



(51) МПК
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

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: El DEMELLAWEY 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 Сохail (IT),
ГРАНДИ Гвидо (IT),
БАРТОЛИНИ Эрика (IT)

(73) Патентообладатель(и):
НОВАРТИС АГ (CH)

C2
25584
C2

R U
2559584
C2

(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 обеспечивает лечение RHD, связанного с

инфекцией GAS; точную диагностику RHD. 6 н. и 7 з.п. ф-лы, 7 ил., 1 табл., 1 пр.

R U

2 5 5 9 5 8 4 C 2

C 2

2 5 5 9 5 8 4

R U



(51) Int. Cl.
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(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 Partnery"

(72) Inventor(s):

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

(73) Proprietor(s):

NOVARTIS AG (CH)

C 2

C

(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 infections provides the treatment of GAS-infection-associated RHD; accurate RHD diagnostics.

13 cl, 7 dwg, 1 tbl, 1 ex

R U

R
U
2 5 5 9 5 8 4

C
2

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

15 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 осаждения эритроцитов или С-реактивный белок; лейкоцитоз; 20 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 25 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 30 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 40 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:

45 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

b) сравнения реакционноспособности антител в биологическом образце, взятом у пациента, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS с реакционноспособностью антител в контрольном биологическом образце, взятом у здорового индивидуума, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS,

5 где меньшая реакционноспособность 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.

10 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:

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

20 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),

25 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;

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

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

40 где меньшая реакционноспособность в биологическом образце, взятом у пациента, по сравнению с реакционноспособностью 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.

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

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

различия 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:

5

Таблица 1 Антигены GAS, применяемые в способах диагностики по изобретению			
SEQ ID NO	Внутреннее обозначение GAS	Номер Spy	Номер gi
10	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

15

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 20 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 25 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.

30

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.

35

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.

40

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 отмыки 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 меченным 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

- 5 флуоресцентную метку, сравнение интенсивности флуоресценции можно использовать для оценки относительной реакционноспособности антител и, таким образом, определения того, демонстрирует ли конкретный образец, взятый у пациента, сниженную реакционноспособность антител по сравнению с контрольным биологическим образцом. Можно ожидать, что фоновая интенсивность флуоресценции составляет приблизительно
- 10 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 реакционноспособности, указывающий на высокий титр антител, связывающихся с антигеном GAS, в образце. Таким образом, в
- 15 определенных аспектах изобретения интенсивность флуоресценции 15000-30000 может указывать на низкую реакционноспособность, 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.

20 **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

- 25 представлять собой образец сыворотки.

Биологический образец, взятый у пациента, получают у пациента-человека. Пациент-человек, может представлять собой взрослого, подроста 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.

- 35 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:

- 40 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 45 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 10 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 20 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 25 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 30 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 40 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 точечно 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 5 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 10 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 15 профилактика антибиотиком (как правило, пенициллином) в течение периода по меньшей мере 5 лет после диагноза для снижения риска последующей инфекции GAS и 20 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 25 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 30 риском развития RHD, связанного с инфекцией GAS, лечение антибиотиками может быть необязательным.

Понимание авторами изобретения того, что сыворотки здоровых индивидуумов 35 демонстрируют высокую реакционноспособность 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 40 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 45 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

- 5 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:
- 10 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
- 15 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')₂ 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.

30 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.

35 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

5 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.

10 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 экспципиентов.

15 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 лиофилизованный состав.

20 Композиция может содержать консерванты, такие как тиомерсал или 2-феноксиэтанол. 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 25 предпочтительными являются вакцины, не содержащие консервантов.

Для улучшения термостабильности композиция может содержать термозащитное 30 средство. Дополнительные подробности о таких средствах предоставлены далее.

25 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±2 мг/мл NaCl. Другие соли, которые могут присутствовать, включают хлорид калия, дигидрофосфат 30 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.

35 Композиции могут содержать один или несколько буферов. Характерные буферы включают: фосфатный буфер; буфер Tris; боратный буфер; сукцинатный буфер; гистидиновый буфер (в частности, с адьювантом 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.

40 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 глютена.

45 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 5 содержат один или несколько адьювантов. Адьюванты могут включать адьювант TH1 и/или адьювант TH2, дополнительно описываемые далее.

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

А. Композиции, содержащие неорганические вещества

Композиции, содержащие неорганические вещества, подходящие для использования 10 в качестве адьювантов 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 15 поддающей 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 адьюванты, известные как гидроксид алюминия и фосфат 20 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" адьюванты, которые, как правило, используют в качестве адьювантов. Адьюванты, известные как "гидроксид алюминия", как правило, представляют собой соли гидроксида алюминия, 25 которые, как правило, по меньшей мере частично являются кристаллическими.

Адьюванты, 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, 30 а условия реакции и концентрации при осаждении влияют на степень замещения фосфата на гидроксил в соли.

Для адьювантов гидроксида алюминия типична волокнистая морфология (например, как видно на микрофотографии с трансмиссионного электронного микроскопа). pH адьювантов гидроксида алюминия, как правило, составляет приблизительно 11 т.е. сам адьювант обладает положительным поверхностным зарядом при физиологическом 35 рН. Опубликованная адсорбционная емкость для адьювантов гидроксида алюминия составляет 1,8-2,6 мг белка на мг Al^{+++} при pH 7,4.

Как правило, молярное отношение PO_4/Al адьювантов фосфата алюминия составляет 40 0,3-1,2, например, 0,8-1,2, как правило, $0,95\pm0,1$. Как правило, фосфат алюминия является аморфным, особенно в форме гидроксифосфатных солей. Типичный адьювант представляет собой аморфный гидроксифосфат алюминий с молярным отношением PO_4/Al 0,84-0,92, содержащий 0,6 мг Al^{3+} /мл. Как правило, фосфат алюминия является 45 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 адьювантов фосфата алюминия составляет 0,7-1,5 мг белок на мг Al^{+++} при pH 7,4.

Точка нулевого заряда (PZC) фосфата алюминия обратно пропорционально связана

со степенью замещения фосфата гидроксилом, и эта степень замещения может варьировать в зависимости от условий реакции и концентрации реагентов, используемых для получения соли посредством осаждения. РЗС также изменяется при изменении концентрации свободных ионов фосфата в растворе (больше фосфата = более кислая РЗС) или при добавлении буфера, такого как гистидиновый буфер (делает РЗС более основной). Как правило, РЗС 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, ≤ 5 мг/мл, ≤ 4 мг/мл, ≤ 3 мг/мл, ≤ 2 мг/мл, ≤ 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 адьювант 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.

30 В. Масляные эмульсии

Композиции масляных эмульсий, подходящие для использования в качестве адьювантов 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).

35 Также можно использовать полный адьювант Фрейнда (CFA) и неполный адьювант Фрейнда (IFA).

Известны различные эмульсионные адьюванты "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 40 разлагаемыми (метаболизируемыми) 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 микрофлюидайзера. Предпочтительными являются капли с размером менее 220 нм, так как их можно подвергать стерилизации фильтрованием.

45 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, 5 рис, тэфф, тритиcale 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 10 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, 15 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 20 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.

25 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: 30 поверхности-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 35 (окси-1,2-этандиильных) групп, где особый интерес представляет октоксинол-9 (Triton X-100, или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол); (октилфенокси)полиэтоксиэтанол (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 40 олеилового спиртов (известные как поверхностно-активные вещества Brj), такие как простой монолауриловый эфир триэтиленгликоля (Brj 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 45 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 октоксинола, такого как трет-октилфеноксиполиэтиоксиэтанол (Triton X-100). Другая подходящая комбинация включает лаурет 9 и сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана и/или октоксинол.

Предпочтительные количества поверхностно-активных веществ (% по массе)

- 5 представляют собой: сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана (такие как Tween 80) - от 0,01 до 1%, в частности приблизительно 0,1%; октил- или нонилфеноксиполиоксиэтанолы (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 10 приблизительно 0,5%.

Средний размер капли предпочтительных эмульсионных адьювантов 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.

- 15 Конкретные эмульсионные адьюванты "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

- 20 принимают вид 4,3% сквалена, 0,5% полисорбата 80 и 0,48% Span 85. Этот адьювант 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

- 25 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 30 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.

- 35 Эмульсия также может содержать 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид 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 40 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

- 45 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 ("ПлюроникTM 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% плюроника L121 и 0,2% полисорбата 80). Ее также можно использовать без Thr-MDP, как в 5 адьюванте "AF" [22] (5% сквалана, 1,25% плюроника L121 и 0,2% полисорбата 80). Предпочтительной является микрофлюидизация.

- Эмульсию, содержащую сквален, водный растворитель, гидрофильное неионное 10 поверхности-активное вещество простого эфира алкилполиоксиэтилена (например, простой полиоксиэтилен(12)цетостеариловый эфир) и гидрофобное неионное поверхности-активное вещество (например, сложный сорбитановый эфир или сложный 15 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 20 и/или сахароза) и/или алкилполигликозид. 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% 25 полоксамера 105 (полиол-плюроник) 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 30 поверхности-активного вещества. Как описано в ссылке 26, предпочтительные фосфолипидные компоненты представляют собой фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерин, 25 фосфатидная кислота, сфингомиelin и кардиолипин. Подходящими являются субмикронные размеры капель.

- Субмикронную эмульсию "масло-в-воде" неметаболируемого масла (такого как легкое минеральное масло) и по меньшей мере одного поверхности-активного вещества (такого как лецитин, Tween 80 или Span 80). Можно включать добавки, такие как сапонин 35 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, 40 холестерин) связаны в виде спиральных мицелл [28].

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

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

В некоторых вариантах осуществления эмульсию можно смешивать с антигеном без 45 подготовки, в момент доставки, и, таким образом, адьюvant и антиген можно хранить раздельно 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 адьювантом. 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 5 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 α , β , γ , δ , ϵ или ξ , но предпочтительны α -токоферолы. Токоферол может принимать 10 несколько форм, например, различных солей и/или изомеров. Соли включают органические соли, такие как сукцинат, ацетат, никотинат и т.д. Можно использовать D- α -токоферол и DL- α -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 15 в этой группе пациентов [30]. Он также обладает свойствами антиоксиданта, что может помочь стабилизировать эмульсии [31]. Предпочтительный α -токоферол представляет собой DL- α -токоферол, а предпочтительная соль этого токоферола представляет собой сукцинат. Выявлено, что соль янтарной кислоты *in vivo* взаимодействует со связанными с TNF лигандами.

20 С. Составы с сапонином [глава 22 ссылки 13]

Также в качестве адьювантов 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 адьювантов широко 25 исследовали сапонин из коры дерева *Quillaia saponaria* Molina. Сапонин также можно коммерческим получать из *Smilax ornata* (сассапариль), *Gypsophilla paniculata* (перекати поле) и *Saponaria officianalis* (мыльный корень). Адьюванты из составов с сапонином включают очищенные составы, такие как QS21, а также липидные составы, такие как ISCOM. QS21 продают как стимулон (StimulonTM).

30 Композиции сапонина очищали с использованием ВЭЖХ и ВЭЖХ-ОФ. С использованием эти 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],

35 Можно использовать комбинации сапонинов и холестеринов 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 40 несколько из QuilA, QHA и QHC. ISCOM дополнительны описаны в ссылках 33-35. Необязательно в ISCOMS можно не добавлять дополнительного детергента [36].

Обзор получения адьювантов на основе сапонина можно найти в ссылках 37 и 38.

D. Виросомы и вирусоподобные частицы

Также в качестве адьювантов по изобретению можно использовать виросомы и 45 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 НА или НА), вируса гепатита В (такие как коровьи белки или белки капсида), вируса гепатита Е, вируса кори, вируса Синдбис, ротавируса, вируса ящура, ретровируса, норовируса, вируса папилломы человека, ВИЧ, РНК-фагов, фага Qβ (такие как белки оболочки), фага GA, фага fr, фага AP205 и Ту (такие как белок ретротранспозона Ту p1). 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 детоксифицированные производные.

Нетоксические производные LPS включают монофосфориллипид А (MPL) и 3-О-деацилированный MPL (3dMPL). 3dMPL представляет собой смесь 3 де-О-ацилированного монофосфориллипида 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 монофосфориллипида А, такие как

аминоалкилглюкозаминидфосфатные 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 неметилированный 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'-дезокси-7-деазагуанозином. Адьюванное действие олигонуклеотидов CpG дополнительно

описано в ссылках 54-59.

Последовательность CpG может быть направлена на TLR9, такой как мотив GTCGTT или TTTCGTT [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 ProMuneTM (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 пиридинам. Например, он может содержать более одного 5 последовательного тимидинового нуклеотида (например, TTTT, как описано в ссылке 67), и/или он может содержать композицию нуклеотидов с >25% тимицина (например, >35%, >40%, >50%, >60%, >80% и т.д.). Например, он может содержать более одного последовательного цитозинового нуклеотида (например, CCCC, как описано в ссылке 10 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 неметилированный мотив CpG. Как правило, иммуностимулирующие олигонуклеотиды 15 содержат по меньшей мере 20 нуклеотидов. Они могут содержать менее 100 нуклеотидов.

Особенно подходящий адьювант на основе иммуностимулирующих олигонуклеотидов известен как IC-31TM [68]. Таким образом, адьювант, используемый по изобретению 20 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 (i) трипептида 25 Lys-Arg-Lys. Олигонуклеотид может представлять собой дезоксинуклеотид, содержащий 26-членную последовательность 5'-(IC)₁₃-3' (SEQ ID NO:427). Поликатионный полимер может представлять собой пептид, содержащий 11-членную аминокислотную последовательность KLKLLLLKLK (SEQ ID NO:426). Олигонуклеотид и полимер могут 30 формировать комплексы, например, как описано в ссылках 69 и 70.

В качестве адьювантов 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 ("CT") или коклюша ("PT"). Использование детоксицированных 30 рибозилирующих АДФ токсинов в качестве слизистых адьювантов описано в ссылке 71, а в качестве парентеральных адьювантов - в ссылке 72. Токсин или токсойд, как правило, находится в форме голотоксина, содержащего субъединицы А и В. В некоторых 35 вариантах осуществления субъединица А содержит детоксицирующую мутацию; субъединица В часто не мутирована. В некоторых вариантах осуществления адьювант представляет собой детоксицированный мутант LT, такой как LT-K63, LT-R72 и LT-G192. Использование рибозилирующих АДФ токсинов и их детоксицированных 40 производных, в частности, LT-K63 и LT-R72, в качестве адьювантов можно найти в ссылках 73-80. Подходящий мутант СТ представляет собой или СТ-E29Н [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 объеме включенной в настоящий документ в качестве ссылки.

40 F. Иммуномодуляторы человека

Иммуномодуляторы человека, подходящие для использования в качестве адьювантов 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 адьювантов по изобретению можно использовать биоадгезивные и мукоадгезивные средства. Подходящие биоадгезивные средства включают микросфера

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

5 **Н. Микрочастицы**

Также в качестве адьювантов 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(α-гидроксикислота), полигидроксимасляная кислота, сложный полиортогоэфир, 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 адьювантов, описаны в ссылках 87-89.

J. Составы простых эфиров полиоксиэтилена и сложных эфиров полиоксиэтилена

20 Адьюванты, 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.

K. Фосфазены

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

L. Мурамилпептиды

35 Примеры мурамилпептидов, подходящих для использования в качестве адьювантов по изобретению, включают N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетилнормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (нор-MDP) и N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминал-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси) этиламин МТР-РЕ).

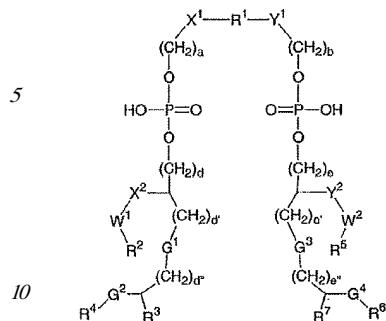
40 **М. Имидазохинолоновые соединения.**

Примеры имидазохинолоновых соединений, подходящих для использования в качестве адьювантов 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.

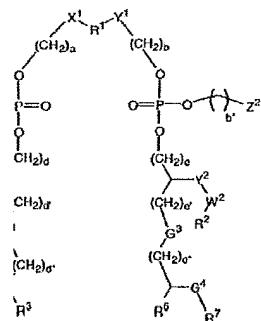
N. Замещенные карбамиды

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

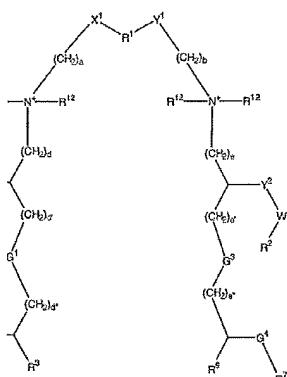
I



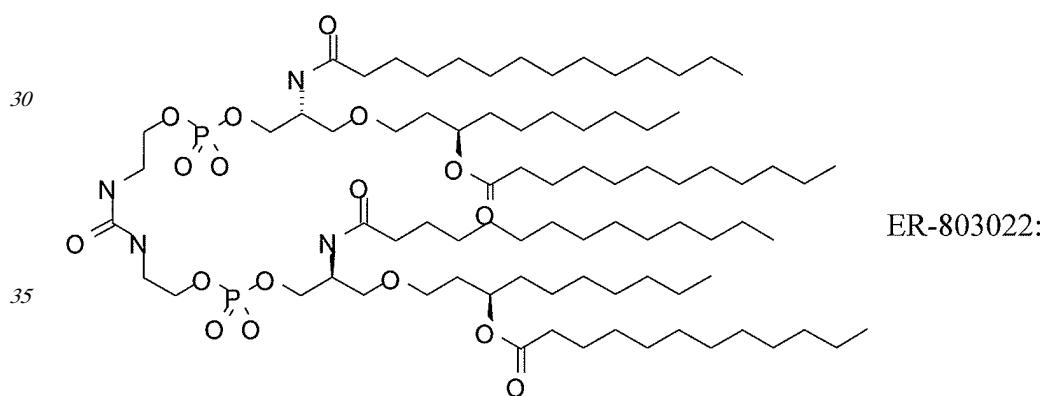
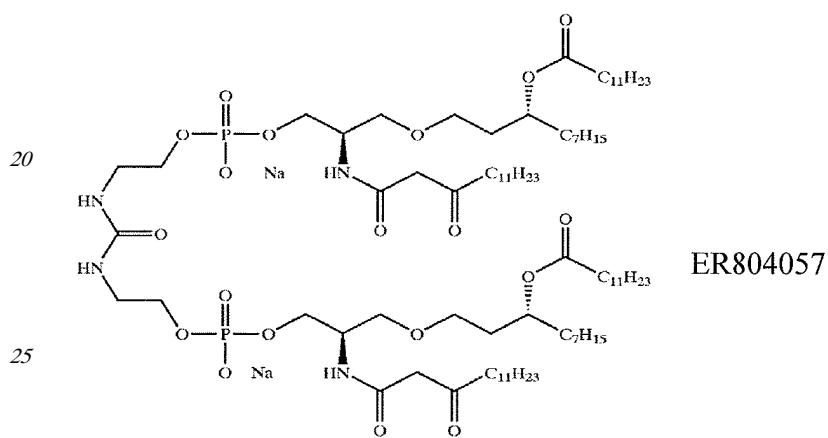
II



III



15 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":



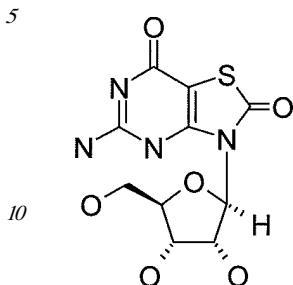
О. Дополнительные адьюванты

40 Дополнительные адьюванты, которые можно использовать по изобретению, включают:

- Фосфатное производное аминоалкилглюказамина, 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 мононуклеарных клеток периферической крови человек для продукции цитокинов, таких как TNF- α .

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



и его пролекарственные средства; (б) ANA975; (с) АНК-025-1; (д) ANA380; (е) соединения, описываемые в ссылках 108-110, локсорибин (7-аллил-8-оксогуанозин) [111].

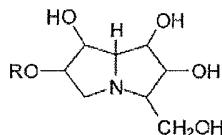
15 - Соединения, описываемые в ссылке 112, включая: ацилпiperазиновые соединения, индолдионовые соединения, тетрагидраизохинолиновые (THIQ) соединения, бензоциклоидионовые соединения, аминоазавиниловые соединения, аминобензимидазолхинолиноные (ABIQ) соединения [113,114], гидрафталамидные соединения, бензофеноноевые соединения, изоксазоловые соединения, стероловые соединения, хиназилиноевые соединения, пирроловые соединения [115], 20 антрахиноновые соединения, хиноксалиновые соединения, триазиновые соединения, пиразалопиrimидиновые соединения и бензазоловые соединения [116].

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

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

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

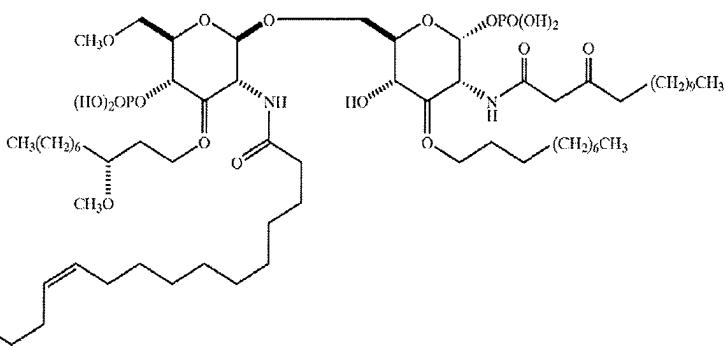
30 - Полигидроксилированное пирролизидиновое соединение [122], такое как соединение формулы:



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- α -D-глюкопираноза, 40 3-эпи-казуарин, 7-эпи-казуарин, 3,7-ди-эпи-казуарин и т.д.

40 - Лиганд CD1d, такой как α -гликозилцерамид [123-130] (например, α -галактозилцерамид), содержащий фитосфингозин α -гликозилцерамиды, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -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.



5

10

Комбинации адьювантов

Изобретение также может содержать комбинации одного или нескольких из адьювантов, указанных выше. Например, по изобретению можно использовать следующие композиции адьювантов: (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 80TM, 5% плюроник-блок-полимер L121 и thr-MDP, микрофлюидизированные в субмикронную эмульсию или перемешанные на центрифуге типа "вортекс" с получением эмульсии с большим размером частиц. (7) адьювантную систему RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem), содержащую 2% сквалена, 0,2% Tween 80 и один или несколько компонентов стенки бактериальной клетки из группы, состоящей из монофосфориллипида А (MPL), димиколата трегалозы (TDM) и каркаса клеточной стенки (CWS), предпочтительно, MPL+CWS (DetoxTM); 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 адьюванта с гидроксидом алюминия и/или фосфатом алюминия, и антигенов, которые, как правило, адсорбируются на эти соли. Другим характерным адьювантом является фосфат кальция. Другие комбинации адьювантов включают комбинации адьювантов Th1 и Th2, таких как СрG 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⁺-клетки можно дополнительно подразделять на две функционально различающихся субпопуляции: с фенотипом TH1 и с фенотипом TH2, которые отличаются по их цитокинам и 5 эфекторной функции.

Активированные TH1 клетки усиливают клеточный иммунитет (включая увеличение 10 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- γ и TNF- β . Иммунный ответ TH1 может приводить к локальным воспалительным реакциям посредством активированных 15 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, 20 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 25 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- γ и TNF- β), увеличение количества 30 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 адьюванта TH1. Как правило, адьювант TH1 вызывает увеличенные уровни продукции IgG2a относительно 35 иммунизации антигеном без адьюванта. Адьюванты TH1, подходящие для использования по изобретению, могут включать, например, составы сапонина, виросомы и вирусоподобные частицы, нетоксические производные липополисахарида (LPS) энтеробактерий, иммуностимулирующие олигонуклеотиды. Характерными адьювантами 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 40 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 адьюванта TH2. Адьювант 45 TH2, как правило, вызывает увеличенные уровни продукции IgG1 относительно иммунизации антигеном без адьюванта. Адьюванты TH2, подходящие для использования по изобретению, включают, например, содержащие неорганические вещества композиции, масляные эмульсии и рибозилирующие АДФ токсины и их детоксифицированные производные. Характерными адьювантами TH2 для применения по изобретению являются содержащие неорганические вещества композиции, такие как соли алюминия.

В некоторых вариантах осуществления изобретение включает композицию,

содержащую комбинацию адьюванта ТН1 и адьюванта ТН2. Часто такая композиция вызывает усиленный ответ ТН1 и усиленный ответ ТН2, т.е., увеличивает продукцию IgG1 и IgG2a относительно иммунизации без адьюванта. Как правило, композиция, содержащая комбинацию адьювантов ТН1 и ТН2, вызывает увеличенный иммунный

5 ответ ТН1 и/или увеличенный иммунный ответ ТН2 относительно иммунизации одним адьювантом (т.е., относительно иммунизации только адьювантом ТН1 или иммунизации только адьювантом 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 инъецируемого препарата, в жидких растворах или сусpenзиях. 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 адьювантами (особенно в тех, которые содержат неорганический адьювант, 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 адьювантов 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 адьювант) 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" 40 предписан 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.

45 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 5 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 C-конце и/или 10 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.

15 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 20 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 25 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 30 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, 35 флуоресцентную молекулу или фермент. Альтернативно, антиген GAS можно сливать с доменом, облегчающим его исходную очистку, таким как гистидиновый домен или домен GST.

40 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

45 Термин "содержащий" включает "включающий", а также "составляющий" 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 меченными Су3 антителами против IgG человека и меченными Су5 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-Су3. Д, 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; R и R', 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 (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 40 людей. 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>) 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 реакционноспособности (слева) к меньшей реакционноспособности (справа). Можно различить две основные группы сывороток с группой с высокой реакционноспособностью, в основном включающей сыворотки здоровых доноров (А слева на фигуре 4), и второй группой,

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

Фигура 5. Применение кластерного анализа К-средних с классификацией антигенов GAS, присутствующих на чипе в 10 кластерах (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, реакционноспособность которых обеспечивает установление различий 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 распознавания с различными группами антигенов с использованием одномерного иерархического кластерного анализа, обеспечивающего определение двух кластеров сывороток HS1 (фиолетовая рамка) и HS2 (синяя рамка). Количество сывороток, полученных у здоровых контролей, и сывороток, полученных у пациентов, присутствующие или отсутствующие в каждом из двух кластеров, указаны на фигуре 6В. 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 различия между двумя группами сывороток с использованием теста этого типа определяли по специфичности и чувствительности (фигура 6С). Для этой конкретной 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 (B), КА9 (C), КА10 (D), КА5+M9 (E), GAS5+GAS5F+GAS25+GAS40 (F), GAS5+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

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 зависимая от антигенов GAS 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 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 реакционноспособность, 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 секрецируемый белок), GAS25 (предшественник стрептолизина O), GAS40 (предполагаемый поверхностный предотвращающий белок), M1, GAS179 (предполагаемая эстераза), GAS97 (гомолог предшественника иммуногенного секрецируемого белка), GAS193 (предшественник неиммуногенного секрецируемого белка). Группа 2 включала 5 различных M-белков (M12, M23, M2, M3 и M9), GAS57 (предполагаемая протеинкиназа клеточной оболочки), GAS380 (гипотетический белок) и SpeI.

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

25 Затем авторы применяли кластерный анализ K-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 сведен с алгоритмом максимизации ожидаемого правдоподобия для смеси гауссиан в том, что они оба пытаются отыскать центры природных кластеров в данных.

40 Как показано на фигуре 5, четыре из идентифицированных кластеров антигенов (номера KA 1, KA 5, KA 9, KA 10) содержали антигены с более высокими значениями 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 KA 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.

5 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. Количество сывороток, полученных у здоровых индивидуумов, и сывороток, полученных у пациентов, присутствующие или отсутствующие в каждом 10 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 15 реакционноспособностью, фиолетовый, кластер HS1. Возможность установить различия между двумя группами сывороток с использованием теста определяли по специфичности и чувствительности. На фигуре 6С представлен идеальный теоретический пример 20 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+ 25 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-І.

Как представлено, кластер, обеспечивающий наибольшие значения специфичности и чувствительности, включал антигены кластера KA1 (GAS5, GAS40, GAS5F, GAS57, 25 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 30 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
- 35 [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.
- 40 [7] Cumber *et al.*, (1992) *J. Immunology* 149B, 120-26.
- [8] Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332, 323-27.
- [9] Verhoeven *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).
- ¹⁰ [19] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [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.
- ¹⁵ [24] US-2007/0191314.
- [25] Suli *et al.* (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.
- [26] WO95/11700.
- [27] US patent 6,080,725.
- [28] WO2005/097181.
- ²⁰ [29] WO2006/113373.
- [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.
- ²⁵ [33] WO96/33739.
- [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).
- ¹⁰ [19] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [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.
- ¹⁵ [24] US-2007/0191314.
- [25] Suli *et al.* (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.
- [26] WO95/11700.
- [27] US patent 6,080,725.
- [28] WO2005/097181.
- ²⁰ [29] WO2006/113373.
- [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.
- ²⁵ [33] WO96/33739.
- [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.

5 [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.

10 [107] WO2004/064759.

[108] US 6,924,271.

[109] US2005/0070556.

[110] US 5,658,731.

[111] US patent 5,011,828.

15 [112] WO2004/87153.

[113] US 6,605,617.

[114] WO02/18383.

[115] WO2004/018455.

[116] WO03/082272.

20 [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.

25 [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

30 [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.

35 [132] WO99/11241.

[133] WO94/00153.

[134] WO98/57659.

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

[136] WO2006/110603.

40 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.

45 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

5 последовательности

SEQ ID NO: 1 (GAS5),

SEQ ID NO: 2 (GAS5F),

SEQ ID NO: 3 (GAS25),

SEQ ID NO: 4 (GAS40),

10 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

15 любых антител, присутствующих в биологическом образце, по меньшей мере с одним антигеном GAS или с его функциональными эквивалентами; и

б) сравнения реакционноспособности антител в биологическом образце, взятом у пациента, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS с

реакционноспособностью антител в контрольном биологическом образце, взятом у

20 здорового индивидуума, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS,

где меньшая реакционноспособность 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,

25 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

30 последовательности

SEQ ID NO: 1 (GAS5),

SEQ ID NO: 2 (GAS5F),

SEQ ID NO: 3 (GAS25),

SEQ ID NO: 4 (GAS40),

35 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

40 любых антител, присутствующих в биологическом образце, по меньшей мере с одним антигеном GAS или с его функциональными эквивалентами; и

б) сравнения реакционноспособности антител в биологическом образце, взятом у пациента, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS с

реакционноспособностью антител в контрольном биологическом образце, взятом у

45 здорового индивидуума, по меньшей мере в отношении одного антигена GAS,

где меньшая реакционноспособность 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.

15 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.

20 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

25 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

30 сердца, связанного с инфекцией GAS.

35

40

45

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 15Gly Ala Ala Thr Thr Val Gly Ala Glu Asp Leu Ser Thr Lys Ile Ala
20 25 30Lys Gln Asp Ser Ile Ile Ser Asn Leu Thr Thr Glu Gln Lys Ala Ala
35 40 45Gln Asn Gln Val Ser Ala Leu Gln Ala Gln Val Ser Ser Leu Gln Ser
50 55 60Glu Gln Asp Lys Leu Thr Ala Arg Asn Thr Glu Leu Glu Ala Leu Ser
65 70 75 80Lys Arg Phe Glu Gln Glu Ile Lys Ala Leu Thr Ser Gln Ile Val Ala
85 90 95Arg Asn Glu Lys Leu Lys Asn Gln Ala Arg Ser Ala Tyr Lys Asn Asn
100 105 110Glu Thr Ser Gly Tyr Ile Asn Ala Leu Leu Asn Ser Lys Ser Ile Ser
115 120 125Asp Val Val Asn Arg Leu Val Ala Ile Asn Arg Ala Val Ser Ala Asn
130 135 140Ala Lys Leu Leu Glu Gln Gln Lys Ala Asp Lys Val Ser Leu Glu Glu
145 150 155 160Lys Gln Ala Ala Asn Gln Thr Ala Ile Asn Thr Ile Ala Ala Asn Met
165 170 175Ala Met Ala Glu Glu Asn Gln Asn Thr Leu Arg Thr Gln Gln Ala Asn
180 185 190Leu Val Ala Ala Thr Ala Asn Leu Ala Leu Gln Leu Ala Ser Ala Thr
195 200 205Glu 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			
290	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 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			
370	375	380	
Gly Trp Phe Asn Pro Thr Gly Val Thr Phe Ile Tyr Pro His			
385	390	395	
<210> 2			
<211> 175			
<212> BEJIOK			
<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 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> BEJIOK
<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 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 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 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	80
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	160
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	240
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	320
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> EEJIOK
 <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 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 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
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
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 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
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 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
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 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
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
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	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	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 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> БЕЛЮК
 <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 Gln Asn 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> БЕЛОК
 <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 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 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 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

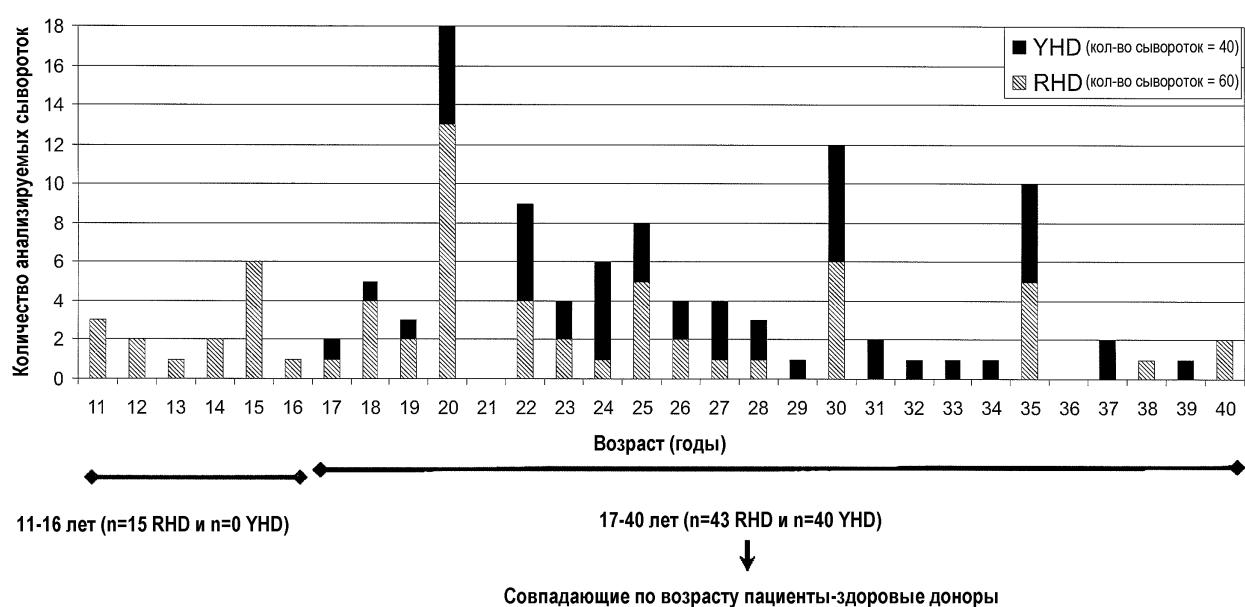
Lys Ala Gly Val Ser Val Val Ala Ala Gly Asn Glu Arg Val Tyr
 340 345 350

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 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

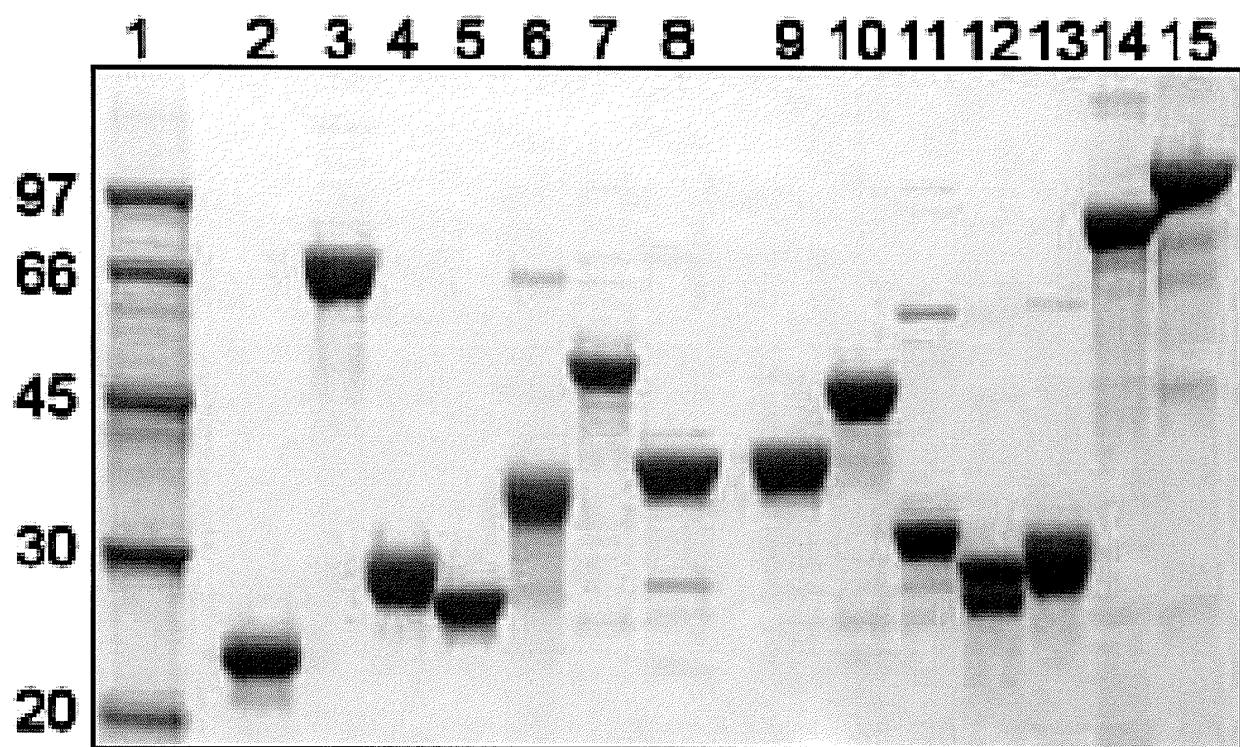
690	695	700
Asp Pro Gln Lys Gly Arg Phe Thr Leu Thr Ser His Ser Leu Lys Thr		
705	710	715
720		
Tyr Gln Gly Gly Glu Val Thr Val Pro Ala Asn Gly Lys Val Thr Val		
725	730	735
Arg Val Thr Met Asp Val Ser Gln Phe Thr Lys Glu Leu Thr Lys Gln		
740	745	750
Met Pro Asn Gly Tyr Tyr Leu Glu Gly Phe Val Arg Phe 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> БЕЛЮК		
<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

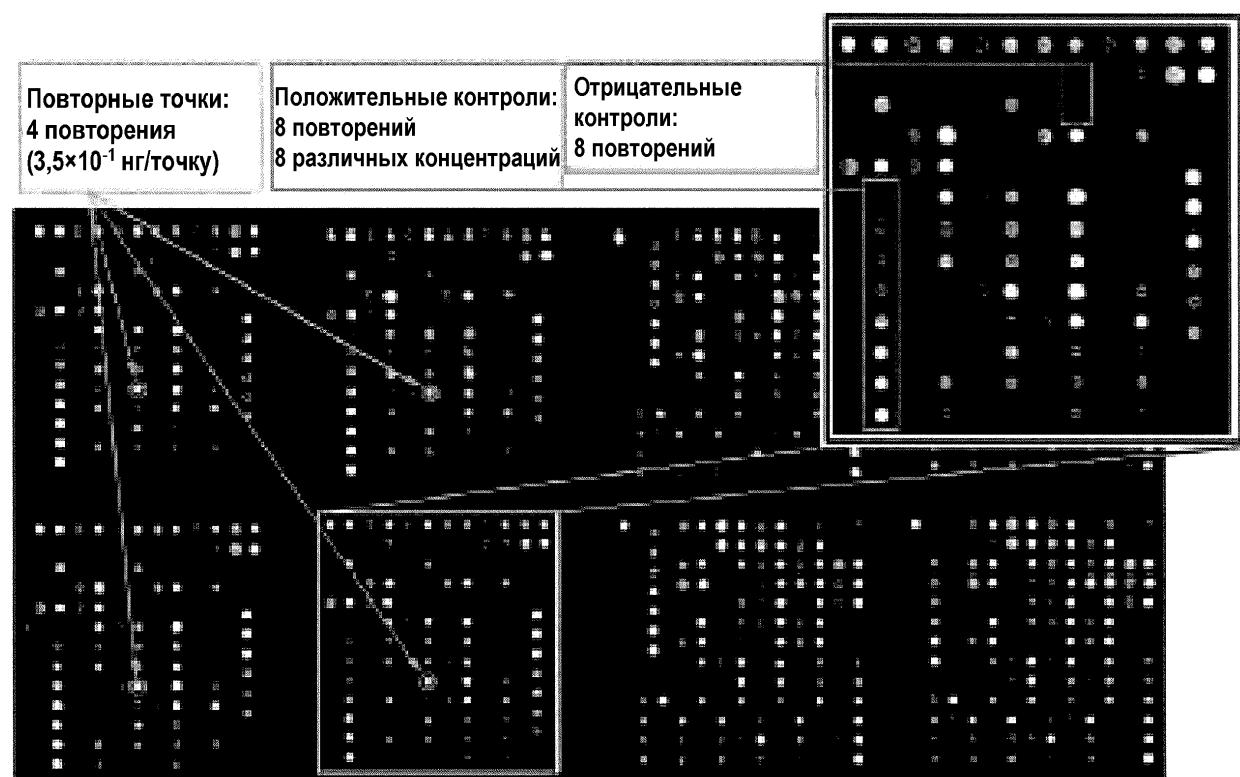
Распределение по возрасту



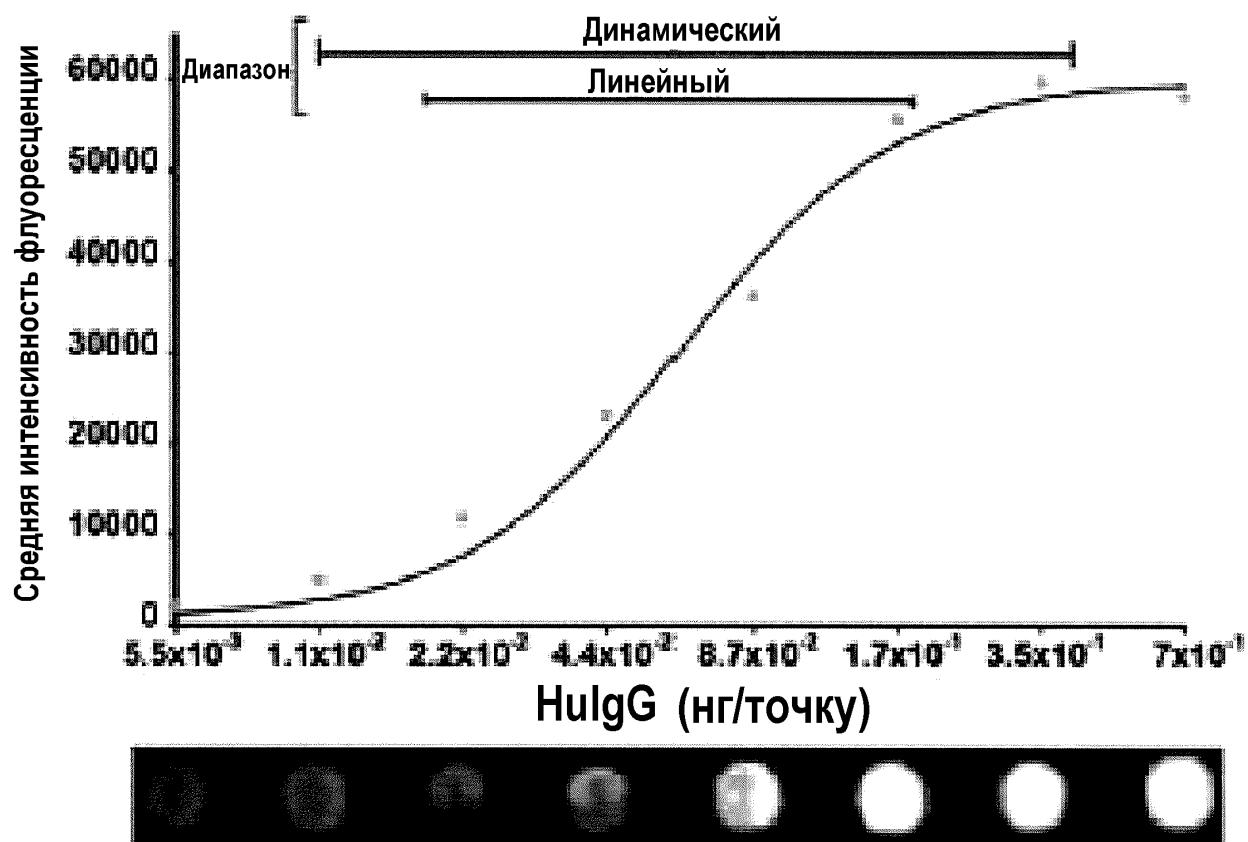
ФИГ.1



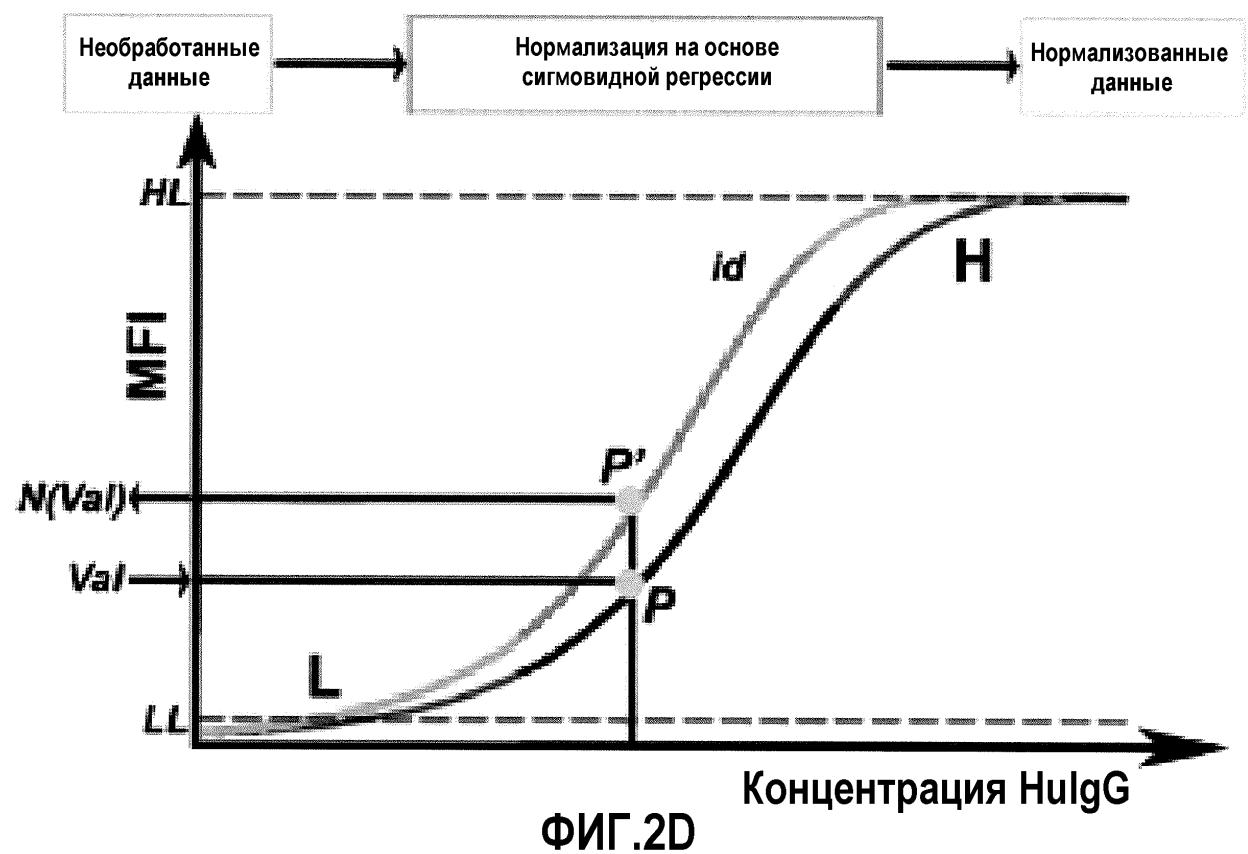
ФИГ.2А



ФИГ.2В

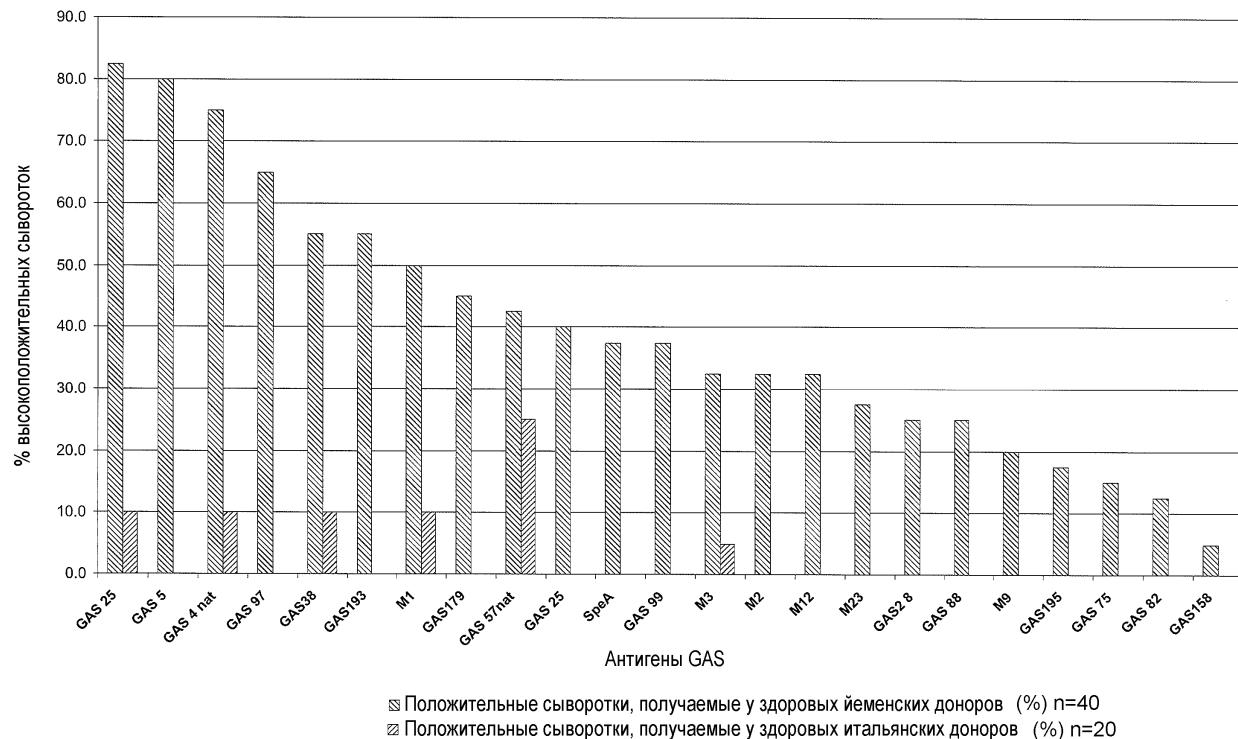


ФИГ.2С

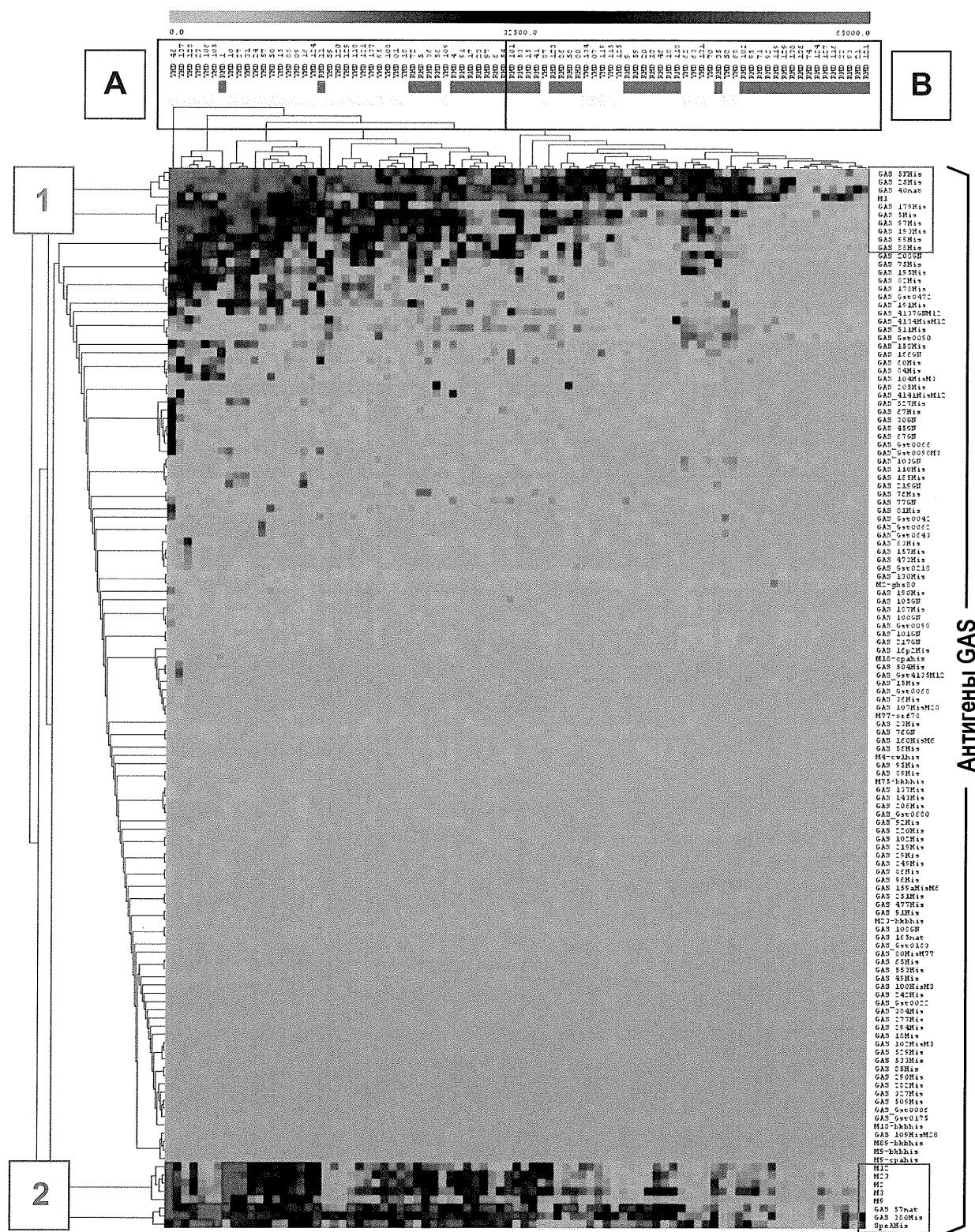


ФИГ.2Д

MFI>30000



ФИГ.3



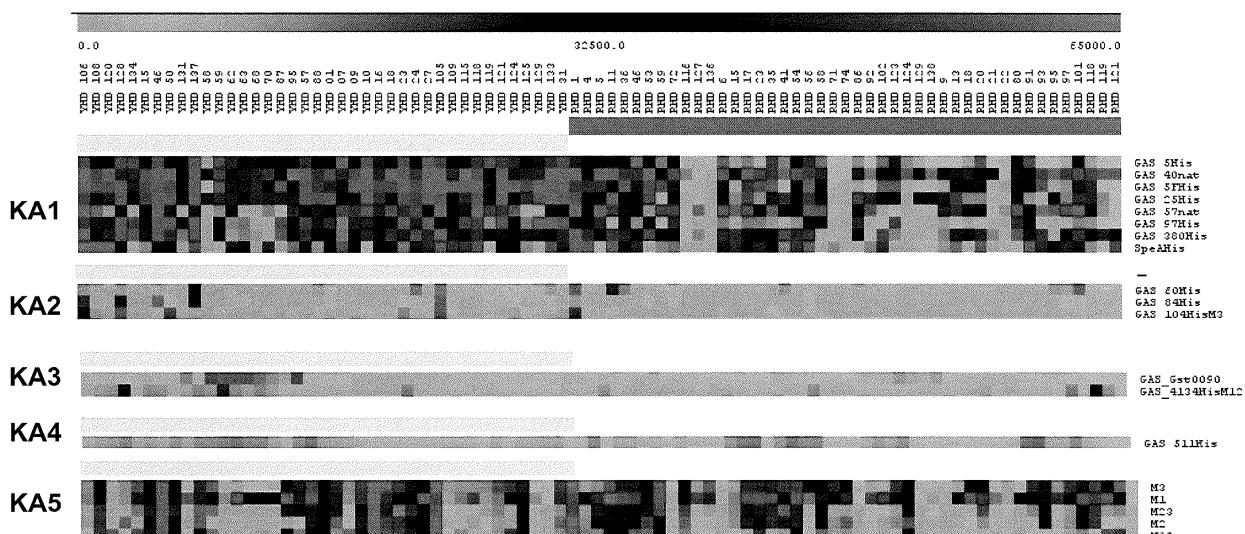


GAS 5F предполагаемый секретируемый белок (деление клеток и устойчивость к антибиотикам)
GAS 25 предшественник стрептолизина О
GAS 40 предполагаемый поверхностный предотвращающий белок
M1
GAS 179 предполагаемая эстераза
GAS 97 гомолог предшественника иммуногенного секретируемого белка
GAS 193 предшественник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

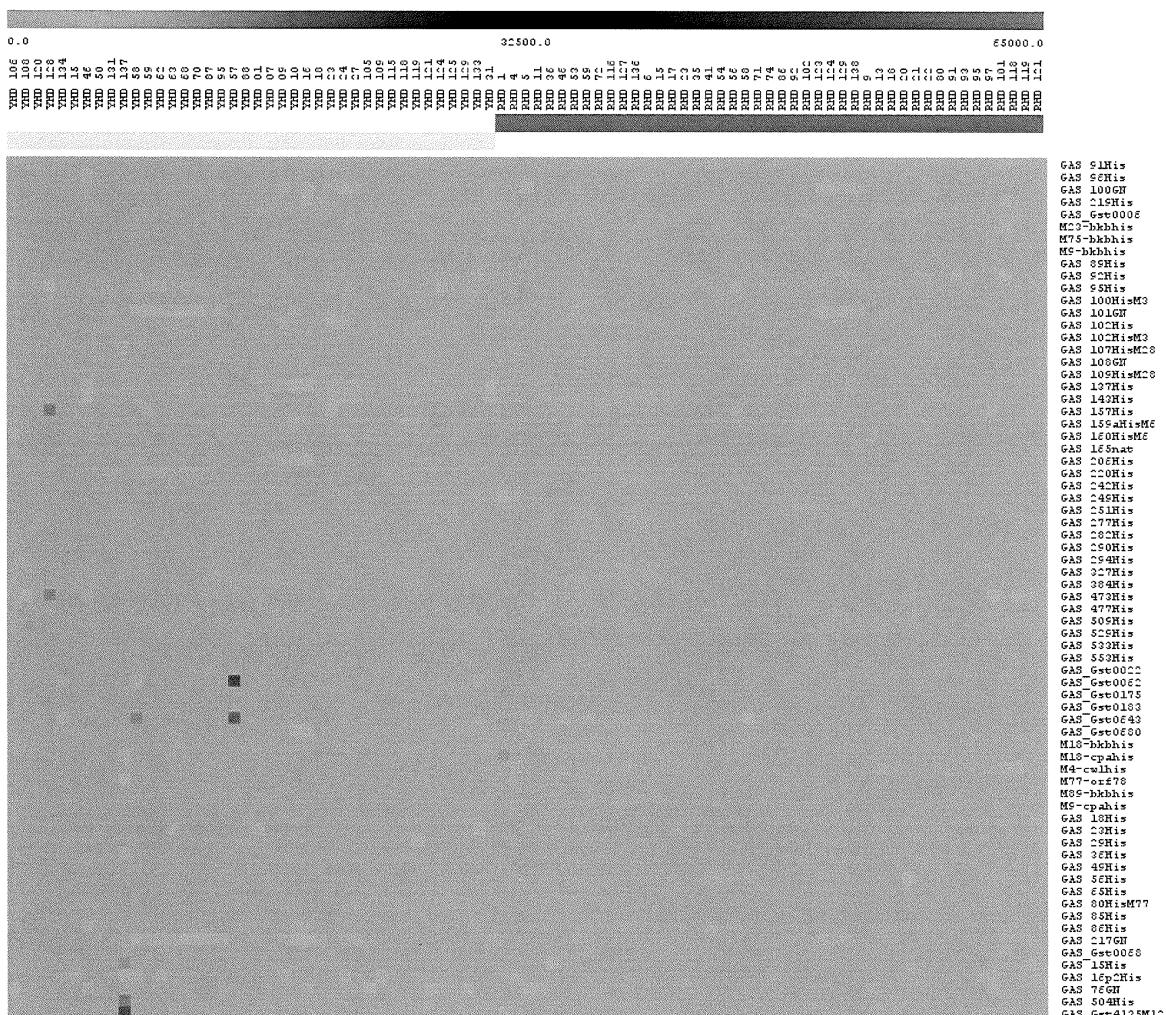


5 различных M-белков (M12; M23; M2; M3; M9)
GAS 97 предполагаемая протеинкиназа клеточной оболочки
GAS 380 гипотетический белок
SpeA

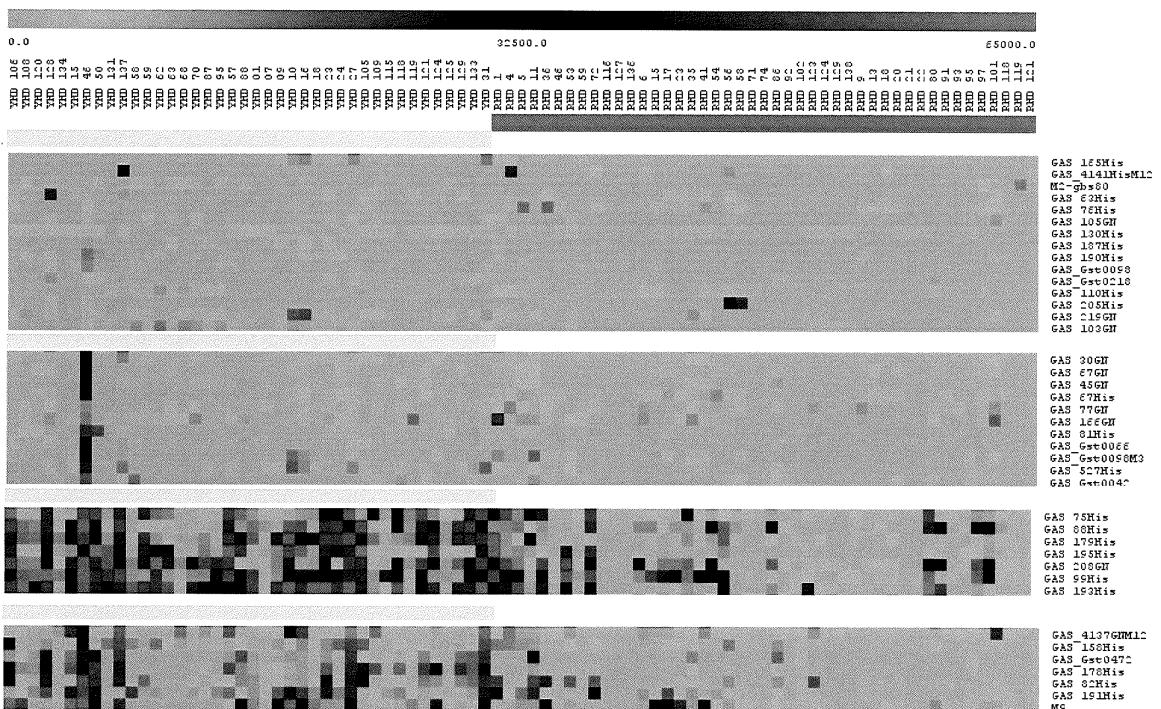
ФИГ.4 (продолжение)



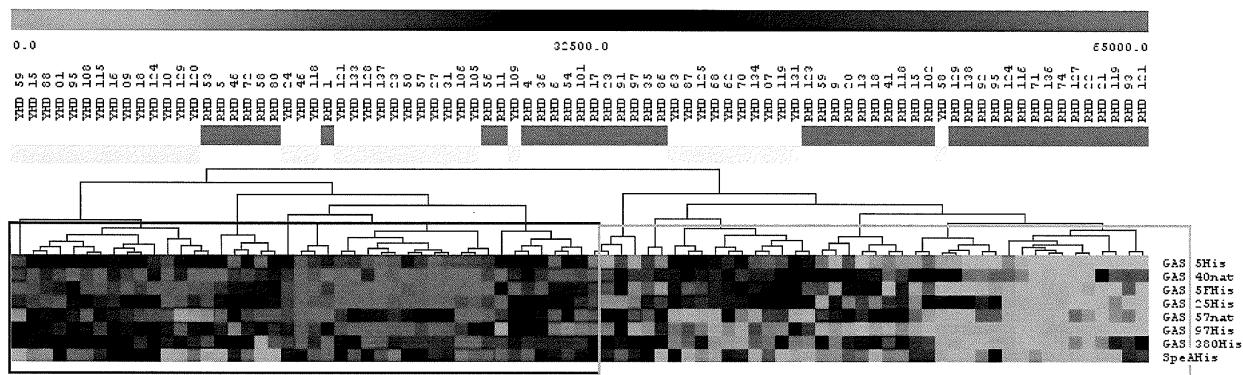
ФИГ.5



ФИГ.5 (продолжение)



ФИГ.5 (продолжение)



ФИГ.6А

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

ФИГ.6Б

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

ФИГ.6С

A КА 1

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

B КА 5

Кластер	Реальные условия		Тест
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	
HS1	43	35	Специфичность
HS2	0	5	Чувствительность

C КА 9

Кластер	Реальные условия		Тест
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	
HS1	43	33	Специфичность
HS2	0	7	Чувствительность

D КА 10

Кластер	Реальные условия		Тест
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	
HS1	43	39	Специфичность
HS2	0	1	Чувствительность

E КА 5 + М9

Кластер	Реальные условия		Тест
	Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	
HS1	43	35	Специфичность
HS2	0	5	Чувствительность

ФИГ.7

F	GAS5 GAS5 GAS25 GAS40	Кластер	Реальные условия		Тест
			Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	
HS1	35	4			0.90
HS2	10	36			0.78

G	GAS5 GAS5F GAS25 GAS40 GAS57	Кластер	Реальные условия		Тест
			Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	
HS1	38	7			0.82
HS2	8	32			0.83

H	GAS5 GAS25 GAS40 GAS57	Кластер	Реальные условия		Тест
			Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	
HS1	18	5			0.88
HS2	25	35			0.42

I	GAS5F GAS25 GAS40 GAS57	Кластер	Реальные условия		Тест
			Пациенты с RHD	Здоровые индивидуумы	
HS1	34	4			0.90
HS2	9	36			0.79

ФИГ.7 (продолжение)