asn Pro Asn Arg  
 660 665 670  
 Leu Gln Val Ile Arg Glu Arg Ile Asp Asn Thr Lys Gln Asp Leu Ala  
 675 680 685

Lys Thr Thr Ser Ser Leu Leu Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ala Ala Leu  
 690 695 700  
 Gln Ala Lys Gln Ser Ser Leu Glu Ala Thr Ile Ala Thr Thr Glu His  
 705 710 715 720  
 Gln Leu Thr Leu Leu Lys Thr Leu Ala Asn Glu Lys Glu Tyr Arg His  
 725 730 735  
 Leu Asp Glu Asp Ile Ala Thr Val Pro Asp Leu Gln Val Ala Pro Pro  
 740 745 750  
 Leu Thr Gly Val Lys Pro Leu Ser Tyr Ser Lys Ile Asp Thr Thr Pro  
 755 760 765  
 Leu Val Gln Glu Met Val Lys Glu Thr Lys Gln Leu Leu Glu Ala Ser  
 770 775 780  
 Ala Arg Leu Ala Ala Glu Asn Thr Ser Leu Val Ala Glu Ala Leu Val  
 785 790 795 800  
 Gly Gln Thr Ser Glu Met Val Ala Ser Asn Ala Ile Val Ser Lys Ile  
 805 810 815  
 Thr Ser Ser Ile Thr Gln Pro Ser Ser Lys Thr Ser Tyr Gly Ser Gly  
 820 825 830  
 Ser Ser Thr Thr Ser Asn Leu Ile Ser Asp Val Asp Glu Ser Thr Gln  
 835 840 845  
 Arg Ala Leu Lys Ala Gly Val Val Met Leu Ala Ala Val Gly Leu Thr  
 850 855 860  
 Gly Phe Arg Phe Arg Lys Glu Ser Lys  
 865 870  
 <210> 5  
 <211> 1647  
 <212> BEJOK  
 <213> Streptococcus pyogenes  
 <400> 5  
 Met Glu Lys Lys Gln Arg Phe Ser Leu Arg Lys Tyr Lys Ser Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Ser Val Leu Ile Gly Ser Val Phe Leu Val Met Thr Thr Thr Val  
 20 25 30  
 Ala Ala Asp Glu Leu Ser Thr Met Ser Glu Pro Thr Ile Thr Asn His  
 35 40 45  
 Ala Gln Gln Gln Ala Gln His Leu Thr Asn Thr Glu Leu Ser Ser Ala  
 50 55 60  
 Glu Ser Lys Ser Gln Asp Thr Ser Gln Ile Thr Leu Lys Thr Asn Arg  
 65 70 75 80  
 Glu Lys Glu Gln Ser Gln Asp Leu Val Ser Glu Pro Thr Thr Thr Glu  
 85 90 95  
 Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Ser Met Ala Asn Thr Gly Ser Asp Ala  
 100 105 110  
 Thr Gln Lys Ser Ala Ser Leu Pro Pro Val Asn Thr Asp Val His Asp

115					120					125					
Trp	Val	Lys	Thr	Lys	Gly	Ala	Trp	Asp	Lys	Gly	Tyr	Lys	Gly	Gln	Gly
130						135					140				
Lys	Val	Val	Ala	Val	Ile	Asp	Thr	Gly	Ile	Asp	Pro	Ala	His	Gln	Ser
145					150					155					160
Met	Arg	Ile	Ser	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Lys	Val	Lys	Ser	Lys	Glu	Asp
				165					170					175	
Met	Leu	Ala	Arg	Gln	Lys	Ala	Ala	Gly	Ile	Asn	Tyr	Gly	Ser	Trp	Ile
			180					185					190		
Asn	Asp	Lys	Val	Val	Phe	Ala	His	Asn	Tyr	Val	Glu	Asn	Ser	Asp	Asn
		195					200					205			
Ile	Lys	Glu	Asn	Gln	Phe	Glu	Asp	Phe	Asp	Glu	Asp	Trp	Glu	Asn	Phe
	210					215					220				
Glu	Phe	Asp	Ala	Glu	Ala	Glu	Pro	Lys	Ala	Ile	Lys	Lys	His	Lys	Ile
225					230					235					240
Tyr	Arg	Pro	Gln	Ser	Thr	Gln	Ala	Pro	Lys	Glu	Thr	Val	Ile	Lys	Thr
				245					250					255	
Glu	Glu	Thr	Asp	Gly	Ser	His	Asp	Ile	Asp	Trp	Thr	Gln	Thr	Asp	Asp
			260					265					270		
Asp	Thr	Lys	Tyr	Glu	Ser	His	Gly	Met	His	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Ala
		275					280					285			
Gly	Asn	Ser	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Glu	Arg	Phe	Leu	Gly	Ile
	290					295					300				
Ala	Pro	Glu	Ala	Gln	Val	Met	Phe	Met	Arg	Val	Phe	Ala	Asn	Asp	Ile
305					310					315					320
Met	Gly	Ser	Ala	Glu	Ser	Leu	Phe	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Asp	Ala	Val
				325					330					335	
Ala	Leu	Gly	Ala	Asp	Val	Ile	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Thr	Ala	Asn	Gly
			340					345					350		
Ala	Gln	Leu	Ser	Gly	Ser	Lys	Pro	Leu	Met	Glu	Ala	Ile	Glu	Lys	Ala
		355					360					365			
Lys	Lys	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Val	Val	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Arg	Val
	370					375					380				
Tyr	Gly	Ser	Asp	His	Asp	Asp	Pro	Leu	Ala	Thr	Asn	Pro	Asp	Tyr	Gly
385					390					395					400
Leu	Val	Gly	Ser	Pro	Ser	Thr	Gly	Arg	Thr	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Ala
				405					410					415	
Ile	Asn	Ser	Lys	Trp	Val	Ile	Gln	Arg	Leu	Met	Thr	Val	Lys	Glu	Leu
			420					425					430		
Glu	Asn	Arg	Ala	Asp	Leu	Asn	His	Gly	Lys	Ala	Ile	Tyr	Ser	Glu	Ser
		435					440					445			
Val	Asp	Phe	Lys	Asp	Ile	Lys	Asp	Ser	Leu	Gly	Tyr	Asp	Lys	Ser	His
	450					455					460				



Gln Phe Ala Tyr Val Lys Glu Ser Thr Asp Ala Gly Tyr Asn Ala Gln  
 465 470 475 480  
 Asp Val Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Asp Pro Asn Lys Thr  
 485 490 495  
 Tyr Asp Glu Met Ile Ala Leu Ala Lys Lys His Gly Ala Leu Gly Val  
 500 505 510  
 Leu Ile Phe Asn Asn Lys Pro Gly Gln Ser Asn Arg Ser Met Arg Leu  
 515 520 525  
 Thr Ala Asn Gly Met Gly Ile Pro Ser Ala Phe Ile Ser His Glu Phe  
 530 535 540  
 Gly Lys Ala Met Ser Gln Leu Asn Gly Asn Gly Thr Gly Ser Leu Glu  
 545 550 555 560  
 Phe Asp Ser Val Val Ser Lys Ala Pro Ser Gln Lys Gly Asn Glu Met  
 565 570 575  
 Asn His Phe Ser Asn Trp Gly Leu Thr Ser Asp Gly Tyr Leu Lys Pro  
 580 585 590  
 Asp Ile Thr Ala Pro Gly Gly Asp Ile Tyr Ser Thr Tyr Asn Asp Asn  
 595 600 605  
 His Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro Gln Ile Ala  
 610 615 620  
 Gly Ala Ser Leu Leu Val Lys Gln Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Asn  
 625 630 635 640  
 Leu Pro Lys Glu Lys Ile Ala Asp Ile Val Lys Asn Leu Leu Met Ser  
 645 650 655  
 Asn Ala Gln Ile His Val Asn Pro Glu Thr Lys Thr Thr Thr Ser Pro  
 660 665 670  
 Arg Gln Gln Gly Ala Gly Leu Leu Asn Ile Asp Gly Ala Val Thr Ser  
 675 680 685  
 Gly Leu Tyr Val Thr Gly Lys Asp Asn Tyr Gly Ser Ile Ser Leu Gly  
 690 695 700  
 Asn Ile Thr Asp Thr Met Thr Phe Asp Val Thr Val His Asn Leu Ser  
 705 710 715 720  
 Asn Lys Asp Lys Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Leu Leu Thr Asp His  
 725 730 735  
 Val Asp Pro Gln Lys Gly Arg Phe Thr Leu Thr Ser His Ser Leu Lys  
 740 745 750  
 Thr Tyr Gln Gly Gly Glu Val Thr Val Pro Ala Asn Gly Lys Val Thr  
 755 760 765  
 Val Arg Val Thr Met Asp Val Ser Gln Phe Thr Lys Glu Leu Thr Lys  
 770 775 780  
 Gln Met Pro Asn Gly Tyr Tyr Leu Glu Gly Phe Val Arg Phe Arg Asp  
 785 790 795 800

Ser Gln Asp Asp Gln Leu Asn Arg Val Asn Ile Pro Phe Val Gly Phe  
 805 810 815  
 Lys Gly Gln Phe Glu Asn Leu Ala Val Ala Glu Glu Ser Ile Tyr Arg  
 820 825 830  
 Leu Lys Ser Gln Gly Lys Thr Gly Phe Tyr Phe Asp Glu Ser Gly Pro  
 835 840 845  
 Lys Asp Asp Ile Tyr Val Gly Lys His Phe Thr Gly Leu Val Thr Leu  
 850 855 860  
 Gly Ser Glu Thr Asn Val Ser Thr Lys Thr Ile Ser Asp Asn Gly Leu  
 865 870 875 880  
 His Thr Leu Gly Thr Phe Lys Asn Ala Asp Gly Lys Phe Ile Leu Glu  
 885 890 895  
 Lys Asn Ala Gln Gly Asn Pro Val Leu Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp  
 900 905 910  
 Asn Asn Gln Asp Phe Ala Ala Phe Lys Gly Val Phe Leu Arg Lys Tyr  
 915 920 925  
 Gln Gly Leu Lys Ala Ser Val Tyr His Ala Ser Asp Lys Glu His Lys  
 930 935 940  
 Asn Pro Leu Trp Val Ser Pro Glu Ser Phe Lys Gly Asp Lys Asn Phe  
 945 950 955 960  
 Asn Ser Asp Ile Arg Phe Ala Lys Ser Thr Thr Leu Leu Gly Thr Ala  
 965 970 975  
 Phe Ser Gly Lys Ser Leu Thr Gly Ala Glu Leu Pro Asp Gly His Tyr  
 980 985 990  
 His Tyr Val Val Ser Tyr Tyr Pro Asp Val Val Gly Ala Lys Arg Gln  
 995 1000 1005  
 Glu Met Thr Phe Asp Met Ile Leu Asp Arg Gln Lys Pro Val Leu Ser  
 1010 1015 1020  
 Gln Ala Thr Phe Asp Pro Glu Thr Asn Arg Phe Lys Pro Glu Pro Leu  
 1025 1030 1035 1040  
 Lys Asp Arg Gly Leu Ala Gly Val Arg Lys Asp Ser Val Phe Tyr Leu  
 1045 1050 1055  
 Glu Arg Lys Asp Asn Lys Pro Tyr Thr Val Thr Ile Asn Asp Ser Tyr  
 1060 1065 1070  
 Lys Tyr Val Ser Val Glu Asp Asn Lys Thr Phe Val Glu Arg Gln Ala  
 1075 1080 1085  
 Asp Gly Ser Phe Ile Leu Pro Leu Asp Lys Ala Lys Leu Gly Asp Phe  
 1090 1095 1100  
 Tyr Tyr Met Val Glu Asp Phe Ala Gly Asn Val Ala Ile Ala Lys Leu  
 1105 1110 1115 1120  
 Gly Asp His Leu Pro Gln Thr Leu Gly Lys Thr Pro Ile Lys Leu Lys  
 1125 1130 1135  
 Leu Thr Asp Gly Asn Tyr Gln Thr Lys Glu Thr Leu Lys Asp Asn Leu

1140					1145					1150									
Glu	Met	Thr	Gln	Ser	Asp	Thr	Gly	Leu	Val	Thr	Asn	Gln	Ala	Gln	Leu				
1155					1160					1165									
Ala	Val	Val	His	Arg	Asn	Gln	Pro	Gln	Ser	Gln	Leu	Thr	Lys	Met	Asn				
1170					1175					1180									
Gln	Asp	Phe	Phe	Ile	Ser	Pro	Asn	Glu	Asp	Gly	Asn	Lys	Asp	Phe	Val				
1185					1190					1195					1200				
Ala	Phe	Lys	Gly	Leu	Lys	Asn	Asn	Val	Tyr	Asn	Asp	Leu	Thr	Val	Asn				
1205					1210					1215									
Val	Tyr	Ala	Lys	Asp	Asp	His	Gln	Lys	Gln	Thr	Pro	Ile	Trp	Ser	Ser				
1220					1225					1230									
Gln	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Ser	Ala	Ile	Glu	Ser	Thr	Ala	Trp	Tyr	Gly				
1235					1240					1245									
Ile	Thr	Ala	Arg	Gly	Ser	Lys	Val	Met	Pro	Gly	Asp	Tyr	Gln	Tyr	Val				
1250					1255					1260									
Val	Thr	Tyr	Arg	Asp	Glu	His	Gly	Lys	Glu	His	Gln	Lys	Gln	Tyr	Thr				
1265					1270					1275					1280				
Ile	Ser	Val	Asn	Asp	Lys	Lys	Pro	Met	Ile	Thr	Gln	Gly	Arg	Phe	Asp				
1285					1290					1295									
Thr	Ile	Asn	Gly	Val	Asp	His	Phe	Thr	Pro	Asp	Lys	Thr	Lys	Ala	Leu				
1300					1305					1310									
Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Val	Arg	Glu	Glu	Val	Phe	Tyr	Leu	Ala	Lys	Lys				
1315					1320					1325									
Asn	Gly	Arg	Lys	Phe	Asp	Val	Thr	Glu	Gly	Lys	Asp	Gly	Ile	Thr	Val				
1330					1335					1340									
Ser	Asp	Asn	Lys	Val	Tyr	Ile	Pro	Lys	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr	Thr				
1345					1350					1355					1360				
Ile	Ser	Lys	Arg	Asp	Gly	Val	Thr	Leu	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Leu	Val				
1365					1370					1375									
Glu	Asp	Arg	Ala	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ala	Thr	Leu	Arg	Asp	Leu	Lys				
1380					1385					1390									
Ala	Val	Gly	Lys	Asp	Lys	Ala	Val	Val	Asn	Phe	Gly	Leu	Asp	Leu	Pro				
1395					1400					1405									
Val	Pro	Glu	Asp	Lys	Gln	Ile	Val	Asn	Phe	Thr	Tyr	Leu	Val	Arg	Asp				
1410					1415					1420									
Ala	Asp	Gly	Lys	Pro	Ile	Glu	Asn	Leu	Glu	Tyr	Tyr	Asn	Asn	Ser	Gly				
1425					1430					1435					1440				
Asn	Ser	Leu	Ile	Leu	Pro	Tyr	Gly	Lys	Tyr	Thr	Val	Glu	Leu	Leu	Thr				
1445					1450					1455									
Tyr	Asp	Thr	Asn	Ala	Ala	Lys	Leu	Glu	Ser	Asp	Lys	Ile	Val	Ser	Phe				
1460					1465					1470									
Thr	Leu	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Phe	Gln	Gln	Val	Thr	Phe	Lys	Ile	Thr				
1475					1480					1485									

Met Leu Ala Thr Ser Gln Ile Thr Ala His Phe Asp His Leu Leu Pro  
 1490 1495 1500  
 Glu Gly Ser Arg Val Ser Leu Lys Thr Ala Gln Asp Gln Leu Ile Pro  
 1505 1510 1515 1520  
 Leu Glu Gln Ser Leu Tyr Val Pro Lys Ala Tyr Gly Lys Thr Val Gln  
 1525 1530 1535  
 Glu Gly Thr Tyr Glu Val Val Val Ser Leu Pro Lys Gly Tyr Arg Ile  
 1540 1545 1550  
 Glu Gly Asn Thr Lys Val Asn Thr Leu Pro Asn Glu Val His Glu Leu  
 1555 1560 1565  
 Ser Leu Arg Leu Val Lys Val Gly Asp Ala Ser Asp Ser Thr Gly Asp  
 1570 1575 1580  
 His Lys Val Met Ser Lys Asn Asn Ser Gln Ala Leu Thr Ala Ser Ala  
 1585 1590 1595 1600  
 Thr Pro Thr Lys Ser Thr Thr Ser Ala Thr Ala Lys Ala Leu Pro Ser  
 1605 1610 1615  
 Thr Gly Glu Lys Met Gly Leu Lys Leu Arg Ile Val Gly Leu Val Leu  
 1620 1625 1630  
 Leu Gly Leu Thr Cys Val Phe Ser Arg Lys Lys Ser Thr Lys Asp  
 1635 1640 1645  
 <210> 6  
 <211> 503  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Streptococcus pyogenes  
 <400> 6  
 Met Asn Lys Asn Lys Leu Leu Arg Val Ala Met Leu Leu Ser Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Thr Ala Glu Ser Met Thr Val Leu Ala Gln Asp Val Met Leu  
 20 25 30  
 Glu Thr His Lys Ala Thr Thr Asn Glu Thr Ser Asp Ser Ser Ser Lys  
 35 40 45  
 Glu Glu Asn Asn Lys Asn Ala Ala Pro Thr Thr Ser Asp Lys Thr Asp  
 50 55 60  
 Gln Gly Pro Leu Asp Ala Ser Ala Glu Thr Asn Ser Asn Ser Leu Val  
 65 70 75 80  
 Asn Ala Asp Asp Lys Lys Arg Ser Asp Ser Ser Gln Ser Ala Ile Gly  
 85 90 95  
 Ser Ser Asp Asn Lys Ala Glu Ala Glu Asn Gln Val Asp Asp Lys Ser  
 100 105 110  
 Thr Asp His Ser Lys Ser Thr Asp His Ser Lys Pro Thr Asp Gln Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Ser Pro Ser Lys Val Asp Thr Ala Pro Ala Ser Ser Leu Ser  
 130 135 140

Lys Gln Leu Pro Glu Ala Arg Thr Pro Ile Gln Ser Leu Ser Pro Tyr  
 145 150 155 160  
 Val Ser Asp Leu Asp Leu Ser Glu Ile Asp Ile Pro Ser Val Asn Thr  
 165 170 175  
 Tyr Ala Ala Tyr Val Glu His Trp Ser Gly Lys Asn Ala Tyr Thr His  
 180 185 190  
 His Leu Leu Ser Arg Arg Tyr Gly Ile Lys Ala Asp Gln Ile Asp Ser  
 195 200 205  
 Tyr Leu Lys Ser Thr Gly Ile Ala Tyr Asp Ser Thr Arg Ile Asn Gly  
 210 215 220  
 Glu Lys Leu Leu Gln Trp Glu Lys Lys Ser Gly Leu Asp Val Arg Ala  
 225 230 235 240  
 Ile Val Ala Ile Ala Met Ser Glu Ser Ser Leu Gly Thr Gln Gly Ile  
 245 250 255  
 Ala Thr Leu Leu Gly Ala Asn Met Phe Gly Tyr Ala Ala Phe Asp Leu  
 260 265 270  
 Asp Pro Thr Gln Ala Ser Lys Phe Asn Asp Asp Ser Ala Ile Val Lys  
 275 280 285  
 Met Thr Gln Asp Thr Ile Ile Lys Asn Lys Asn Ser Asn Phe Ala Leu  
 290 295 300  
 Gln Asp Leu Lys Ala Ala Lys Phe Ser Arg Gly Gln Leu Asn Phe Ala  
 305 310 315 320  
 Ser Asp Gly Gly Val Tyr Phe Thr Asp Thr Thr Gly Ser Gly Lys Arg  
 325 330 335  
 Arg Ala Gln Ile Met Glu Asp Leu Asp Lys Trp Ile Asp Asp His Gly  
 340 345 350  
 Gly Thr Pro Ala Ile Pro Ala Glu Leu Lys Val Gln Ser Ser Ala Ser  
 355 360 365  
 Phe Ala Ser Val Pro Ala Gly Tyr Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Asp Val  
 370 375 380  
 Leu Gly Tyr Gln Ala Ser Ser Tyr Ala Trp Gly Gln Cys Thr Trp Tyr  
 385 390 395 400  
 Val Tyr Asn Arg Ala Lys Glu Leu Gly Tyr Gln Phe Asp Pro Phe Met  
 405 410 415  
 Gly Asn Gly Gly Asp Trp Lys Tyr Lys Val Gly Tyr Ala Leu Ser Lys  
 420 425 430  
 Thr Pro Lys Val Gly Tyr Ala Ile Ser Phe Ala Pro Gly Gln Ala Gly  
 435 440 445  
 Ala Asp Gly Thr Tyr Gly His Val Ser Ile Val Glu Asp Val Arg Lys  
 450 455 460  
 Asp Gly Ser Ile Leu Ile Ser Glu Ser Asn Cys Ile Gly Leu Gly Lys  
 465 470 475 480  
 Ile Ser Tyr Arg Thr Phe Thr Ala Gln Gln Ala Glu Gln Leu Thr Tyr

	485	490	495
Val Ile Gly Lys Ser Lys Asn			
500			
<210> 7			
<211> 995			
<212> BEJOK			
<213> Streptococcus pyogenes			
<400> 7			
Met Asp Lys His Leu Leu Val Lys Arg Thr Leu Gly Cys Val Cys Ala			
1 5 10 15			
Ala Thr Leu Met Gly Ala Ala Leu Ala Thr His His Asp Ser Leu Asn			
20 25 30			
Thr Val Lys Ala Glu Glu Lys Thr Val Gln Val Gln Lys Gly Leu Pro			
35 40 45			
Ser Ile Asp Ser Leu His Tyr Leu Ser Glu Asn Ser Lys Lys Glu Phe			
50 55 60			
Lys Glu Glu Leu Ser Lys Ala Gly Gln Glu Ser Gln Lys Val Lys Glu			
65 70 75 80			
Ile Leu Ala Lys Ala Gln Gln Ala Asp Lys Gln Ala Gln Glu Leu Ala			
85 90 95			
Lys Met Lys Ile Pro Glu Lys Ile Pro Met Lys Pro Leu His Gly Ser			
100 105 110			
Leu Tyr Gly Gly Tyr Phe Arg Thr Trp His Asp Lys Thr Ser Asp Pro			
115 120 125			
Thr Glu Lys Asp Lys Val Asn Ser Met Gly Glu Leu Pro Lys Glu Val			
130 135 140			
Asp Leu Ala Phe Ile Phe His Asp Trp Thr Lys Asp Tyr Ser Leu Phe			
145 150 155 160			
Trp Lys Glu Leu Ala Thr Lys His Val Pro Lys Leu Asn Lys Gln Gly			
165 170 175			
Thr Arg Val Ile Arg Thr Ile Pro Trp Arg Phe Leu Ala Gly Gly Asp			
180 185 190			
Asn Ser Gly Ile Ala Glu Asp Thr Ser Lys Tyr Pro Asn Thr Pro Glu			
195 200 205			
Gly Asn Lys Ala Leu Ala Lys Ala Ile Val Asp Glu Tyr Val Tyr Lys			
210 215 220			
Tyr Asn Leu Asp Gly Leu Asp Val Asp Val Glu His Asp Ser Ile Pro			
225 230 235 240			
Lys Val Asp Lys Lys Glu Asp Thr Ala Gly Val Glu Arg Ser Ile Gln			
245 250 255			
Val Phe Glu Glu Ile Gly Lys Leu Ile Gly Pro Lys Gly Val Asp Lys			
260 265 270			
Ser Arg Leu Phe Ile Met Asp Ser Thr Tyr Met Ala Asp Lys Asn Pro			
275 280 285			

Leu Ile Glu Arg Gly Ala Pro Tyr Ile Asn Leu Leu Leu Val Gln Val  
 290 295 300  
 Tyr Gly Ser Gln Gly Glu Lys Gly Gly Trp Glu Pro Val Ser Asn Arg  
 305 310 315 320  
 Pro Glu Lys Thr Met Glu Glu Arg Trp Gln Gly Tyr Ser Lys Tyr Ile  
 325 330 335  
 Arg Pro Glu Gln Tyr Met Ile Gly Phe Ser Phe Tyr Glu Glu Asn Ala  
 340 345 350  
 Gln Glu Gly Asn Leu Trp Tyr Asp Ile Asn Ser Arg Lys Asp Glu Asp  
 355 360 365  
 Lys Ala Asn Gly Ile Asn Thr Asp Ile Thr Gly Thr Arg Ala Glu Arg  
 370 375 380  
 Tyr Ala Arg Trp Gln Pro Lys Thr Gly Gly Val Lys Gly Gly Ile Phe  
 385 390 395 400  
 Ser Tyr Ala Ile Asp Arg Asp Gly Val Ala His Gln Pro Lys Lys Tyr  
 405 410 415  
 Ala Lys Gln Lys Glu Phe Lys Asp Ala Thr Asp Asn Ile Phe His Ser  
 420 425 430  
 Asp Tyr Ser Val Ser Lys Ala Leu Lys Thr Val Met Leu Lys Asp Lys  
 435 440 445  
 Ser Tyr Asp Leu Ile Asp Glu Lys Asp Phe Pro Asp Lys Ala Leu Arg  
 450 455 460  
 Glu Ala Val Met Ala Gln Val Gly Thr Arg Lys Gly Asp Leu Glu Arg  
 465 470 475 480  
 Phe Asn Gly Thr Leu Arg Leu Asp Asn Pro Ala Ile Gln Ser Leu Glu  
 485 490 495  
 Gly Leu Asn Lys Phe Lys Lys Leu Ala Gln Leu Asp Leu Ile Gly Leu  
 500 505 510  
 Ser Arg Ile Thr Lys Leu Asp Arg Ser Val Leu Pro Ala Asn Met Lys  
 515 520 525  
 Pro Gly Lys Asp Thr Leu Glu Thr Val Leu Glu Thr Tyr Lys Lys Asp  
 530 535 540  
 Asn Lys Glu Glu Pro Ala Thr Ile Pro Pro Val Ser Leu Lys Val Ser  
 545 550 555 560  
 Gly Leu Thr Gly Leu Lys Glu Leu Asp Leu Ser Gly Phe Asp Arg Glu  
 565 570 575  
 Thr Leu Ala Gly Leu Asp Ala Ala Thr Leu Thr Ser Leu Glu Lys Val  
 580 585 590  
 Asp Ile Ser Gly Asn Lys Leu Asp Leu Ala Pro Gly Thr Glu Asn Arg  
 595 600 605  
 Gln Ile Phe Asp Thr Met Leu Ser Thr Ile Ser Asn His Val Gly Ser  
 610 615 620

Asn	Glu	Gln	Thr	Val	Lys	Phe	Asp	Lys	Gln	Lys	Pro	Thr	Gly	His	Tyr	
625					630					635					640	
Pro	Asp	Thr	Tyr	Gly	Lys	Thr	Ser	Leu	Arg	Leu	Pro	Val	Ala	Asn	Glu	
				645					650					655		
Lys	Val	Asp	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	Leu	Phe	Gly	Thr	Val	Thr	Asn	Gln	
			660					665					670			
Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Ser	Glu	Ala	Asp	Tyr	Lys	Ala	Tyr	Gln	Asn	His	
		675					680					685				
Lys	Ile	Ala	Gly	Arg	Ser	Phe	Val	Asp	Ser	Asn	Tyr	His	Tyr	Asn	Asn	
	690					695				700						
Phe	Lys	Val	Ser	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Val	Lys	Val	Thr	Asp	Ser	Thr	
705					710					715					720	
Leu	Gly	Thr	Thr	Thr	Asp	Lys	Thr	Leu	Ala	Thr	Asp	Lys	Glu	Glu	Thr	
				725					730					735		
Tyr	Lys	Val	Asp	Phe	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	Lys	Thr	Lys	Ala	Val	His	
			740					745					750			
Thr	Ala	Lys	Val	Ile	Val	Gly	Asp	Glu	Lys	Thr	Met	Met	Val	Asn	Leu	
		755					760					765				
Ala	Glu	Gly	Ala	Thr	Val	Ile	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Pro	Val	Asn	Ala	
	770					775					780					
Arg	Lys	Val	Phe	Asp	Gly	Gln	Leu	Gly	Ser	Glu	Thr	Asp	Asn	Ile	Ser	
785					790					795					800	
Leu	Gly	Trp	Asp	Ser	Lys	Gln	Ser	Ile	Ile	Phe	Lys	Leu	Lys	Glu	Asp	
				805					810					815		
Gly	Leu	Ile	Lys	His	Trp	Arg	Phe	Phe	Asn	Asp	Ser	Ala	Arg	Asn	Pro	
			820					825					830			
Glu	Thr	Thr	Asn	Lys	Pro	Ile	Gln	Glu	Ala	Ser	Leu	Gln	Ile	Phe	Asn	
		835					840					845				
Ile	Lys	Asp	Tyr	Asn	Leu	Asp	Asn	Leu	Leu	Glu	Asn	Pro	Asn	Lys	Phe	
	850					855					860					
Asp	Asp	Glu	Lys	Tyr	Trp	Ile	Thr	Val	Asp	Thr	Tyr	Ser	Ala	Gln	Gly	
865					870					875					880	
Glu	Arg	Ala	Thr	Ala	Phe	Ser	Asn	Thr	Leu	Asn	Asn	Ile	Thr	Ser	Lys	
				885					890					895		
Tyr	Trp	Arg	Val	Val	Phe	Asp	Thr	Lys	Gly	Asp	Arg	Tyr	Ser	Ser	Pro	
			900					905					910			
Val	Val	Pro	Glu	Leu	Gln	Ile	Leu	Gly	Tyr	Pro	Leu	Pro	Asn	Ala	Asp	
		915					920					925				
Thr	Ile	Met	Lys	Thr	Val	Thr	Thr	Ala	Lys	Glu	Leu	Ser	Gln	Gln	Lys	
	930					935					940					
Asp	Lys	Phe	Ser	Gln	Lys	Met	Leu	Asp	Glu	Leu	Lys	Ile	Lys	Glu	Met	
945					950					955					960	
Ala	Leu	Glu	Thr	Ser	Leu	Asn	Ser	Lys	Ile	Phe	Asp	Val	Thr	Ala	Ile	



	965	970	975
Asn Ala Asn Ala Gly Val Leu Lys Asp Cys Ile Glu Lys Arg Gln Leu			
	980	985	990
Leu Lys Lys			
	995		
<210>	8		
<211>	221		
<212>	БЕЛОК		
<213>	Streptococcus pyogenes		
<400>	8		
Gln Gln Asp Pro Asp Pro Ser Gln Leu His Arg Ser Ser Leu Val Lys			
1	5	10	15
Asn Leu Gln Asn Ile Tyr Phe Leu Tyr Glu Gly Asp Pro Val Thr His			
	20	25	30
Glu Asn Val Lys Ser Val Asp Gln Leu Leu Ser His Asp Leu Ile Tyr			
	35	40	45
Asn Val Ser Gly Pro Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Thr Glu Leu Lys Asn			
	50	55	60
Gln Glu Met Ala Thr Leu Phe Lys Asp Lys Asn Val Asp Ile Tyr Gly			
65	70	75	80
Val Glu Tyr Tyr His Leu Cys Tyr Leu Cys Glu Asn Ala Glu Arg Ser			
	85	90	95
Ala Cys Ile Tyr Gly Gly Val Thr Asn His Glu Gly Asn His Leu Glu			
	100	105	110
Ile Pro Lys Lys Ile Val Val Lys Val Ser Ile Asp Gly Ile Gln Ser			
	115	120	125
Leu Ser Phe Asp Ile Glu Thr Asn Lys Lys Met Val Thr Ala Gln Glu			
	130	135	140
Leu Asp Tyr Lys Val Arg Lys Tyr Leu Thr Asp Asn Lys Gln Leu Tyr			
145	150	155	160
Thr Asn Gly Pro Ser Lys Tyr Glu Thr Gly Tyr Ile Lys Phe Ile Pro			
	165	170	175
Lys Asn Lys Glu Ser Phe Trp Phe Asp Phe Phe Pro Glu Pro Glu Phe			
	180	185	190
Thr Gln Ser Lys Tyr Leu Met Ile Tyr Lys Asp Asn Glu Thr Leu Asp			
	195	200	205
Ser Asn Thr Ser Gln Ile Glu Val Tyr Leu Thr Thr Lys			
	210	215	220
<210>	9		
<211>	865		
<212>	БЕЛОК		
<213>	Streptococcus pyogenes		
<400>	9		
Ala Asp Glu Leu Ser Thr Met Ser Glu Pro Thr Ile Thr Asn His Ala			
1	5	10	15

Gln Gln Gln Ala Gln His Leu Thr Asn Thr Glu Leu Ser Ser Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Lys Ser Gln Asp Thr Ser Gln Ile Thr Leu Lys Thr Asn Arg Glu  
 35 40 45  
 Lys Glu Gln Ser Gln Asp Leu Val Ser Glu Pro Thr Thr Thr Glu Leu  
 50 55 60  
 Ala Asp Thr Asp Ala Ala Ser Met Ala Asn Thr Gly Ser Asp Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Gln Lys Ser Ala Ser Leu Pro Pro Val Asn Thr Asp Val His Asp Trp  
 85 90 95  
 Val Lys Thr Lys Gly Ala Trp Asp Lys Gly Tyr Lys Gly Gln Gly Lys  
 100 105 110  
 Val Val Ala Val Ile Asp Thr Gly Ile Asp Pro Ala His Gln Ser Met  
 115 120 125  
 Arg Ile Ser Asp Val Ser Thr Ala Lys Val Lys Ser Lys Glu Asp Met  
 130 135 140  
 Leu Ala Arg Gln Lys Ala Ala Gly Ile Asn Tyr Gly Ser Trp Ile Asn  
 145 150 155 160  
 Asp Lys Val Val Phe Ala His Asn Tyr Val Glu Asn Ser Asp Asn Ile  
 165 170 175  
 Lys Glu Asn Gln Phe Glu Asp Phe Asp Glu Asp Trp Glu Asn Phe Glu  
 180 185 190  
 Phe Asp Ala Glu Ala Glu Pro Lys Ala Ile Lys Lys His Lys Ile Tyr  
 195 200 205  
 Arg Pro Gln Ser Thr Gln Ala Pro Lys Glu Thr Val Ile Lys Thr Glu  
 210 215 220  
 Glu Thr Asp Gly Ser His Asp Ile Asp Trp Thr Gln Thr Asp Asp Asp  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Tyr Glu Ser His Gly Met His Val Thr Gly Ile Val Ala Gly  
 245 250 255  
 Asn Ser Lys Glu Ala Ala Ala Thr Gly Glu Arg Phe Leu Gly Ile Ala  
 260 265 270  
 Pro Glu Ala Gln Val Met Phe Met Arg Val Phe Ala Asn Asp Ile Met  
 275 280 285  
 Gly Ser Ala Glu Ser Leu Phe Ile Lys Ala Ile Glu Asp Ala Val Ala  
 290 295 300  
 Leu Gly Ala Asp Val Ile Asn Leu Ser Leu Gly Thr Ala Asn Gly Ala  
 305 310 315 320  
 Gln Leu Ser Gly Ser Lys Pro Leu Met Glu Ala Ile Glu Lys Ala Lys  
 325 330 335  
 Lys Ala Gly Val Ser Val Val Val Ala Ala Gly Asn Glu Arg Val Tyr  
 340 345 350

Gly Ser Asp His Asp Asp Pro Leu Ala Thr Asn Pro Asp Tyr Gly Leu  
 355 360 365  
 Val Gly Ser Pro Ser Thr Gly Arg Thr Pro Thr Ser Val Ala Ala Ile  
 370 375 380  
 Asn Ser Lys Trp Val Ile Gln Arg Leu Met Thr Val Lys Glu Leu Glu  
 385 390 395 400  
 Asn Arg Ala Asp Leu Asn His Gly Lys Ala Ile Tyr Ser Glu Ser Val  
 405 410 415  
 Asp Phe Lys Asp Ile Lys Asp Ser Leu Gly Tyr Asp Lys Ser His Gln  
 420 425 430  
 Phe Ala Tyr Val Lys Glu Ser Thr Asp Ala Gly Tyr Asn Ala Gln Asp  
 435 440 445  
 Val Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Asp Pro Asn Lys Thr Tyr  
 450 455 460  
 Asp Glu Met Ile Ala Leu Ala Lys Lys His Gly Ala Leu Gly Val Leu  
 465 470 475 480  
 Ile Phe Asn Asn Lys Pro Gly Gln Ser Asn Arg Ser Met Arg Leu Thr  
 485 490 495  
 Ala Asn Gly Met Gly Ile Pro Ser Ala Phe Ile Ser His Glu Phe Gly  
 500 505 510  
 Lys Ala Met Ser Gln Leu Asn Gly Asn Gly Thr Gly Ser Leu Glu Phe  
 515 520 525  
 Asp Ser Val Val Ser Lys Ala Pro Ser Gln Lys Gly Asn Glu Met Asn  
 530 535 540  
 His Phe Ser Asn Trp Gly Leu Thr Ser Asp Gly Tyr Leu Lys Pro Asp  
 545 550 555 560  
 Ile Thr Ala Pro Gly Gly Asp Ile Tyr Ser Thr Tyr Asn Asp Asn His  
 565 570 575  
 Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro Gln Ile Ala Gly  
 580 585 590  
 Ala Ser Leu Leu Val Lys Gln Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Asn Leu  
 595 600 605  
 Pro Lys Glu Lys Ile Ala Asp Ile Val Lys Asn Leu Leu Met Ser Asn  
 610 615 620  
 Ala Gln Ile His Val Asn Pro Glu Thr Lys Thr Thr Thr Ser Pro Arg  
 625 630 635 640  
 Gln Gln Gly Ala Gly Leu Leu Asn Ile Asp Gly Ala Val Thr Ser Gly  
 645 650 655  
 Leu Tyr Val Thr Gly Lys Asp Asn Tyr Gly Ser Ile Ser Leu Gly Asn  
 660 665 670  
 Ile Thr Asp Thr Met Thr Phe Asp Val Thr Val His Asn Leu Ser Asn  
 675 680 685  
 Lys Asp Lys Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Leu Leu Thr Asp His Val

690	695	700
Asp Pro Gln Lys Gly Arg Phe Thr Leu Thr Ser His Ser Leu Lys Thr 705 710 715 720		
Tyr Gln Gly Gly Glu Val Thr Val Pro Ala Asn Gly Lys Val Thr Val 725 730 735		
Arg Val Thr Met Asp Val Ser Gln Phe Thr Lys Glu Leu Thr Lys Gln 740 745 750		
Met Pro Asn Gly Tyr Tyr Leu Glu Gly Phe Val Arg Phe Arg Asp Ser 755 760 765		
Gln Asp Asp Gln Leu Asn Arg Val Asn Ile Pro Phe Val Gly Phe Lys 770 775 780		
Gly Gln Phe Glu Asn Leu Ala Val Ala Glu Glu Ser Ile Tyr Arg Leu 785 790 795 800		
Lys Ser Gln Gly Lys Thr Gly Phe Tyr Phe Asp Glu Ser Gly Pro Lys 805 810 815		
Asp Asp Ile Tyr Val Gly Lys His Phe Thr Gly Leu Val Thr Leu Gly 820 825 830		
Ser Glu Thr Asn Val Ser Thr Lys Thr Ile Ser Asp Asn Gly Leu His 835 840 845		
Thr Leu Gly Thr Phe Lys Asn Ala Asp Gly Lys Phe Ile Leu Glu Lys 850 855 860		
Asn 865		
<210> 10		
<211> 298		
<212> БЕЛОР		
<213> Streptococcus pyogenes		
<400> 10		
Ser Val Gly Val Ser His Gln Val Lys Ala Asp Asp Arg Ala Ser Gly 1 5 10 15		
Glu Thr Lys Ala Ser Asn Thr His Asp Asp Ser Leu Pro Lys Pro Glu 20 25 30		
Thr Ile Gln Glu Ala Lys Ala Thr Ile Asp Ala Val Glu Lys Thr Leu 35 40 45		
Ser Gln Gln Lys Ala Glu Leu Thr Glu Leu Ala Thr Ala Leu Thr Lys 50 55 60		
Thr Thr Ala Glu Ile Asn His Leu Lys Glu Gln Gln Asp Asn Glu Gln 65 70 75 80		
Lys Ala Leu Thr Ser Ala Gln Glu Ile Tyr Thr Asn Thr Leu Ala Ser 85 90 95		
Ser Glu Glu Thr Leu Leu Ala Gln Gly Ala Glu His Gln Arg Glu Leu 100 105 110		
Thr Ala Thr Glu Thr Glu Leu His Asn Ala Gln Ala Asp Gln His Ser 115 120 125		

Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ser Ala Glu Thr  
130 135 140

Thr Arg Ala Gln Asp Leu Val Glu Gln Val Lys Thr Ser Glu Gln Asn  
145 150 155 160

Ile Ala Lys Leu Asn Ala Met Ile Ser Asn Pro Asp Ala Ile Thr Lys  
165 170 175

Ala Ala Gln Thr Ala Asn Asp Asn Thr Lys Ala Leu Ser Ser Glu Leu  
180 185 190

Glu Lys Ala Lys Ala Asp Leu Glu Asn Gln Lys Ala Lys Val Lys Lys  
195 200 205

Gln Leu Thr Glu Glu Leu Ala Ala Gln Lys Ala Ala Leu Ala Glu Lys  
210 215 220

Glu Ala Glu Leu Ser Arg Leu Lys Ser Ser Ala Pro Ser Thr Gln Asp  
225 230 235 240

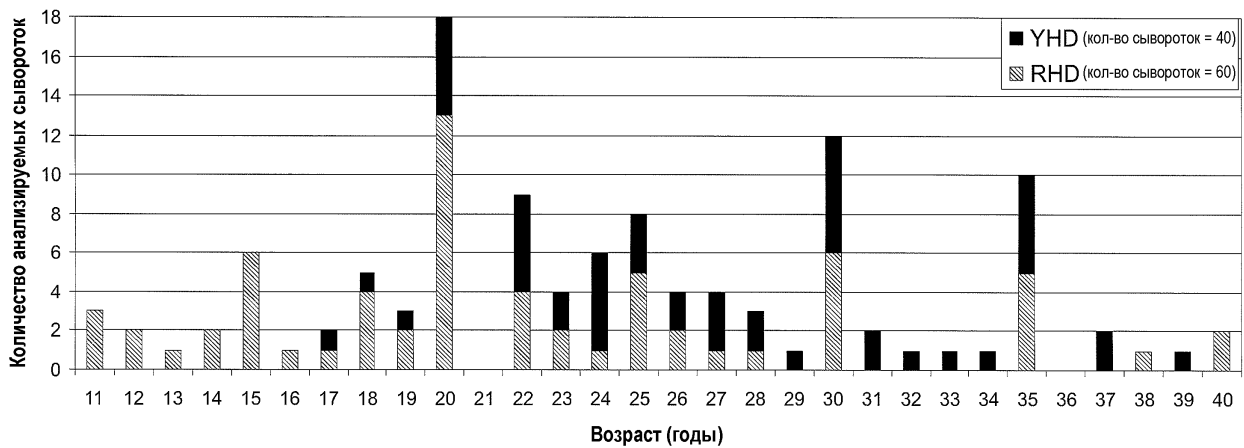
Ser Ile Val Gly Asn Asn Thr Met Lys Ala Pro Gln Gly Tyr Pro Leu  
245 250 255

Glu Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ile Gly Ser Ala Ser  
260 265 270

Tyr Asn Asn Tyr Tyr Lys Glu His Ala Asp Gln Ile Ile Ala Lys Ala  
275 280 285

Ser Pro Gly Asn Gln Leu Asn Gln Tyr Gln  
290 295

Распределение по возрасту



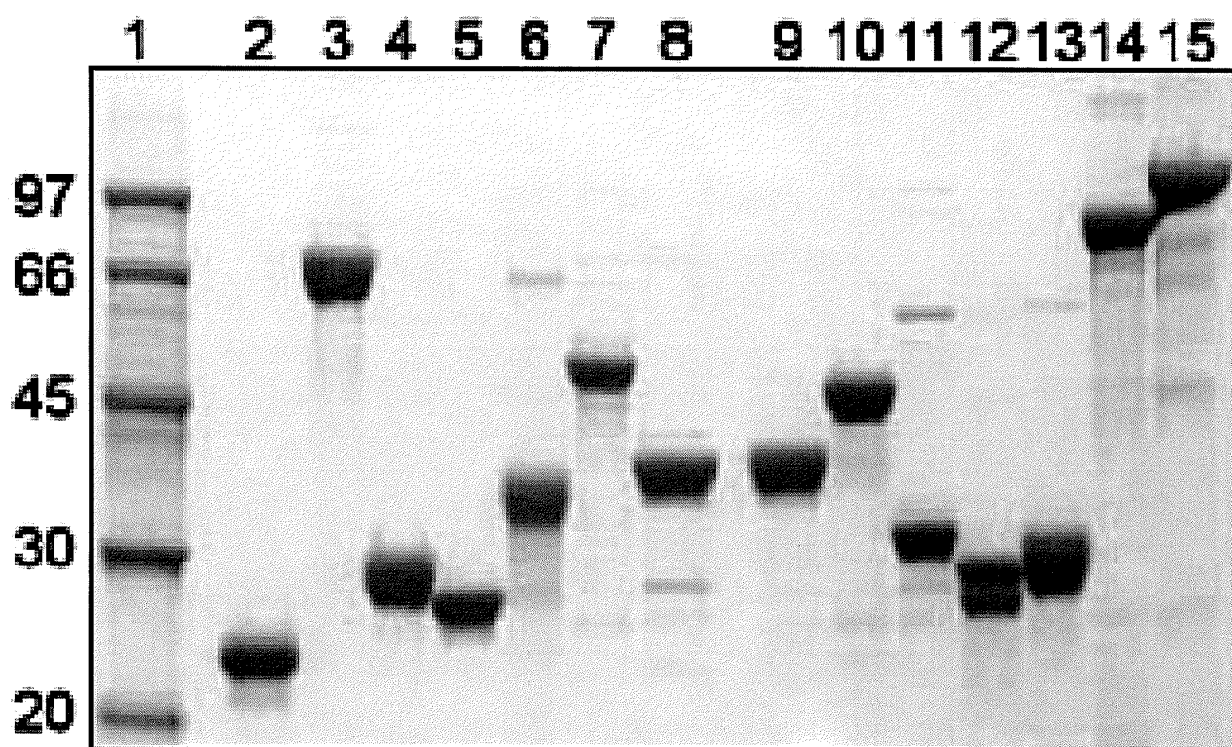
11-16 лет (n=15 RHD и n=0 YHD)

17-40 лет (n=43 RHD и n=40 YHD)

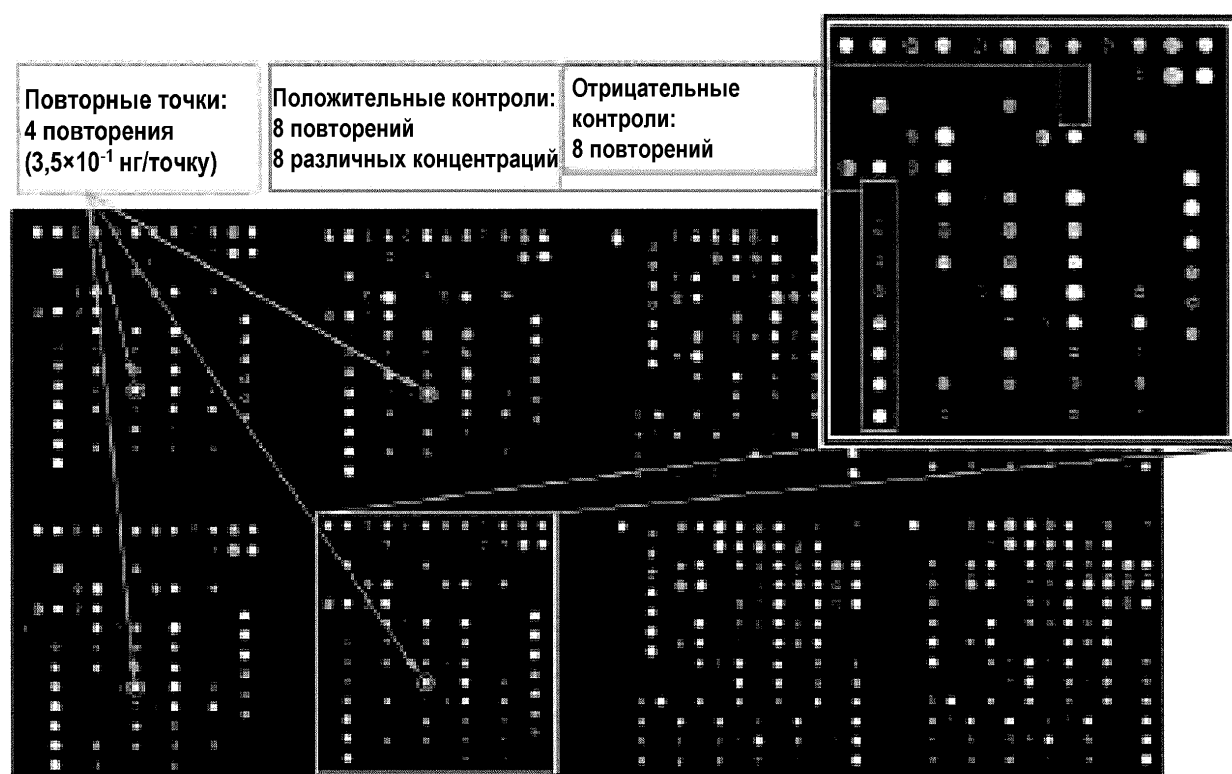


Совпадающие по возрасту пациенты-здоровые доноры

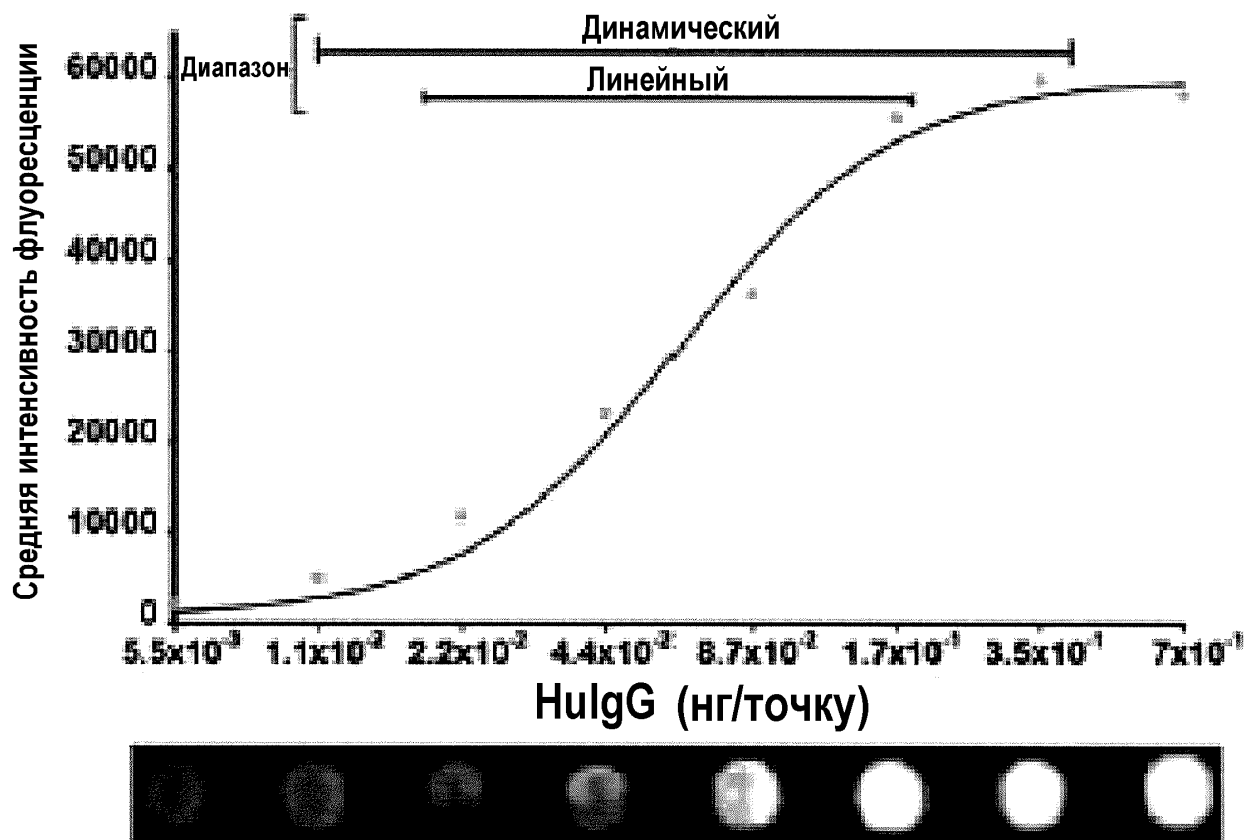
ФИГ.1



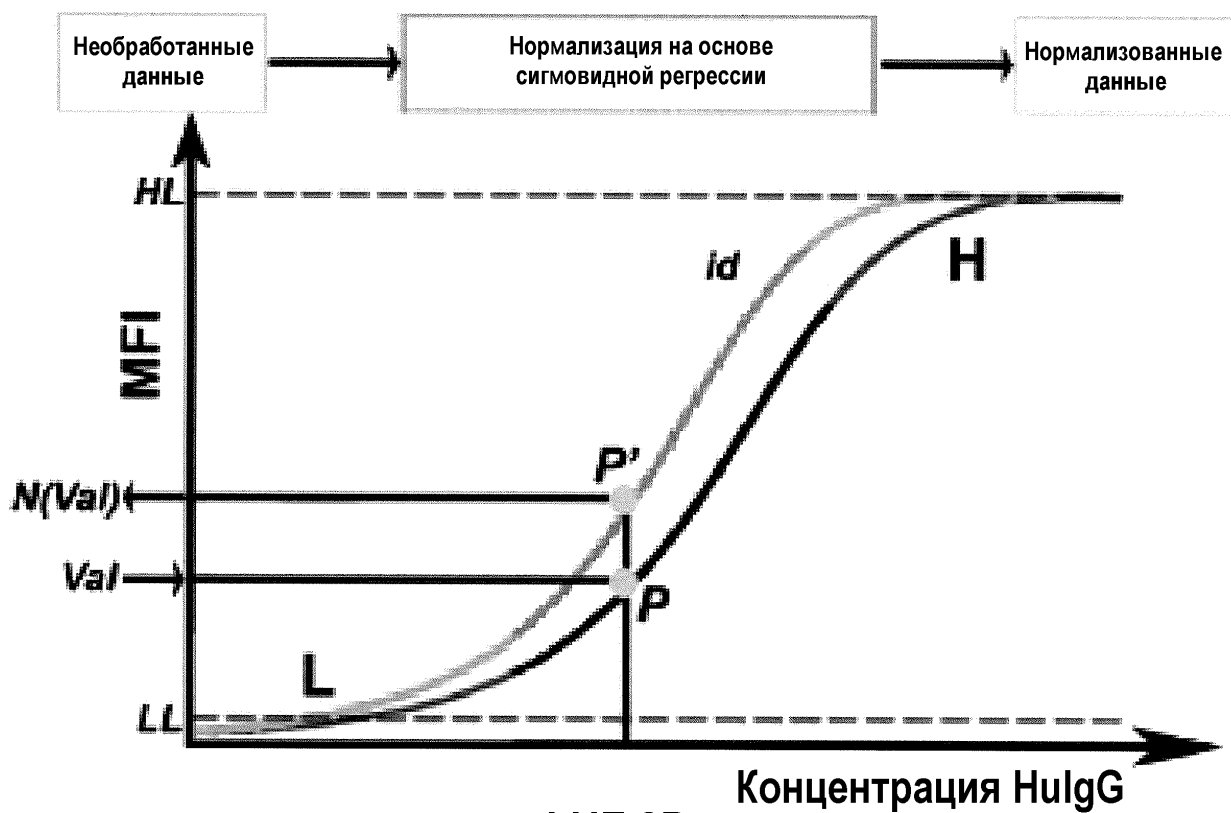
ФИГ.2А



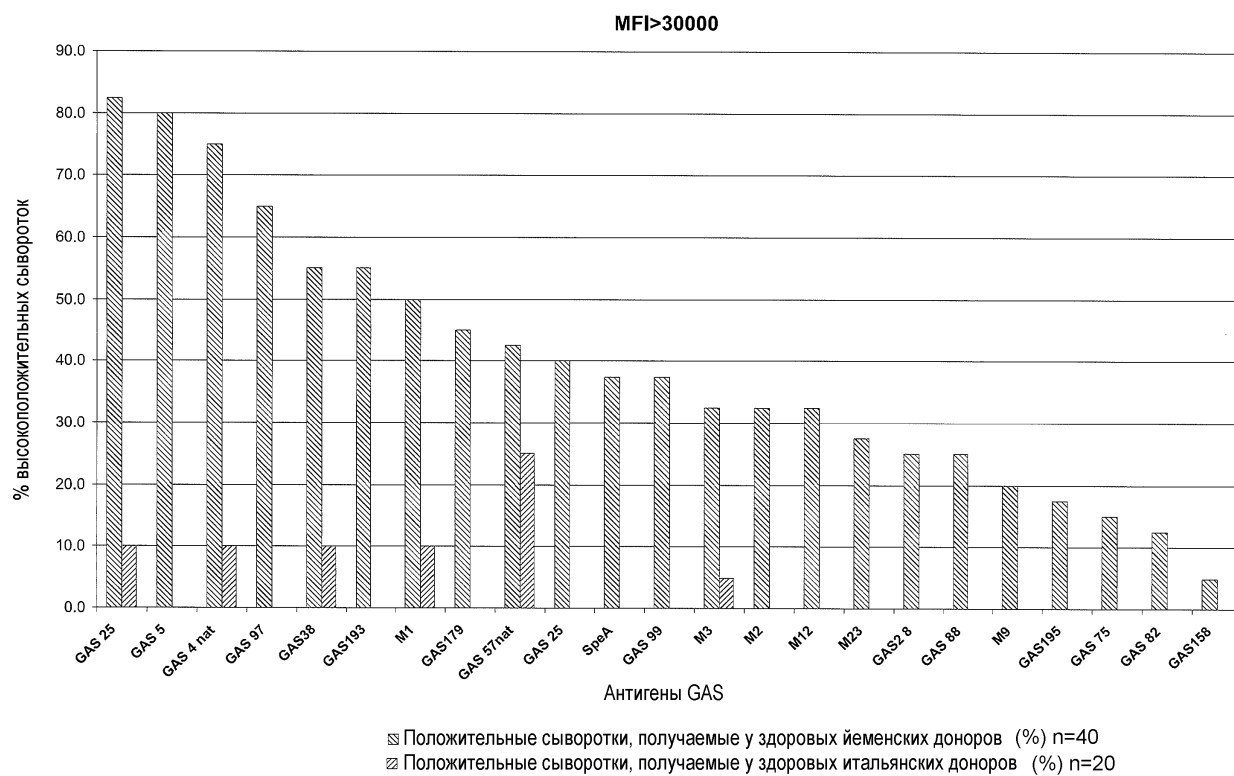
ФИГ.2В



ФИГ.2С



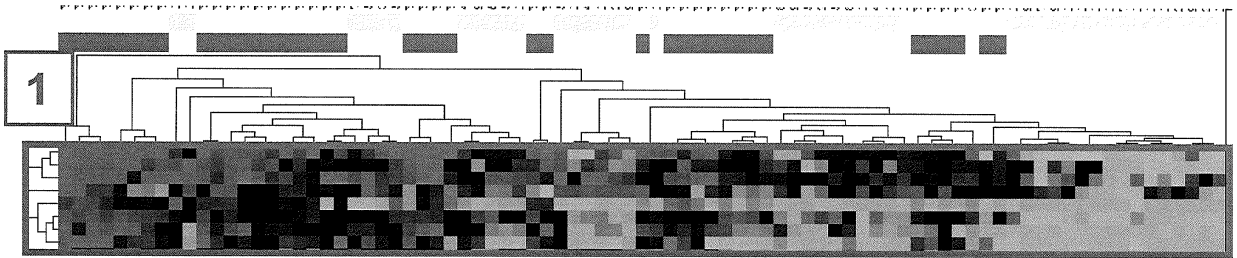
ФИГ.2D



**ФИГ.3**







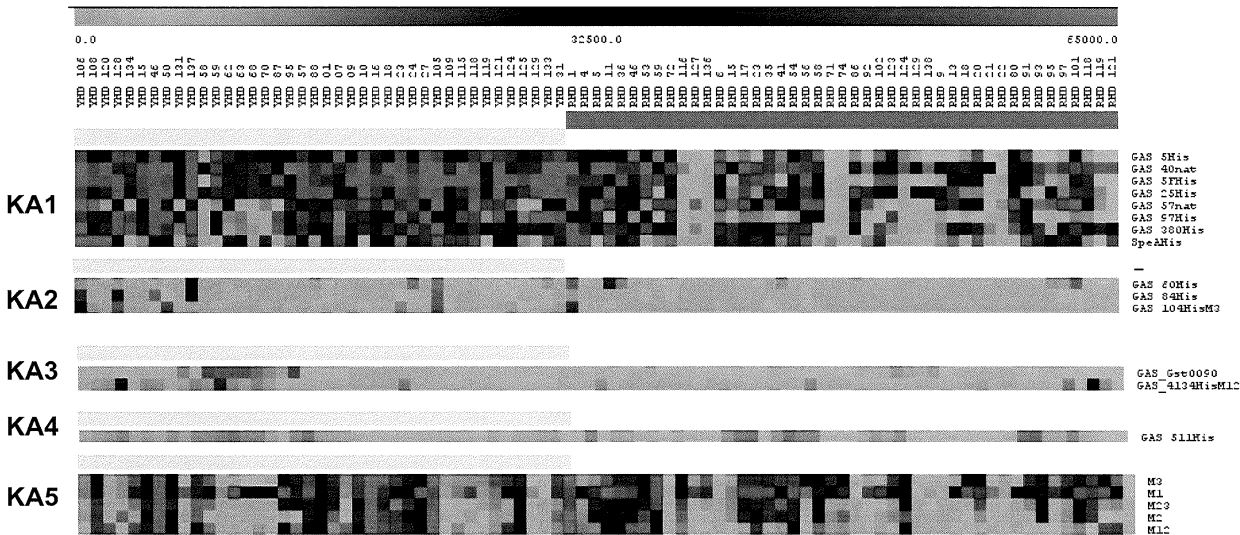
GAS 5F предполагаемый секретируемый белок (деление клеток и устойчивость к антибиотикам)  
GAS 25 предшественник стрептолизина O  
GAS 40 предполагаемый поверхностный предотвращающий белок  
M1  
GAS 179 предполагаемая эстераза  
GAS 97 гомолог предшественника иммуногенного секретируемого белка  
GAS 193 предшественник неиммуногенного секретируемого белка

2

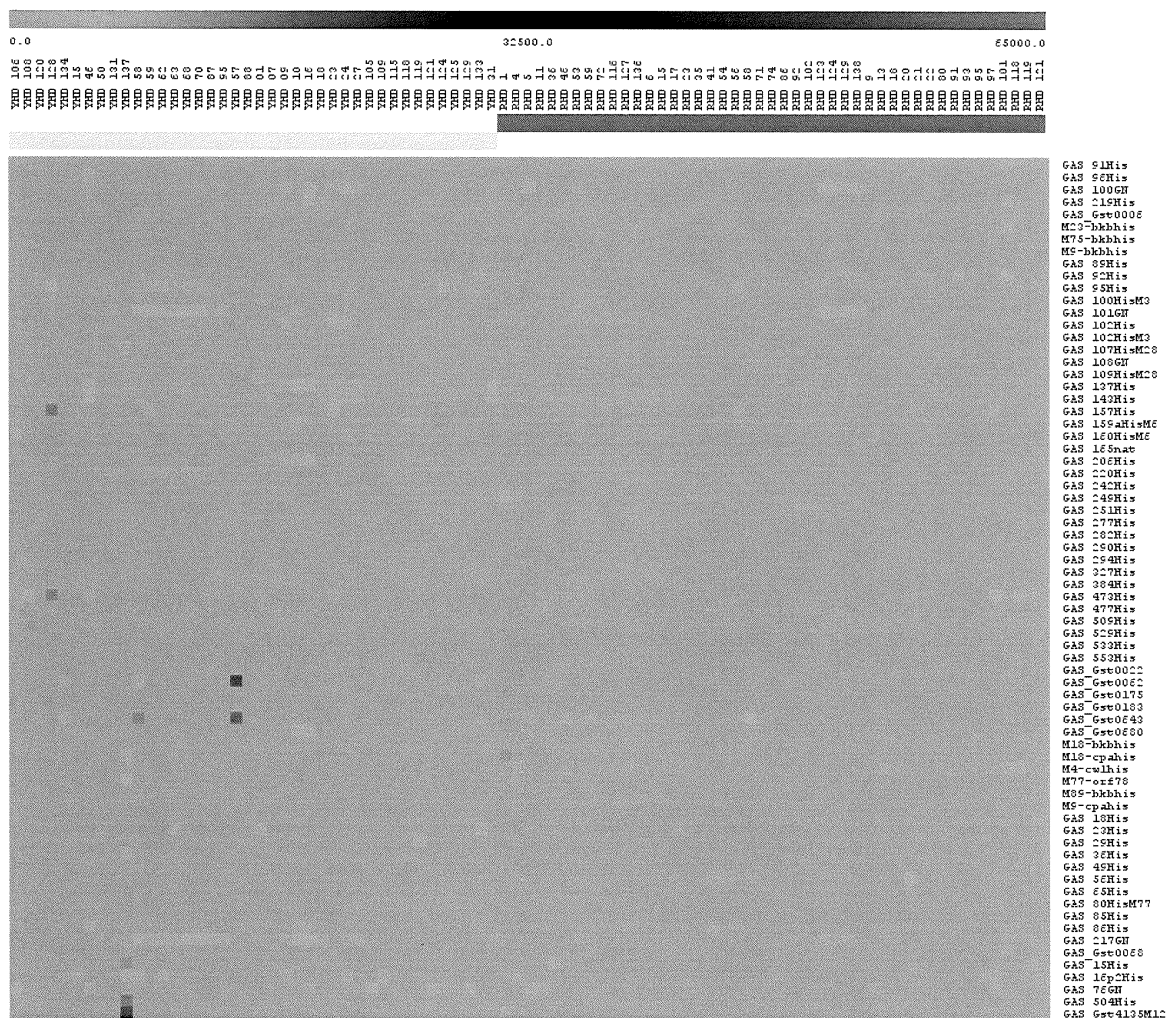


5 различных M-белков (M12; M23; M2; M3; M9)  
GAS 57 предполагаемая протеинкиназа клеточной оболочки  
GAS 380 гипотетический белок  
SpeA

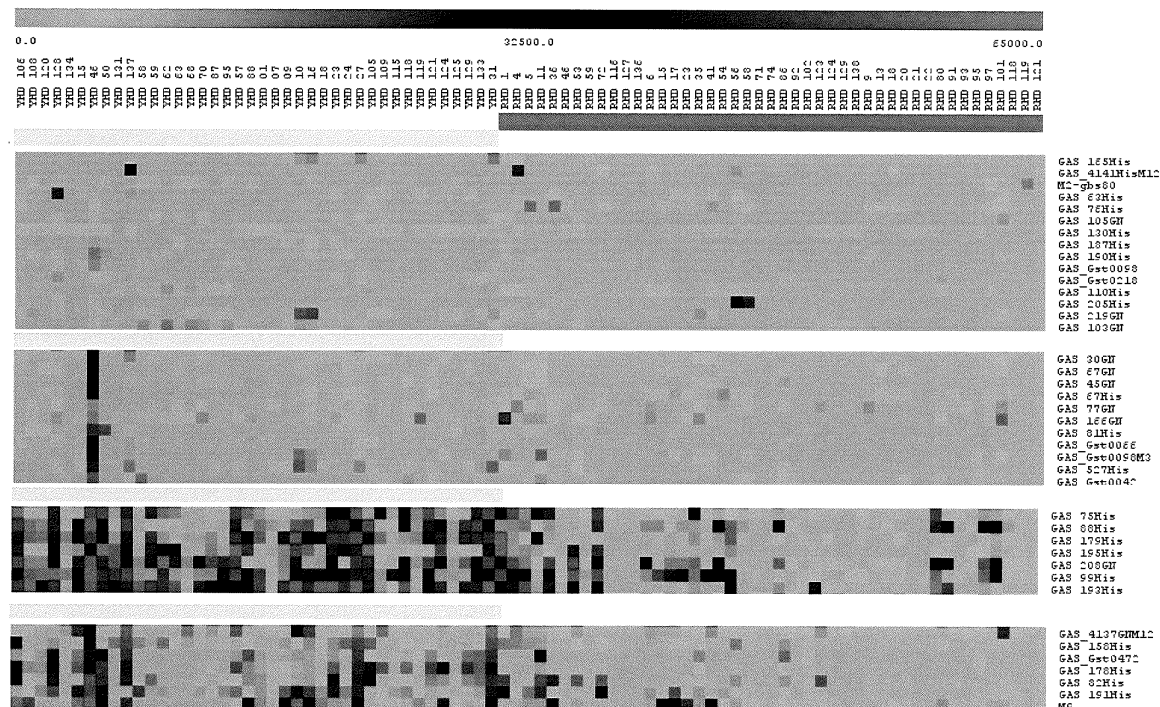
ФИГ.4 (продолжение)



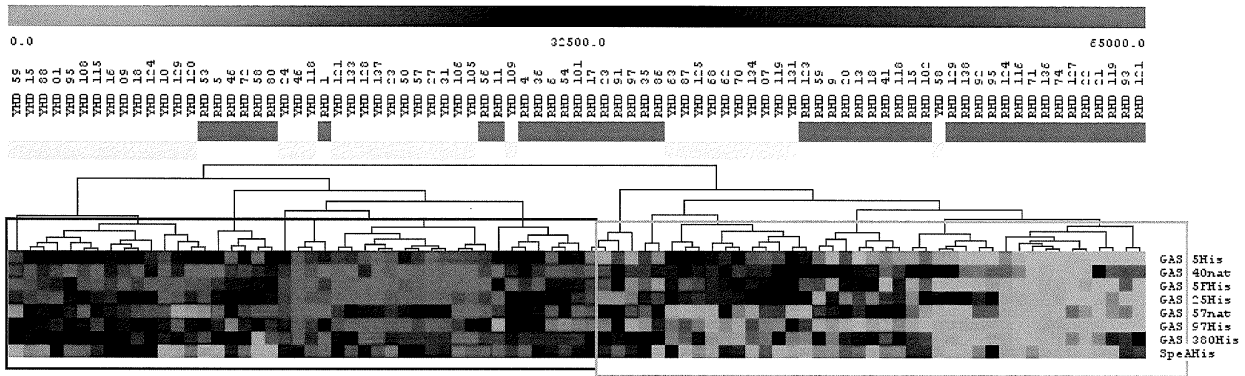
ФИГ.5



**ФИГ.5 (продолжение)**



**ФИГ.5 (продолжение)**



ФИГ.6А

		Реальные условия		Тест	
		Здоровые		Чувствительность	
		Пациенты с RHD	индивидуумы	Специфичность	
КА 1	Кластер				
	HS1	31	11	0.73	0.69
	HS2	14	29		

ФИГ.6В

		Реальные условия		Тест	
		Здоровые		Чувствительность	
		Пациенты с RHD	индивидуумы	Специфичность	
Идеальный пример	Кластер				
	HS1	43	0	1.00	1.00
	HS2	0	40		

ФИГ.6С

**A KA 1**

Кластер	Реальные условия		Тест	
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	Специфичность	Чувствительность
HS1	31	11	<b>0.73</b>	0.69
HS2	14	29		

**B KA 5**

Кластер	Реальные условия		Тест	
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	Специфичность	Чувствительность
HS1	43	35	<b>0.13</b>	1.00
HS2	0	5		

**C KA 9**

Кластер	Реальные условия		Тест	
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	Специфичность	Чувствительность
HS1	43	33	<b>0.18</b>	1.00
HS2	0	7		

**D KA 10**

Кластер	Реальные условия		Тест	
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	Специфичность	Чувствительность
HS1	43	39	<b>0.03</b>	1.00
HS2	0	1		

**E KA 5 + M9**

Кластер	Реальные условия		Тест	
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	Специфичность	Чувствительность
HS1	43	35	<b>0.13</b>	1.00
HS2	0	5		

**ФИГ.7**

**F GAS5 GAS5  
GAS25 GAS40**

Кластер	Реальные условия		Тест	
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	Специфичность	Чувствительность
HS1	35	4	<b>0.90</b>	0.78
HS2	10	36		

**G GAS5 GAS5F GAS25  
GAS40 GAS57**

Кластер	Реальные условия		Тест	
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	Специфичность	Чувствительность
HS1	38	7	<b>0.82</b>	0.83
HS2	8	32		

**H GAS5 GAS25  
GAS40 GAS57**

Кластер	Реальные условия		Тест	
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	Специфичность	Чувствительность
HS1	18	5	<b>0.88</b>	0.42
HS2	25	35		

**I GAS5F GAS25  
GAS40 GAS57**

Кластер	Реальные условия		Тест	
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	Специфичность	Чувствительность
HS1	34	4	<b>0.90</b>	0.79
HS2	9	36		

**ФИГ.7 (продолжение)**