

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044128**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.07.26**

**(51)** Int. Cl. **G01N 33/53** (2006.01)  
**C07K 14/195** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201992245**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.04.26**

---

**(54) АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 731324; 736448

**(32)** 2017.04.26; 2017.10.16

**(33)** NZ

**(43)** 2020.03.10

**(86)** PCT/NZ2018/050057

**(87)** WO 2018/199775 2018.11.01

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ОКЛЕНД ЮНИСЕРВИСИЗ  
ЛИМИТЕД (NZ)**

**(72)** Изобретатель:  
**Морленд Николь Дж, Янг Пол Гэри,  
Профт Томас (NZ)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** WO-A1-2010100627

D2 Chang, A. et al., "Functional analysis of Streptococcus pyogenes nuclease A (SpnA), a novel group A streptococcal virulence factor", Molecular Microbiology, 2011, 79(6), p. 1629-1642, p. 1639, col. 2, last para; p. 1639, col. 2, last para, Figure 1, p. 1630, col. 1 para 4; p. 1638, col. 2, para 1; p. 1637, col. 1, para 3; Table 1; p. 1639, col. 2, para 3, p. 1638, col. 2, para 1

WO-A2-2002079475

WO-A2-2006042027

WO-A2-2002083859

Steer A., et al., "Streptococcal Serology, Secrets for the Specialist", 2015, The Pediatric Infectious Disease Journal, 34(11), p. 1250-1252, p. 1250, para 1

Blyth C. et al., "Anti-streptococcal antibodies in the diagnosis of acute and poststreptococcal disease: streptokinase versus streptolysin O and deoxyribonuclease B", Pathology, 2006, 38(2), p. 152-156, Materials and Methods, para 1-2

---

**(57)** Изобретение в целом относится к композициям и способам лечения, обнаружения и оказания помощи при диагностике инфекции Streptococcus pyogenes, ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита (PSGN), а также к композициям и способам оценки склонности к развитию ревматизма или PSGN у субъектов, нуждающихся в этом. Также предложены рекомбинантные полипептиды, включая рекомбинантные полипептиды SpnA Streptococcus pyogenes, и комбинации, содержащие такие полипептиды, для применения в указанных способах.

---

**B1**

**044128**

**044128 B1**

### Область техники

Изобретение в целом относится к композициям и способам лечения, обнаружения и оказания помощи при диагностике инфекции *Streptococcus pyogenes*, ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита (PSGN), а также к композициям и способам оценки склонности к развитию ревматизма или PSGN.

### Уровень техники

Стрептококки группы А (GAS, *Streptococcus pyogenes*) вызывают ряд заболеваний различной степени тяжести - от легких кожных инфекций и фарингита до тяжелых инвазивных заболеваний и постинфекционных иммунных осложнений, например, ревматизм или постстрептококковый гломерулонефрит (PSGN), или ассоциированы с ними. Острый ревматизм и ассоциированная с ним ревматическая болезнь сердца являются основной причиной приобретенных пороков сердца в развивающихся странах.

Стрептококковая серология имеет решающее значение для диагностики постинфекционных иммунных осложнений, поскольку эти осложнения возникают через несколько недель после GAS-инфекции, когда диагностика бактерий-возбудителей обычно невозможна. Как правило, современная клиническая практика включает измерение титров антител к двум антигенам - стрептолизину-О (SLO) и дезоксирибонуклеазе В (ДНКазе В). Серологические тесты называются анти-стрептолизин-О (ASO) и анти-дезоксирибонуклеазе-В (ADB), соответственно. Титры ASO обычно измеряют с помощью нефелометрического или турбидиметрического анализа, а значения обычно указывают в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл). Тесты ADB менее стандартизированы, поскольку, в отличие от ASO, для ДНКазы В отсутствуют эталонные сыворотки. Титры ADB обычно измеряют с использованием анализа ингибирования фермента, где ингибирование активности ДНКазы В сыворотками обнаруживают с использованием цветного красителя.

Интересно отметить, что отмечается значительная вариабельность иммунокинетики ответа антител в тестах ASO и ADB, при этом у большинства детей, страдающих GAS-фарингитом, наблюдается повышение титров ASO и ADB (по сравнению с уровнями до инфекции) в течение более одного года после инфекции [1]. Следовательно, существует значительный риск ложноположительного диагноза.

Сохраняется необходимость в более эффективных способах выявления субъектов с текущей или недавно перенесенной GAS-инфекцией, и субъектов со склонностью к развитию ревматизма или PSGN, а также в способах более эффективного обнаружения и диагностики ревматизма или PSGN.

Задачей изобретения является решение вышеуказанных проблем или создание способов и композиций для выявления и оказания помощи при диагностике ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита или для оценки склонности к развитию ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита, и/или по меньшей мере предоставление общественности возможности полезного выбора.

Все ссылки, включая патенты или патентные заявки, процитированные в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылок. Ни одна ссылка не представляет собой известный уровень техники. Обсуждение ссылок подразумевает, что их авторы доказывают, а заявители оставляют за собой право оспаривать точность и актуальность цитируемых документов. Следует четко понимать, что, хотя в настоящем документе упоминается ряд публикаций известного уровня техники, ссылки на них не является признанием того, что какой-либо из этих документов является частью общеизвестных знаний в данной области техники в Новой Зеландии или в любой другой стране.

### Сущность изобретения

Эти и другие цели достигаются в соответствии с одним или более аспектами настоящего изобретения.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения недавнего воздействия *Streptococcus pyogenes* на субъекта, включающему

получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит антитела, специфичные по отношению к одному или более антигенам *Streptococcus pyogenes*;

приведение указанного биологического образца в контакт с двумя или более популяциями антигена *Streptococcus pyogenes*, причем каждая из указанных двух или более популяций антигена *Streptococcus pyogenes* способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием двух или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

обнаружение указанных комплексов, причем увеличение обнаружения одного или более комплексов выше порогового значения указывает на недавнее воздействие *Streptococcus pyogenes* на субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения или диагностики ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита (PSGN), включая острый постстрептококковый гломерулонефрит (APSGN) у субъекта, или повышенной вероятности развития ревматизма или PSGN у субъекта, причем указанный способ включает:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам *Streptococcus pyogenes*;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с двумя или более популяциями антигена *Streptococcus pyogenes*, причем каждая из указанных двух или более популяций антигена *Streptococcus pyogenes*,

cus ruogenes способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием двух или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем увеличение обнаружения одного или более комплексов выше порогового значения указывает на повышенную вероятность развития ревматизма или APSGN или на недавнее воздействие Streptococcus ruogenes на субъекта в качестве одного из критериев наличия ревматизма или PSGN у субъекта;

iv) оценку одного или более из диагностических критериев ревматизма или PSGN;

v) причем увеличение обнаружения одного или более из указанных комплексов выше порогового значения в сочетании с одним или более из других диагностических критериев ревматизма или APSGN указывает на ревматизм или PSGN у субъекта.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения наличия инфекции Streptococcus ruogenes у субъекта, включающему:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам Streptococcus ruogenes;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с двумя или более популяциями антигена Streptococcus ruogenes, причем каждая из указанных двух или более популяций антигена Streptococcus ruogenes связывает антиген-специфичные антитела в биологическом образце с образованием двух или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем увеличение обнаружения одного или более из комплексов указывает на присутствие Streptococcus ruogenes у субъекта или недавнее воздействие Streptococcus ruogenes на субъекта.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения антиген-специфичных антител против Streptococcus ruogenes в биологическом образце, причем указанные антиген-специфичные антитела против Streptococcus ruogenes специфично связываются с антигеном Streptococcus ruogenes, причем указанный способ включает:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам Streptococcus ruogenes;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с двумя или более популяциями антигена Streptococcus ruogenes, причем каждая из указанных двух или более популяций антигена Streptococcus ruogenes связывает антиген-специфичные антитела в биологическом образце с образованием двух или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем увеличение обнаружения одного или более из комплексов указывает на то, что биологический образец содержит антитела, специфичные по отношению к антигену Streptococcus ruogenes.

В различных вариантах реализации увеличение обнаружения одного или более из комплексов представляет собой обнаружение присутствия одного или более из комплексов.

Соответственно, в одном варианте реализации способ обнаружения или диагностики ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита (PSGN), включая острый постстрептококковый гломерулонефрит (APSGN) у субъекта, или повышенной вероятности развития ревматизма или PSGN у субъекта, включает:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам Streptococcus ruogenes;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с двумя или более популяциями антигена Streptococcus ruogenes, причем каждая из указанных двух или более популяций антигена Streptococcus ruogenes способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием двух или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем присутствие одного или более из комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело" указывает на повышенную вероятность развития ревматизма или APSGN или на недавнее воздействие Streptococcus ruogenes на субъекта в качестве одного из критериев наличия ревматизма или PSGN у субъекта;

iv) оценку одного или более из диагностических критериев ревматизма или PSGN;

v) причем присутствие одного или более из указанных комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело" в сочетании с одним или более из других диагностических критериев ревматизма или APSGN указывает на ревматизм или PSGN у субъекта.

В еще одном варианте реализации способ обнаружения наличия инфекции *Streptococcus pyogenes* у субъекта включает:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам *Streptococcus pyogenes*;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с двумя или более популяциями антигена *Streptococcus pyogenes*, причем каждая из указанных двух или более популяций антигена *Streptococcus pyogenes* связывает антиген-специфичные антитела в биологическом образце с образованием двух или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем присутствие одного или более из комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело" указывает на присутствие *Streptococcus pyogenes* у субъекта или недавнее воздействие *Streptococcus pyogenes* на субъекта.

В еще одном варианте реализации способ обнаружения антиген-специфичных антител против *Streptococcus pyogenes* в биологическом образце, где указанные антиген-специфичные антитела против *Streptococcus pyogenes* специфично связываются с антигеном *Streptococcus pyogenes*, включает:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам *Streptococcus pyogenes*;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с двумя или более популяциями антигена *Streptococcus pyogenes*, причем каждая из указанных двух или более популяций антигена *Streptococcus pyogenes* связывает антиген-специфичные антитела в биологическом образце с образованием двух или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем присутствие одного или более из комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело" указывает на то, что биологический образец содержит антитела, специфичные по отношению к антигену *Streptococcus pyogenes*.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего ревматизмом или PSGN, причем указанный способ включает следующие этапы:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к *Streptococcus pyogenes*; и

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA *Streptococcus pyogenes*, причем указанная одна или более популяций антигена SpnA *Streptococcus pyogenes* способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) оценку одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;

iv) причем присутствие комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, выше порогового значения указывает на недавнее воздействие SpnA *Streptococcus pyogenes* на субъекта;

v) причем присутствие одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN совместно с отсутствием комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, ниже порогового значения указывает на воздействие SpnA *Streptococcus pyogenes* на субъекта в прошлом; и

vi) если субъект недавно подвергался воздействию *Streptococcus pyogenes*, то назначают лечение недавно возникшего ревматизма или острого PSGN; а если субъект в прошлом подвергался воздействию *Streptococcus pyogenes*, то назначают лечение установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes* или назначают лечение ревматизма или PSGN.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего ревматизмом или PSGN, с применением антибиотика, эффективного против *Streptococcus pyogenes*, причем указанный способ включает следующие этапы:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к *Streptococcus pyogenes*; и

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA *Streptococcus pyogenes*, причем указанная одна или более популяций антигена SpnA *Streptococcus pyogenes* способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) оценку одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;

iv) причем присутствие комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*,

tosoccus pyogenes, выше порогового значения указывает на недавнее воздействие SpnA Streptococcus pyogenes на субъекта;

v) причем присутствие одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN совместно с отсутствием комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA Streptococcus pyogenes, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA Streptococcus pyogenes, ниже порогового значения указывает на воздействие SpnA Streptococcus pyogenes на субъекта в прошлом; и

vi) если субъект недавно подвергался воздействию Streptococcus pyogenes, то вводят антибиотик, эффективный против острой или текущей инфекции Streptococcus pyogenes; а если субъект ранее (в прошлом) подвергался воздействию Streptococcus pyogenes, то вводят антибиотик, эффективный против установившейся или последующей инфекции Streptococcus pyogenes.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего ревматизмом или PSGN, с применением антибиотика, эффективного против Streptococcus pyogenes, причем указанный способ включает следующие этапы:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к Streptococcus pyogenes;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA Streptococcus pyogenes и одной или более популяциями антигена против ДНКазы B Streptococcus pyogenes и/или одной или более популяциями антигена против SLO Streptococcus pyogenes, причем указанная одна или более популяций антигена Streptococcus pyogenes способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем:

a) присутствие комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, выше порогового значения указывает на недавнее воздействие SpnA Streptococcus pyogenes на субъекта; и

b) присутствие комплексов, специфичных по отношению к ДНКазе B Streptococcus pyogenes, и/или комплексов, специфичных по отношению к SLO Streptococcus pyogenes, и отсутствие комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, или обнаружение комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, ниже порогового значения указывает на воздействие SpnA Streptococcus pyogenes на субъекта в прошлом,

iv) если субъект недавно подвергся воздействию Streptococcus pyogenes, то вводят антибиотик, эффективный против острой инфекции Streptococcus pyogenes; и если субъект ранее подвергался воздействию Streptococcus pyogenes, то вводят антибиотик, эффективный против установившейся или последующей инфекции Streptococcus pyogenes.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего ревматизмом или PSGN, причем способ включает стадии:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к Streptococcus pyogenes;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA Streptococcus pyogenes и одной или более популяциями антигена против ДНКазы B Streptococcus pyogenes и/или одной или более популяциями антигена против SLO Streptococcus pyogenes, причем указанная одна или более популяций антигена Streptococcus pyogenes способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем:

a) присутствие комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, выше порогового значения указывает на недавнее воздействие SpnA Streptococcus pyogenes на субъекта; и

b) присутствие комплексов, специфичных по отношению к ДНКазе B Streptococcus pyogenes, и/или комплексов, специфичных по отношению к SLO Streptococcus pyogenes, и отсутствие комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, или обнаружение комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, ниже порогового значения указывает на воздействие SpnA Streptococcus pyogenes на субъекта в прошлом,

iv) если субъект недавно подвергался воздействию Streptococcus pyogenes, то назначают лечение недавно возникшего ревматизма или острого PSGN; а если субъект в прошлом подвергался воздействию Streptococcus pyogenes, то назначают лечение ревматизма или PSGN.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения ревматизма или PSGN у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает следующие этапы:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к Streptococcus pyogenes; и

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA Streptococcus pyogenes, причем указанная одна или более популяций антигена SpnA Streptococcus pyogenes способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) оценку одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;

iv) причем присутствие комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA Streptococcus pyogenes, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA Streptococcus pyogenes, выше порогового значения указывает на недавнее воздействие SpnA Streptococcus pyogenes на субъекта;

v) причем присутствие одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN совместно с отсутствием комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA Streptococcus pyogenes, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA Streptococcus pyogenes, ниже порогового значения указывает на воздействие SpnA Streptococcus pyogenes на субъекта в прошлом; и

vi) если субъект недавно подвергнулся воздействию Streptococcus pyogenes, то назначают лечение недавно возникшего ревматизма или острого PSGN; а если субъект в прошлом подвергнулся воздействию Streptococcus pyogenes, то назначают лечение ревматизма или PSGN.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения ревматизма или PSGN у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает следующие этапы:

i) определение наличия, отсутствия или количества одного или более из антител, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, в биологическом образце от субъекта; а также

ii) необязательную оценку одного или более из других диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;

iii) прогнозирование того, что указанный субъект страдает недавно возникшим ревматизмом или острым PSGN, если образец содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, в количестве, превышающем пороговое значение; а также

iv) введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антибиотика, эффективного против недавней инфекции Streptococcus pyogenes.

В одном варианте реализации способ лечения ревматизма или PSGN у субъекта, нуждающегося в этом, включает этапы:

i) определение наличия, отсутствия или количества одного или более из антител, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, в биологическом образце от субъекта; а также

ii) оценку одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;

iii) прогнозирование того, что указанный субъект страдает недавно возникшим ревматизмом или острым PSGN, если образец содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, в количестве, превышающем пороговое значение; а также у субъекта есть один или более из других диагностических критериев ревматизма или PSGN; и

iv) введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антибиотика, эффективного против острой инфекции Streptococcus pyogenes.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения ревматизма или PSGN у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает следующие этапы:

i) определение наличия, отсутствия или количества одного или более из антител, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, в биологическом образце от субъекта; а также

ii) оценку одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;

iii) прогнозирование того, что указанный субъект страдает ревматизмом или PSGN, если образец содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, в количестве ниже порогового значения, а также у субъекта есть один или более из других диагностических критериев ревматизма или PSGN; и

iv) введение субъекту терапевтически эффективного количества антибиотика, эффективного против установившейся или последующей инфекции Streptococcus pyogenes.

В различных вариантах реализации наличие, отсутствие или количество одного или более из антител, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, определяют путем приведения указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA Streptococcus pyogenes, причем указанная одна или более популяций антигена SpnA Streptococcus pyogenes способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

в различных вариантах реализации количество одного или более антител, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, превышающее пороговое значение, представляет собой титр антител, ассоциированный с или свидетельствующий о недавнем воздействии Streptococcus pyogenes на субъекта.

В различных вариантах реализации количество одного или более антител, специфичных по отно-

шению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, меньшее порогового значения, представляет собой титр антител, ассоциированный с или свидетельствующий о воздействии *Streptococcus pyogenes* на субъекта в прошлом.

В различных вариантах реализации пороговое значение представляет собой количество антител, специфичных по отношению к SpnA, которое отделяет диапазон титра антител или средний титр антител, наблюдаемый в популяции больных ревматизмом или PSGN в течение 20 дней после их госпитализации, от диапазона титра антител или среднего титра антител, наблюдаемого в популяции больных ревматизмом или PSGN спустя 20 дней после их госпитализации.

В одном варианте реализации пороговое значение представляет собой верхний предел нормы (ULN), являясь 80-м процентилем соответствующей здоровой популяции.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента с применением антибиотика, эффективного против *Streptococcus pyogenes*, причем указанный пациент страдает или подвергался воздействию инфекции *Streptococcus pyogenes*, причем указанный способ включает этапы:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к *Streptococcus pyogenes*; и

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA *Streptococcus pyogenes*, причем указанная одна или более популяций антигена SpnA *Streptococcus pyogenes* способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) оценку одного или более других диагностических критериев наличия *Streptococcus pyogenes* у субъекта или ревматизма или PSGN у субъекта;

iv) причем присутствие комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, выше порогового значения указывает на недавнее воздействие SpnA *Streptococcus pyogenes* на субъекта;

v) причем присутствие одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN совместно с отсутствием комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, ниже порогового значения указывает на воздействие SpnA *Streptococcus pyogenes* на субъекта в прошлом; и

vi) если субъект недавно подвергся воздействию *Streptococcus pyogenes*, то вводят антибиотик, эффективный против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*; и если субъект ранее подвергался воздействию *Streptococcus pyogenes*, то вводят антибиотик, эффективный против установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes*.

В одном варианте реализации способ лечения пациента с применением антибиотика, эффективного против *Streptococcus pyogenes*, включает этапы:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к *Streptococcus pyogenes*;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA *Streptococcus pyogenes* и одной или более популяциями антигена против ДНКазы B *Streptococcus pyogenes* и/или одной или более популяциями антигена против SLO *Streptococcus pyogenes*, причем указанная одна или более популяций антигена *Streptococcus pyogenes* способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем

a) присутствие комплексов, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, выше порогового значения указывает на недавнее воздействие SpnA *Streptococcus pyogenes* на субъекта; и

b) присутствие комплексов, специфичных по отношению к ДНКазе B *Streptococcus pyogenes*, и/или комплексов, специфичных по отношению к SLO *Streptococcus pyogenes*, и отсутствие комплексов, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, или обнаружение комплексов, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, ниже порогового значения указывает на воздействие SpnA *Streptococcus pyogenes* на субъекта в прошлом,

iv) если субъект недавно подвергся воздействию *Streptococcus pyogenes*, то вводят антибиотик, эффективный против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*; и если субъект ранее подвергался воздействию *Streptococcus pyogenes*, то вводят антибиотик, эффективный против установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes*.

В различных вариантах реализации лечение недавно возникшего ревматизма или острого PSGN или лечение острой или текущей инфекции *Streptococcus pyogenes* представляет собой введение антибиотика, эффективного против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, например, введение в соответствии со схемой лечения. Например,

схема применения, эффективная против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, или схема применения, эффективная для лечения недавно возникшего ревматизма или острого PSGN, включает 10-дневный курс одного или более антибиотиков, например, 10-дневный курс бициллина. Специалистам в данной области техники, использующим преимущества настоящего изобретения, включая некоторые типичные примеры, описанные в настоящем документе, должны быть известны другие подходящие схемы лечения.

В различных вариантах реализации лечение ревматизма или PSGN или лечение установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes* представляет собой введение антибиотика, эффективного против установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes*, например, введение в соответствии со схемой лечения, например, схемой профилактического лечения. Например, схема приема, эффективная против установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes*, или схема приема, эффективная для лечения ревматизма или PSGN, включает ежемесячное введение одного или более антибиотиков, например, ежемесячное введение бициллина. Специалистам в данной области техники, использующим преимущества настоящего изобретения, включая некоторые типичные примеры, описанные в настоящем документе, должны быть известны другие подходящие схемы лечения.

В одном примере лечение ревматизма или PSGN или лечение установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes* включает постельный режим и/или госпитализацию.

В одном примере назначение лечения недавно возникшего ревматизма или острого PSGN включает введение субъекту антибиотика, эффективного против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*.

В одном примере назначение лечения ревматизма или PSGN включает введение субъекту антибиотика, эффективного против установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes*.

В одном примере назначение лечения ревматизма или PSGN включает госпитализацию субъекта и/или назначение или предписание субъекту постельного режима.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу прогнозирования чувствительности пациента, страдающего ревматизмом или PSGN, к лечению посредством антибиотика, причем указанный способ включает следующие этапы:

- i) определение наличия, отсутствия или количества одного или более из антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, в биологическом образце от субъекта; а также
- ii) оценку одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;
- iii) прогнозирование вероятного реагирования субъекта на лечение с применением антибиотика, если образец содержит одно или более антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, в количестве ниже порогового значения, и у субъекта имеется один или более из других диагностических критериев ревматизма или PSGN; а также
- iv) введение субъекту терапевтически эффективного количества антибиотика, эффективного против установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes*.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу прогнозирования чувствительности пациента, страдающего ревматизмом или PSGN, к лечению посредством антибиотика, причем указанный способ включает этапы:

- i) определение наличия, отсутствия или количества одного или более из антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, в биологическом образце от субъекта; а также
- ii) необязательную оценку одного или более из других диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;
- iii) прогнозирование вероятного реагирования субъекта на лечение с применением антибиотика, эффективного для лечения недавно возникшего ревматизма или острого PSGN, если образец содержит одно или более антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, в количестве, превышающем пороговое значение, и, необязательно, если у субъекта имеется один или более из других диагностических критериев ревматизма или PSGN; а также
- iv) введение субъекту терапевтически эффективного количества антибиотика, эффективного против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу определения схемы лечения для пациента, страдающего ревматизмом или PSGN, причем указанный способ включает этапы:

- i) определение наличия, отсутствия или количества одного или более из антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, в биологическом образце от субъекта; а также
- ii) оценку одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;
- iii) определение того, что субъекта следует подвергать лечению согласно схеме, подходящей для лечения ревматизма или PSGN, если образец содержит одно или более антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, в количестве ниже порогового значения, и у субъекта имеется один или более из других диагностических критериев ревматизма или PSGN; а также
- iv) лечение субъекта в соответствии со схемой лечения, подходящей для лечения ревматизма или PSGN.

В одном варианте реализации лечение ревматизма или PSGN представляет собой лечение хронической ревматической болезни сердца.

В одном варианте реализации лечение ревматизма или PSGN включает введение субъекту терапев-



тически эффективного количества антибиотика, эффективного против установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes*, например, профилактически эффективного количества такого антибиотика.

В одном варианте реализации схемой лечения, подходящей для лечения ревматизма или PSGN, является ежемесячное введение антибиотика, например, ежемесячное введение бициллина (бензатинбензилпенициллина).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу определения схемы лечения для пациента, страдающего ревматизмом или PSGN, причем указанный способ включает этапы:

i) определение наличия, отсутствия или количества одного или более из антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, в биологическом образце от субъекта; а также

ii) необязательную оценку одного или более из других диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;

iii) определение того, что субъекта следует подвергать лечению согласно схеме, подходящей для лечения недавно возникшего ревматизма или острого PSGN, если образец содержит одно или более антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*, в количестве выше порогового значения, и, необязательно, у субъекта имеется один или более из других диагностических критериев ревматизма или PSGN; а также

iv) необязательно, введение субъекту терапевтически эффективного количества антибиотика, эффективного против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, в соответствии со схемой лечения.

В одном варианте реализации, если субъект недавно подвергся воздействию *Streptococcus pyogenes*, антибиотик, эффективный против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, вводят в дозе, эффективной против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*.

В одном варианте реализации, если субъект недавно подвергся воздействию *Streptococcus pyogenes*, антибиотик, эффективный против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, вводят в дозе, превышающей дозу для субъекта, страдающего от установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes* или ревматизма или PSGN.

В одном варианте реализации, если субъект недавно подвергся воздействию *Streptococcus pyogenes*, антибиотик, эффективный против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, вводят в сочетании с одним или более из других терапевтических агентов, например, противовоспалительным агентом, например, аспирином, глюкокортикоидами, например, преднизолом, нейролептиками, например, галоперидолом, средствами с положительным инотропным действием, например, дигоксином, или в сочетании с одним или более из других способов лечения, например, длительной госпитализацией, постельным режимом и т.п.

В одном варианте реализации риск нежелательной реакции или последствий от введения антибиотика пациенту, подвергавшемуся воздействию, но не подвергавшемуся недавнему воздействию *Streptococcus pyogenes*, является более низким после введения антибиотика, эффективного против хронической инфекции *Streptococcus pyogenes*, чем если бы указанный антибиотик представлял собой антибиотик, вводимый субъекту, страдающему острой инфекцией *Streptococcus pyogenes* или недавно возникшим ревматизмом или острым PSGN.

В одном варианте реализации риск нежелательной реакции или последствий от введения антибиотика пациенту, подвергавшемуся воздействию, но не подвергавшемуся недавнему воздействию *Streptococcus pyogenes*, является более низким после введения антибиотика, эффективного против инфекции *Streptococcus pyogenes*, в количестве, эффективном после установившейся или хронической инфекции *Streptococcus pyogenes*, чем если бы указанный антибиотик вводили в количестве, эффективном для лечения острой инфекции *Streptococcus pyogenes* или недавно возникшего ревматизма или острого PSGN.

В одном варианте реализации, если субъект недавно подвергся воздействию *Streptococcus pyogenes*, то введение антибиотика, эффективного против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, включает парентеральное введение антибиотика.

В различных вариантах реализации антибиотик, эффективный против *Streptococcus pyogenes*, выбран из группы, включающей пенициллин, амоксициллин, оксациллин, эритромицин, азитромицин, кларитромицин, цефалотин, цефокситин, цефиксим, цефуроксим, цефотаксим, цефтриаксон, ванкомицин, клиндамицин, рифампицин, ципрофлоксацин, тетрациклин, котримоксазол и хлорамфеникол.

В различных вариантах реализации антибиотик, эффективный против *Streptococcus pyogenes*, выбран из группы, включающей  $\beta$ -лактамы, например, пенициллин, амоксициллин (амоксициллин), цефиксим, цефподоксин, цефотаксим, цефтриаксон, оксациллин; макролиды, например, эритромицин, спирамицин, азитромицин; линкозаминны, например, клиндамицин; стрептограминны, например, пристинамицин; кетолиды, например, телитромицин; фениколы, например, хлорамфеникол; гликопептиды, например, тейкопланин, ванкомицин; фторхинолоны, например, левофлоксацин; и тетрациклины, например, тетрациклин.

В одном варианте реализации антибиотик, эффективный против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, представляет собой пенициллин, например, бензилпенициллин, включая новокаиновую соль бензилпенициллина (например, кристициллин) и бензатина бензилпенициллин (например, бициллин, би-

циллин L-A), феноксиметилпенициллин (например, Veopen-VK, Betapen-VK, робициллин VK, Veetids), эритромицин, например, E-Mycin, Ery-Tab, эритроцин, или сульфадиазин, например, микросульфон.

В одном варианте реализации, если пациент недавно подвергся воздействию *Streptococcus pyogenes*, то введение антибиотика, эффективного против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, включает парентеральное введение бензилпенициллина, эритромицина или сульфадиазина, например, внутривенное или внутримышечное введение бензилпенициллина, эритромицина или сульфадиазина. В еще одном варианте реализации пероральное введение заменяет парентеральное введение.

В различных вариантах реализации антибиотик, эффективный против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, вводят в соответствии со схемой приема. В различных примерах схема приема включает введение ударной дозы указанного антибиотика, например, в течение острого периода лечения.

В некоторых вариантах реализации период острого лечения составляет от приблизительно 5 дней до приблизительно 20 дней, например, от приблизительно 8 дней до приблизительно 15 дней или от приблизительно 10 дней до приблизительно 12 дней, в том числе приблизительно 10 дней.

В одном примере схема приема, эффективная против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, или схемы приема, эффективные для лечения недавно возникшего ревматизма или острого PSGN, включают 10-дневный курс одного или более антибиотиков, например, 10-дневный курс бициллина. Например, некоторые типичные схемы приема, эффективные против острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, или схемы приема, эффективные для лечения недавно возникшего ревматизма или острого PSGN, включают:

i) для бензатина бензилпенициллина (бициллина): приблизительно 900 мг в качестве разовой дозы, вводимой, как правило, путем глубокого в/м введения, для взрослых и детей массой более 30 кг, и приблизительно 450-675 мг в качестве разовой дозы для детей массой до 30 кг, или 600000 ME в качестве разовой в/м дозы для пациентов до 20 кг и  $1,2 \times 10^6$  ME в качестве разовой в/м дозы для пациентов массой более 20 кг; все эти схемы, как правило, рассчитаны на 10 дней

ii) для феноксиметилпенициллина: от 125 до 250 мг два раза в день, перорально при невозможности в/м введения, обычно в течение 10 дней, или от 10 мг/кг до 500 мг два раза в день в течение 10 дней;

iii) для эритромицина: от 10 мг/кг до максимум 500 мг два раза в день в течение 10 дней;

iv) для этилсукцината эритромицина: 40 мг/кг/день в виде 2-4 разделенных доз, до максимальной дозы 1 г/день для детей.

В различных вариантах реализации антибиотик, эффективный против установившейся или хронической инфекции *Streptococcus pyogenes*, вводят в соответствии со схемой введения. Например, некоторые типичные схемы введения, эффективные против установившейся или последующей инфекции *Streptococcus pyogenes*, или схемы введения, эффективные для лечения ревматизма или PSGN, включая хроническую ревматическую болезнь сердца, включают:

i) для бензатина бензилпенициллина (бициллина): приблизительно 900 мг в качестве разовой дозы, вводимой, как правило, путем глубокого в/м введения, для взрослых и детей массой более 30 кг каждые 4 недели, и приблизительно 450-675 мг для детей массой до 30 кг каждые 4 недели, или 600000 ME внутримышечно каждые 4 недели для пациентов до 20 кг и  $1,2 \times 10^6$  ME внутримышечно каждые 4 недели для пациентов массой более 20 кг;

ii) для феноксиметилпенициллина: от 125 до 250 мг два раза в день, перорально при невозможности в/м введения, обычно в течение 10 дней;

iii) для эритромицина: 250 мг два раза в день;

iv) для этилсукцината эритромицина: 400 мг два раза в день.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения недавнего воздействия *Streptococcus pyogenes* на субъекта, включающему:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к *Streptococcus pyogenes*;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA *Streptococcus pyogenes*, причем указанная одна или более популяций антигена SpnA *Streptococcus pyogenes* способна связывать антитела, специфичные по отношению к антигену SpnA, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген SpnA:антитело, специфичное к антигену SpnA", если в биологическом образце присутствуют антитела, специфичные по отношению к антигену SpnA; а также

iii) обнаружение наличия или отсутствия комплексов,

iv) необязательно, оценку одного или более из других диагностических критериев присутствия *Streptococcus pyogenes* или ревматизма или PSGN у субъекта;

v) причем присутствие комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, или количество комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, выше порогового значения указывает на недавнее воздействие SpnA *Streptococcus pyogenes* на субъекта;

vi) причем присутствие одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN совместно с отсутствием комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*, или количества комплексов, специфичных по отношению к антигену SpnA *Streptococcus pyogenes*,

ниже порогового значения указывает на воздействие SpnA Streptococcus pyogenes на субъекта в прошлом.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения или диагностики ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита (PSGN), включая острый постстрептококковый гломерулонефрит (APSGN) у субъекта, или повышенной вероятности развития ревматизма или PSGN у субъекта, причем указанный способ включает:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к Streptococcus pyogenes;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA Streptococcus pyogenes, причем указанная одна или более популяций антигена SpnA Streptococcus pyogenes способна связывать антитела, специфичные по отношению к антигену SpnA, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген SpnA:антитело, специфичное к антигену SpnA", если в биологическом образце присутствуют антитела, специфичные по отношению к антигену; а также

iii) обнаружение наличия или отсутствия комплексов;

iv) оценку одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;

v) причем наличие одного или более из других диагностических критериев ревматизма или PSGN вместе с наличием комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, или обнаружение количества комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, превышающего пороговое значение, указывает на повышенную вероятность развития ревматизма или APSGN или свидетельствует о недавнем воздействии Streptococcus pyogenes на субъекта в качестве одного из критериев наличия ревматизма или PSGN у субъекта;

vi) и причем наличие одного или более из других диагностических критериев ревматизма или PSGN вместе с отсутствием комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, или количество комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, меньшее порогового значения, указывает на ревматизм или PSGN у субъекта или свидетельствует о воздействии Streptococcus pyogenes на субъекта в прошлом в качестве одного из критериев наличия ревматизма или PSGN у субъекта, например, повышенного риска последующей инфекции Streptococcus pyogenes или ее последствий.

В одном варианте реализации одним или более из других диагностических критериев является наличие или отсутствие антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам Streptococcus pyogenes, отличным от SpnA. Например, одним или более из других диагностических критериев является наличие или отсутствие антител, специфичных по отношению к ДНКазе B Streptococcus pyogenes, или антител, специфичных по отношению к SLO Streptococcus pyogenes.

Любой из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, может относиться к любому из аспектов, изложенных в настоящем документе. Чтобы избежать путаницы, из описания в настоящем документе очевидно, что любой из аспектов, описанных в настоящем документе, например, любой из способов, описанных в настоящем документе, в некоторых вариантах реализации может использовать один или более из полипептидов нуклеазы A (SpnA) Streptococcus pyogenes, например, один или более из усеченных полипептидов SpnA, или один или более из фрагментов SpnA, описанных в настоящем документе. Например, в различных вариантах реализации один или более из антигенов или одна или более из популяций антигена SpnA Streptococcus pyogenes присутствуют в виде одного или более из полипептидов SpnA, например, одного или более из усеченных полипептидов SpnA или одного или более из фрагментов SpnA, описанных в настоящем документе.

Аналогичным образом, при применении в любом из аспектов, описанных в настоящем документе, например, любом из способов, описанных в настоящем документе, один или более из антигенов или полипептидов ДНКазы B Streptococcus pyogenes в некоторых вариантах реализации может являться одним или более из полипептидов ДНКазы B, например, одним или более из антигенных фрагментов ДНКазы B, описанных в настоящем документе. Например, в различных вариантах реализации один или более из антигенов или одна или более из популяций антигена ДНКазы B Streptococcus pyogenes присутствуют в виде одного или более из полипептидов ДНКазы B, например, одного или более из фрагментов ДНКазы B, описанных в настоящем документе.

Аналогичным образом, при применении в любом из аспектов, описанных в настоящем документе, например, любом из способов, описанных в настоящем документе, один или более из антигенов или полипептидов SLO Streptococcus pyogenes в некоторых вариантах реализации может являться одним или более из полипептидов ДНКазы B, например, одним или более из антигенных фрагментов SLO, описанных в настоящем документе. Например, в различных вариантах реализации один или более из антигенов или одна или более из популяций антигена SLO Streptococcus pyogenes присутствуют в виде одного или более из полипептидов SLO, например, одного или более из фрагментов SLO, описанных в настоящем документе.

В одном варианте реализации присутствие двух или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело" указывает на присутствие Streptococcus pyogenes у субъекта или указывает на недавнее воздействие Streptococcus pyogenes на субъекта, или указывает, что биологический образец содержит антитела, специфичные по отношению к двум или более антигенам Streptococcus pyogenes.

В одном варианте реализации увеличение обнаружения одного или более комплексов представляет собой увеличение относительно контрольного уровня антигена, установленного для каждой исследуемой популяции.

В одном варианте реализации одно или более антител, специфичных по отношению к одному или более из антигенов *Streptococcus pyogenes*, представляет собой одно или более из сывороточных антител.

В одном варианте реализации одно или более из сывороточных антител представляют собой одно или более из антител IgG.

В одном варианте реализации одно или более из сывороточных антител представляют собой одно или более из антител IgA или одно или более из антител IgM.

В одном варианте реализации одним или более из других диагностических критериев является наличие или отсутствие одного или более из клинических симптомов, ассоциированных с ревматизмом или PSGN.

В одном варианте реализации указанные один или более из клинических симптомов выбраны из мигрирующего полиартрита, кардита, гематурии, ревматической эритемы, подкожных узелков, хореи Сиденгама или пиодермии.

В одном варианте реализации один или более из антигенов *Streptococcus pyogenes* представляют собой антиген одного из следующих белков:

- i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes*,
- ii) дезоксирибонуклеазы В (ДНКазы В) или
- iii) стрептолизина-О (SLO).

В одном варианте реализации один или более из антигенов *Streptococcus pyogenes* выбраны из группы, состоящей из:

- i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes* или
- ii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или
- iii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или
- iv) дезоксирибонуклеазы В (ДНКазы В) или
- v) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или
- vi) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или
- vii) стрептолизина-О (SLO) или
- viii) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или
- ix) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или
- x) любой комбинации двух или более из i)-ix), приведенных выше.

В одном варианте реализации биологический образец приводят в контакт с популяцией каждого из следующих антигенов *Streptococcus pyogenes*:

- i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes* или
- ii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или
- iii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, а также
- iv) дезоксирибонуклеазы В (ДНКазы В) или
- v) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или
- vi) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, а также
- vii) стрептолизина-О (SLO) или
- viii) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или
- ix) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В одном варианте реализации биологический образец приводят в контакт с популяцией каждого из следующих антигенов *Streptococcus pyogenes*:

- i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes*,

- ii) дезоксирибонуклеазы В (ДНКазы В) и
- iii) стрептолизина-О (SLO).

В одном варианте реализации биологический образец приводят в контакт с популяцией каждого из следующих антигенов *Streptococcus pyogenes*:

- i) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8,
- ii) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5,
- iii) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В одном варианте реализации в композиции присутствуют две или более популяции антигена *Streptococcus pyogenes*.

В одном варианте реализации один или более из антигенов *Streptococcus pyogenes* мечены обнаружимой меткой и/или связаны с микрочастицей, гранулой или обнаружимым агентом.

В одном варианте реализации одна или более из популяций антигенов *Streptococcus pyogenes* ковалентно связаны с гранулами или микрочастицами.

В одном варианте реализации каждая из популяций антигенов *Streptococcus pyogenes* ковалентно связана с гранулами или микрочастицами, при этом каждая из разных популяций гранул или микрочастиц необязательно отличаются друг от друга.

В одном варианте реализации гранулы представляют собой полистирольные гранулы, магнитные гранулы, карбоксилированные гранулы, функционализированные гранулы, или микрочастицы представляют собой полистирольные микрочастицы, магнитные микрочастицы, карбоксилированные микрочастицы или функционализированные микрочастицы. В различных примерах гранулы подходят для использования в мультиплексных анализах, например, анализах, включающих две или более популяций гранул или микрочастиц, где каждая популяция конъюгирована со своим антигеном. В различных примерах гранулы или микрочастицы подходят для использования при иммуноанализе, например, СВА, luminex-анализе и т.п.

В одном варианте реализации обнаружение комплексов "антиген:антитело" включает воздействие специфичного партнера по связыванию, несущего обнаружимую метку, на комплексы, и обнаружение сигнала метки при наличии антиген-специфичных антител в биологическом образце.

В одном варианте партнер по специфичному связыванию содержит антитело или его фрагмент.

В одном варианте реализации партнер по специфичному связыванию представляет собой антитело против IgG, антитело против IgG-PE или его фрагмент.

В одном варианте реализации комплексы "антиген:антитело" обнаруживают с использованием точного прибора, иммуноанализа, например, иммунологического анализа на планшетах, электрофореза и/или иммуноблоттинга, иммунохроматографических полосок, электронного биосенсора, резонансного биосенсора или микрожидкостного устройства или сенсора.

В одном варианте реализации иммуноанализ, например, иммуноанализ на планшетах, представляет собой твердофазный ИФА или luminex-анализ.

В одном варианте реализации комплексы "антиген:антитело" обнаруживают в ходе luminex-анализа, например, luminex-анализа, приведенного в настоящем документе в качестве примера.

В одном варианте реализации присутствие одного или более комплексов или одного или более антиген-специфичных антител обнаруживают с использованием вторичного антитела, меченого обнаружимой меткой.

В одном варианте реализации вторичное антитело, меченое обнаружимой меткой, представляет собой антитело против IgG-PE.

В одном варианте реализации антигены *Streptococcus pyogenes* мечены обнаружимой меткой.

В одном варианте реализации обнаруживаемая метка представляет собой флуорофор.

В одном варианте реализации биологический образец получают из вида животных, относящегося к млекопитающим.

В одном варианте реализации биологический образец представляет собой образец биологической жидкости.

В одном варианте реализации субъект является человеком.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному, очищенному или рекомбинантному полипептиду SpnA, причем указанный полипептид SpnA:

- i) усечен по N-концу;
  - ii) усечен по C-концу или
  - iii) усечен как по N-концу, так и по C-концу;
- относится к SpnA дикого типа.

В одном варианте реализации полипептид SpnA:

- i) является иммуногенным; или
- ii) способен иммунологически перекрестно реагировать с SpnA дикого типа; или

iii) мечен обнаружимой меткой; или  
 iv) обладает повышенной стабильностью при хранении при комнатной температуре по сравнению с SpnA дикого типа; или

v) содержит 10 или более смежных аминокислот из SEQ ID NO: 8; или

vi) является любой комбинацией двух или более из i)-v), приведенных выше.

В одном варианте реализации полипептид SpnA характеризуется повышенным средним значением Tagg по сравнению с SpnA дикого типа, где Tagg представляет собой температуру, при которой агрегируется 50% молекул белка, например, согласно анализу с использованием электрофореза в ДСН-ПААГ. Например, полипептид SpnA характеризуется средним значением Tagg, составляющим по меньшей мере приблизительно 50°C, например, средним значением Tagg, составляющим по меньшей мере приблизительно 50°C, согласно анализу с использованием электрофореза в ДСН-ПААГ.

В одном варианте реализации полипептид SpnA характеризуется повышенной термостабильностью при температуре от приблизительно 35°C до приблизительно 60°C по сравнению с полипептидом SpnA дикого типа.

В одном варианте реализации полипептид обладает повышенной термостабильностью, повышенной иммуногенной стабильностью или как повышенной термостабильностью, так и повышенной иммуногенной стабильностью.

Кроме того, во избежание сомнений, специалисты в данной области техники должны принимать во внимание, что любой из аспектов, описанных в настоящем документе, например, любой из способов, описанных в настоящем документе, в некоторых вариантах реализации может использовать один или более из усеченных полипептидов нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes*, например, один или более из вышеописанных усеченных полипептидов SpnA, в том числе один или более из фрагментов SpnA, описанных в настоящем документе. Например, в различных вариантах реализации один или более из антигенов или одна или более из популяций антигена SpnA *Streptococcus pyogenes* присутствуют в виде одного или более из усеченных полипептидов SpnA, например, одного или более из усеченных по N-концу полипептидов SpnA или одного или более из усеченных по C-концу полипептидов SpnA или одного или более из фрагментов SpnA, описанных в настоящем документе.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей выделенный, очищенный или рекомбинантный полипептид SpnA, описанный в настоящем документе.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей SpnA, меченый обнаружимой меткой.

В одном варианте реализации SpnA, меченый обнаружимой меткой, представляет собой усеченный полипептид SpnA, например, один или более из усеченных по N-концу полипептидов SpnA, или один или более из усеченных по C-концу полипептидов SpnA, или один или более из фрагментов SpnA, описанных в настоящем документе.

В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к набору для обнаружения или диагностики ревматизма или PSGN у субъекта, для выявления наличия инфекции *Streptococcus pyogenes* у субъекта или для выявления антиген-специфичных антител к *Streptococcus pyogenes* в биологическом образце, причем указанный набор содержит композицию, содержащую по меньшей мере один из антигенов *Streptococcus pyogenes*, выбранный из группы, состоящей из:

i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes* или

ii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или

iii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или

iv) дезоксирибонуклеазы В (ДНКазы В) или

v) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или

vi) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или

vii) стрептолизина-О (SLO) или

viii) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или

ix) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2,

необязательно, по меньшей мере одной композиции, содержащей контрольный образец антитела, причем контрольный образец антитела содержит антитело, специфичное по отношению к одному из антигенов *Streptococcus pyogenes*, присутствующих в наборе,

необязательно, одного или более из реагентов для создания среды, благоприятной для контакта одного или более антигенов с биологическим образцом,

необязательно, одного или более реагентов, позволяющих обнаружить комплекс, образованный

между одним или более антигенами и одним или более антителами, связывающими антиген *Streptococcus pyogenes*, присутствующий в биологическом образце, и инструкции по применению.

В одном варианте реализации по меньшей мере один из антигенов *Streptococcus pyogenes* ковалентно связан с гранулой или микрочастицей.

В одном варианте реализации композиция включает популяцию:

- i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes* или
- ii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или
- iii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

В одном варианте реализации композиция содержит популяцию каждого из следующих антигенов *Streptococcus pyogenes*:

- i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes* или
- ii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или
- iii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, а также
- iv) дезоксирибонуклеазы В (ДНКазы В) или
- v) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или
- vi) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, а также
- vii) стрептолизина-О (SLO) или
- viii) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или
- ix) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В различных вариантах реализации способов, представленных в настоящем документе, указанный способ перед этапом ii) дополнительно включает получение набора, описанного в настоящем документе.

В различных вариантах реализации способов или наборов, предложенных в настоящем документе, один или более из антигенов *Streptococcus pyogenes* выбраны из группы, включающей антистрептолизин (ASO), антигиалурионидазу (AHase), антистрептокиназу (ASKase), антиникотинамидадениндинуклеотидазу (анти-NAD).

В одном варианте реализации способ включает применение или композицию или набор, содержащий две или более популяций гранул или микрочастиц, причем каждая популяция гранул или микрочастиц содержит свой антиген *Streptococcus pyogenes* и по меньшей мере одна из популяций гранул или микрочастиц содержит популяцию одного из следующих антигенов *Streptococcus pyogenes*:

- i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes* или
- ii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или
- iii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, причем гранулы или микрочастицы можно применять в проточном приборе, при иммуноанализе, например, иммунологическом анализе на планшетах, электрофорезе и/или иммуноблоттинге, в иммунохроматографических полосках, электронном биосенсоре, резонансном биосенсоре или микрожидкостном устройстве или сенсоре, в том числе, например, при твердофазном ИФА, Lumiplex или СВА-анализе.

Одна или более из двух или более популяций гранул или микрочастиц необязательно содержат популяцию одного из следующих антигенов *Streptococcus pyogenes*:

- i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes* или
- ii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или
- iii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или
- iv) дезоксирибонуклеазы В (ДНКазы В) или
- v) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или
- vi) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или
- vii) стрептолизина-О (SLO) или
- viii) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из ами-

нокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или

ix) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения недавнего воздействия *Streptococcus pyogenes* на субъекта, включающему:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA *Streptococcus pyogenes*, причем указанная одна или более популяций антигена SpnA *Streptococcus pyogenes* способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем увеличение обнаружения одного или более комплексов выше порогового значения указывает на недавнее воздействие *Streptococcus pyogenes* на субъекта.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения или диагностики ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита (PSGN), включая острый постстрептококковый гломерулонефрит (APSGN) у субъекта, или повышенной вероятности развития ревматизма или PSGN у субъекта, причем указанный способ включает:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA *Streptococcus pyogenes*, причем указанная одна или более популяций антигена SpnA *Streptococcus pyogenes* способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем увеличение обнаружения одного или более комплексов выше порогового значения указывает на повышенную вероятность развития ревматизма или APSGN или на недавнее воздействие *Streptococcus pyogenes* на субъекта в качестве одного из критериев наличия ревматизма или PSGN у субъекта;

iv) оценку одного или более из диагностических критериев ревматизма или PSGN у субъекта;

v) причем увеличение обнаружения одного или более из указанных комплексов выше порогового значения в сочетании с одним или более из других диагностических критериев ревматизма или APSGN указывает на ревматизм или APSGN у субъекта.

В одном варианте реализации указанными одним или более диагностическими критериями является наличие или отсутствие одного или более из клинических симптомов, ассоциированных с ревматизмом или PSGN.

В одном варианте реализации указанные один или более из клинических симптомов выбраны из мигрирующего полиартрита, кардита, гематурии, ревматической эритемы, подкожных узелков, хореи Сиденгама или пиодермии.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения инфекции *Streptococcus pyogenes* у субъекта, включающему:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA *Streptococcus pyogenes*, причем указанная одна или более популяций антигена SpnA *Streptococcus pyogenes* способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем увеличение обнаружения одного или более из комплексов указывает на присутствие *Streptococcus pyogenes* у субъекта или недавнее воздействие *Streptococcus pyogenes* на субъекта.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения антиген-специфичных антител против *Streptococcus pyogenes* в биологическом образце, причем указанные антиген-специфичные антитела против *Streptococcus pyogenes* специфично связываются с SpnA *Streptococcus pyogenes*, причем указанный способ включает:

i) получение биологического образца от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более из антител, специфичных по отношению к SpnA *Streptococcus pyogenes*;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одной или более популяциями антигена SpnA *Streptococcus pyogenes*, причем указанная одна или более популяций антигена SpnA *Streptococcus pyogenes* способна связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом



образце, с образованием одной или более популяций комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген-специфичные антитела; а также

iii) обнаружение указанных комплексов, причем увеличение обнаружения одного или более из комплексов указывает на то, что биологический образец содержит антитела, специфичные по отношению к антигену *Streptococcus pyogenes*.

В одном варианте реализации постстрептококковый гломерулонефрит представляет собой острый постстрептококковый гломерулонефрит (APSGN).

В различных вариантах реализации увеличение обнаружения одного или более из комплексов представляет собой увеличение обнаружения одного или более из комплексов выше порогового значения.

В одном варианте реализации эталонный порог (также называемый отсечкой или ВГН) определяют для конкретной популяции. В одном примере для недавно возникшего ревматизма (ARF) в данной стране, например, для ARF в Новой Зеландии, пороговое значение определяют с использованием когорты здоровых, хорошо подобранных добровольцев. Установленные таким образом отсечки (или эталонные уровни) применяют ко всем случаям ARF в Новой Зеландии. Следует принимать во внимание, что эталонные пороговые значения могут различаться в разных странах, этнических группах и популяциях, и, таким образом, в определенных вариантах реализации разные страны или популяции определяют свои собственные эталонные пороговые значения.

В одном варианте реализации эталонное пороговое значение для обнаружения антигена *Streptococcus pyogenes* представляет собой средний титр указанного антитела, наблюдаемый в образцах, полученных из популяции больных ревматизмом или PSGN в течение 20 дней после их госпитализации. Например, эталонное пороговое значение для антигена *Streptococcus pyogenes* для применения в способе, описанном в настоящем документе, представляет собой средний титр антиген-специфичного антитела, наблюдаемый с использованием способов, описанных в настоящем документе, в образцах, полученных из популяции больных ревматизмом или PSGN, демографически сопоставимых с субъектом в пределах 20 дней их госпитализации.

В одном варианте реализации эталонное пороговое значение для обнаружения комплексов "антитело против SpnA:SpnA", например, эталонное пороговое значение для SpnA для применения при определении недавнего воздействия *Streptococcus pyogenes*, представляет собой средний титр антитела против SpnA, наблюдаемый в образцах, полученных из популяции больных ревматизмом или PSGN в течение 20 дней после их госпитализации. Например, эталонным пороговым значением для SpnA для применения при определении недавнего воздействия *Streptococcus pyogenes* является средний титр антител против SpnA, наблюдаемый с использованием способов, описанных в настоящем документе, в образцах, полученных из популяции больных ревматизмом или PSGN, демографически сопоставимых с субъектом в пределах 20 дней их госпитализации.

Другие объекты, аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего описания. В то же время следует понимать, что хотя в подробном описании и конкретных примерах указаны предпочтительные варианты реализации изобретения, они приведены исключительно в качестве иллюстрации, поскольку для специалистов в данной области техники из этого подробного описания станут очевидны различные изменения и модификации в пределах сущности настоящего изобретения.

#### Краткое описание фигур

Дополнительные аспекты настоящего изобретения станут очевидны из следующего описания, которое приведено исключительно в качестве примера и со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых:

фиг. 1 представляет графики разброса, на которых показана корреляция между медианными значениями флуоресценции (MFI) для одно- и многоканального анализа, определенным с использованием Cytometric Bead Array для SLO (фиг. 1A), ДНКазы B (фиг. 1B) и SpnA (фиг. 1C) в 10 образцах сыворотки. Выполнен линейный регрессионный анализ с определением следующих значений  $R^2$ : SLO=0,999; ДНКазы B=0,998; и SpnA=0,998;

на фиг. 2 показаны результаты твердофазного ИФА очищенного IgG против трех антигенов *Streptococcus* группы A. Антитела очищали от ВВИГ с использованием аффинной хроматографии, в результате чего получали IgG со специфичностью к SLO (A), ДНКазе B (B) и SpnA (C). Показатели разброса представляют собой стандартные отклонения;

на фиг. 3 представлены графики разброса, на которых показана концентрация сывороточных антител, определенная с использованием Cytometric Bead Array для SLO (A), ДНКазы (B) и SpnA (C). Показаны значения ВГН для каждого антигена (точечная линия). Для определения значений  $\rho$  выполняли одно-сторонний дисперсионный анализ Краскала-Уоллиса;

на фиг. 4 представлены графики разброса, на которых показана корреляция между коммерчески доступными тестами и Cytometric Bead Array для SLO (A), ДНКазы B (B). Выполнен линейный регрессионный анализ с определением значений  $R^2$  для SLO=0,968 и ДНКазы B=0,934;

на фиг. 5 представлены стандартные кривые для SLO, ДНКазы B и SpnA для Cytometric Bead Array, аппроксимированные пятипараметрической логистической формулой на программном обеспечении FCAP Array. Очищенный IgG, специфичный по отношению к SLO (500 нг/мл), ДНКазе B (500 нг/мл) и SpnA (1500 нг/мл), разбавляли в два раза и инкубировали с гранулами, связанными с антигеном;

на фиг. 6 изображена аминокислотная последовательность рекомбинантного фрагмента SLO, содержащего аминокислоты 34-571 (фиг. 6A), в то время как аминокислотная последовательность детоксифицированного аналога SLO представлена на фиг. 6B. Замещенные аминокислоты выделены и подчеркнуты;

на фиг. 7 изображена аминокислотная последовательность рекомбинантного фрагмента ДНКазы В, содержащего аминокислоты 43-271;

на фиг. 8 представлена аминокислотная последовательность рекомбинантного фрагмента SpnA, содержащего аминокислоты 28-854;

на фиг. 9 представлены три графика разброса, позволяющие сравнить одноканальный (отдельно для каждого антигена) и многоканальный luminex-анализ, при котором гранулы с тремя антигенами смешивали в равных частях и инкубировали с исследуемой сывороткой в одном анализе. На фиг. 9A представлена корреляция между MFI для SLO при одноканальном и многоканальном luminex-анализе; на фиг. 9B представлена корреляция между MFI для ДНКазы В при одноканальном и многоканальном luminex-анализе; и на фиг. 9C представлена корреляция между MFI для SpnA при одноканальном и многоканальном luminex-анализе, как описано в настоящем документе в примере 2;

на фиг. 10 представлены два графика разброса, демонстрирующие корреляцию между коммерчески доступными тестами и luminex-анализом для SLO (фиг. 10A) и для ДНКазы В (фиг. 10B). Выполнен линейный регрессионный анализ с определением значений  $R^2$  для SLO=0,933 и ДНКазы В=0,942;

на фиг. 11 представлены три графика, на которых показаны уровни IgG-антител в сыворотках пациентов, определенные с использованием luminex-анализа, причем сыворотку сегрегировали в зависимости от суток с момента госпитализации. Существенных различий в концентрации антитела против SLO в сыворотках, собранных через <20 дней после госпитализации, по сравнению с сыворотками, собранными через >20 дней после госпитализации (фиг. 11, левая панель), а также в концентрациях антитела против ДНКазы В между этими двумя группами не наблюдалось (фиг. 11, средняя панель). И наоборот, в сыворотках, собранных через >20 дней после госпитализации, наблюдалось значительное снижение концентрации антитела против SpnA по сравнению с сыворотками, собранными через <20 дней после госпитализации (фиг. 11, правая панель), как описано в примере 2 в настоящем документе;

на фиг. 12 представлены три графика, на которых показаны уровни IgG-антител в сыворотках пациентов, определенные с использованием luminex-анализа, причем сыворотку сегрегировали в зависимости от суток с момента госпитализации. Существенных различий в концентрации антитела против SLO в сыворотках, собранных через <20 дней после госпитализации, по сравнению с сыворотками, собранными через >20 дней после госпитализации (фиг. 12, левая панель), а также в концентрациях антитела против ДНКазы В между этими двумя группами не наблюдалось (фиг. 12, средняя панель). И наоборот, в сыворотках, собранных через >20 дней после госпитализации, наблюдалось значительное снижение концентрации антитела против SpnA по сравнению с сыворотками, собранными через <20 дней после госпитализации (фиг. 12, правая панель), как описано в примере 3 в настоящем документе;

на фиг. 13 представлены три графика, на которых показан анализ термостабильности нативного SpnA и усеченного полипептида SpnA, описанных в данном документе, как описано в примере 4. Фиг. 13A представляет собой хроматограмму анализа процентного содержания белка в характерной конформации при каждой температуре с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ. Фиг. 13B представляет собой график, на котором показана Tagg (температура, при которой агрегируется 50% молекул белка) для каждого белка при каждой температуре. Фиг. 13C представляет собой график среднего значения TAGG для каждого полипептида, на котором изображены повышенные средние значения Tagg для укороченного конструкта, составляющие  $51,0 \pm 0,6^\circ\text{C}$ , что значительно выше, чем для нативного полипептида SpnA ( $47,5 \pm 0,9^\circ\text{C}$ ).

### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к способам и композициям для обнаружения присутствия GAS-специфичных антител в биологических образцах. Обнаружение таких антител можно применять для выявления субъектов с повышенным риском возникновения иммунных последствий после инфекции, и для выявления субъектов, которым может быть полезен конкретный способ лечения, в дополнение к другим вариантам применения, которые станут очевидными для специалиста в данной области техники при прочтении следующего описания.

Если иное не требуется явным образом исходя из контекста, во всем описании и формуле изобретения слова "содержать", "содержащий" и т.п. должны толковаться во всеобъемлющем, а не в исключительном или исчерпывающем смысле, то есть в смысле "включающий, но не ограничивающийся".

В определенных вариантах реализации настоящее изобретение относится к способу оказания помощи при диагностике ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита (PSGN) или оценке склонности к развитию ревматизма или PSGN у субъекта, включающему определение наличия или количества одного или более антител, специфичных по отношению к одному или более из антигенов *Streptococcus pyogenes* в биологическом образце субъекта, причем повышенный уровень указанных антител в биологическом образце относительно уровня указанных антител в контрольном образце свидетельствует

о ревматизме или PSGN или повышенной склонности к развитию ревматизма или PSGN.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к способу определения эффективности лечения ревматизма или PSGN у субъекта, включающему определение наличия или количества одного или более антител, специфичных по отношению к одному или более из антигенов *Streptococcus pyogenes* из одного или более биологических образцов, полученных от субъекта до или во время курса лечения, причем снижение уровня одного или более антител, специфичных по отношению к одному или более из антигенов *Streptococcus pyogenes* в образцах, полученных от субъекта, с течением времени свидетельствует об эффективности лечения.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу отбора субъекта для лечения ревматизма или PSGN, включающему (а) определение наличия или количества одного или более антител, специфичных по отношению к одному или более из антигенов *Streptococcus pyogenes*, в биологическом образце, полученном от субъекта; (б) сравнение уровня указанных антител в биологическом образце с уровнем указанных антител в контрольном образце; и (с) отбор субъекта для лечения, если уровень указанных антител в биологическом образце превышает уровень указанных антител в контрольном образце.

Настоящее изобретение частично основано на сродстве антител к антигенным компонентам - способности антител специфично распознавать антиген или эпитоп и связываться с ними, а также на определении этого специфичного распознавания и связывания. Другими словами, настоящее изобретение частично основано на обнаружении или выявлении комплексов, образованных при распознавании и связывании антитела с конкретным эпитопом.

Термин "сродство" относится к показателю силы связывания отдельного эпитопа с областью, определяющей комплементарность (CDR) связывающей молекулы; в контексте настоящего изобретения обычно это молекула иммуноглобулина. Термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между популяцией иммуноглобулинов и антигеном(ами), т.е. функциональной устойчивости сочетания смеси иммуноглобулинов с антигеном. Специалисты в данной области техники должны понимать, что авидность связана как со сродством отдельных молекул иммуноглобулина в популяции со специфичными эпитопами, так и с валентностью иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между двухвалентным моноклональным антителом и антигеном с высоким содержанием повторов структуры эпитопа, например, полимером, должно характеризоваться высокой авидностью. Сродство или авидность антитела к антигену можно определить экспериментально с использованием любого подходящего способа, хорошо известного в данной области техники, включая некоторые способы, описанные в настоящем документе. Общие способы измерения сродства антитела к антигену включают твердофазный ИФА, РИА и поверхностный плазмонный резонанс. Измеренное сродство взаимодействия конкретных антитела:антигена может варьироваться при измерении в различных условиях, например, в зависимости от концентрации соли, pH, буфера, температуры. Таким образом, и, в частности, когда нужно сравнить данные, измерения сродства и других параметров связывания антигена, например,  $K_D$ ,  $IC_{50}$ , обычно выполняются с применением стандартизованных растворов антитела и антигена, стандартизованного буфера и стандартизованных условий анализа.

Термины "специфично связывающий" или "специфично распознающий", используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, обычно означают, что связывающая молекула, например, антитело, связывается с эпитопом посредством своего антиген-связывающего домена, и что связывание подразумевает некоторую комплементарность между антиген-связывающим доменом и эпитопом. Соответственно, считается, что антитело "специфично связывается" с эпитопом, если оно связывается с этим эпитопом посредством своего антиген-связывающего домена с большей легкостью, чем со случайным, неродственным эпитопом. Такое антитело может называться в настоящем документе "антителом, специфичным по отношению к" указанному эпитопу или классу эпитопов. Термин "специфичность" используется в настоящем документе для определения относительного сродства, с которым определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело "А" обладает более высокой специфичностью по отношению к данному эпитопу, чем антитело "В", или можно сказать, что антитело "А" связывается с эпитопом "х" с более высокой специфичностью, чем с родственным эпитопом "у".

Термин "определение" в настоящем документе включает оценку, количественную оценку, расчет или иное получение количества указанного материала (например, антитела, антигена или биомаркера), присутствующего в конкретном образце. Этого можно достичь путем измерения показания конечного параметра, который может представлять собой, например, появление обнаружимого продукта, любое обнаружимое изменение, например, уровня субстрата или любое изменение скорости появления продукта или исчезновения субстрата, или измерение количества антитела, связанного с антигеном, биомаркером, комплексом или другим реагентом, как описано в настоящем документе.

При его наличии, термин "характеристики иммунологического связывания" или другие характеристики связывания антитела с антигеном в его различных грамматических формах относится к специфичности, сродству, перекрестной реакционной способности и другим характеристикам связывания антитела.

В настоящем документе термины "иммуногенная стабильность", "иммунологическая стабильность" и их грамматические эквиваленты предполагают поддержание одной или более иммуногенных или иммунологических характеристик, например, поддержание способности вызывать указанный, в том числе специфичный иммунологический ответ, например, способность связываться или распознаваться антителом или способность вызывать клеточный иммунологический ответ. Например, при использовании в отношении конкретного антигена, полипептида или другого агента, иммуногенная стабильность или иммунологическая стабильность включает, например, поддержание антитело-специфичного распознавания, например, способность антигена, полипептида или другого агента связываться с определенным антителом. Следует понимать, что иммунологическая стабильность может также относиться к стабильности антитела, например, поддержанию способности распознавать эпитоп и связываться с ним.

В настоящем документе термин "предпочтительное связывание" подразумевает связывание, например, антитела с эпитопом, которое происходит с большей легкостью, нежели с другим эпитопом, например, родственным, сходным, гомологичным или аналогичным эпитопом. Таким образом, антитело, "предпочтительно связывающееся" с данным эпитопом, с большей вероятностью связывается с этим эпитопом, нежели с другим эпитопом, даже в тех случаях, когда такое антитело может проявлять некоторую перекрестную реакционную способность по отношению к другому эпитопу.

Например, можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп с константой диссоциации ( $K_D$ ), меньшей, чем  $K_D$  данного антитела для второго эпитопа. В одном варианте реализации антитело может считаться предпочтительно связывающим первый антиген, если оно связывает первый эпитоп со сродством, которое по меньшей мере на один порядок меньше, чем  $K_D$  данного антитела для второго эпитопа. В еще одном варианте реализации антитело может считаться предпочтительно связывающим первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп со сродством, которое по меньшей мере на два порядка меньше, чем  $K_D$  данного антитела для второго эпитопа.

В еще одном примере антитело может считаться предпочтительно связывающим первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с константой скорости ассоциации (скоростью ассоциации,  $k(on)$ ), меньшей, чем  $k(on)$  данного антитела для второго эпитопа. В одном варианте реализации антитело может считаться предпочтительно связывающим первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с  $k(on)$ , величина которой по меньшей мере на один порядок превышает  $k(on)$  данного антитела для второго эпитопа. В еще одном варианте реализации антитело может считаться предпочтительно связывающим первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с  $k(on)$ , величина которой по меньшей мере на два порядка превышает  $k(on)$  данного антитела для второго эпитопа.

В других примерах антитело может считаться предпочтительно связывающим первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с константой скорости диссоциации (скоростью диссоциации,  $k(off)$ ), меньшей, чем  $k(off)$  данного антитела для второго эпитопа. В одном варианте реализации антитело может считаться предпочтительно связывающим первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с  $k(off)$ , величина которой по меньшей мере на один порядок меньше  $k(off)$  данного антитела для второго эпитопа. В еще одном варианте реализации антитело может считаться предпочтительно связывающим первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с  $k(off)$ , величина которой по меньшей мере на два порядка меньше  $k(off)$  данного антитела для второго эпитопа.

В некоторых способах, которые можно применять в настоящем документе, оценивают конкурентное связывание двух или более антител, как правило, путем оценки способности одного антитела ингибировать связывание одного или более других антител с эпитопом. В некоторых вариантах реализации антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если оно предпочтительно связывается с этим эпитопом с такой эффективностью, что оно в некоторой степени блокирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом. Конкурентное ингибирование можно определять любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью конкурентного твердофазного ИФА. Обычно можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 50%.

Антитела или их антиген-связывающие фрагменты, варианты или производные, описанные в настоящем документе, также можно описывать или указывать с точки зрения их перекрестной реакционной способности. В настоящем документе термин "перекрестная реакционная способность" относится к способности антитела, специфичного по отношению к одному антигену, распознавать второй антиген и связываться с ним. Как правило, наблюдение перекрестной реакционной способности антител принимают за меру родства между двумя (или более) различными антигенными веществами, которые поддерживают такую перекрестную реакционную способность. Таким образом, антитело является перекрестно реагирующим, если оно связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, индуцировавшего его образование.

Следует принимать во внимание, что в определенных контекстах эпитопы также можно упоминать или описывать как перекрестно реагирующие, причем два или более различных эпитопа могут распознаваться и/или связываться конкретным антителом. Перекрестно реагирующий эпитоп обычно содержит многие из тех же дополнительных структурных признаков, что и индуцирующий или исходный эпитоп.

В некоторых обстоятельствах связывание с перекрестно реагирующим эпитопом может характеризоваться большим сродством, чем с исходным эпитопом.

Следует принимать во внимание, что предпочтительными для диагностических целей обычно являются антитела и антигены, обладающие низкой перекрестной реакционной способностью или не обладающие ей.

В настоящем документе подразумевается, что термин "полипептид" охватывает "полипептид" в единственном числе, а также "полипептиды" во множественном числе и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот и не относится к продукту конкретной длины. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены в определение "полипептид", и термин "полипептид" можно использовать вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов.

Термин "полипептид" также предназначен для обозначения продуктов постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, без ограничения, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, модификацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию неприродными аминокислотами. Полипептид можно получить из природного биологического источника или посредством рекомбинантной технологии, но не обязательно путем трансляции указанной нуклеотидной последовательности. Его можно получить любым способом, в том числе путем химического синтеза.

Размер полипептида согласно настоящему изобретению может составлять приблизительно 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или больше, 1000 или более или 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут характеризоваться определенной трехмерной структурой, хотя они не обязательно обладают такой структурой. Термин "гликопротеин" относится к белку, связанному по меньшей мере с одним углеводным фрагментом, который присоединен к белку через кислородсодержащую или азотсодержащую боковую цепь аминокислотного остатка, например, остатка серина или остатка аспарагина.

Под "выделенным" полипептидом или его фрагментом, вариантом или производным подразумевается полипептид, который не находится в своем естественном окружении. Никакого особого уровня очистки не требуется. Например, выделенный полипептид можно извлечь из его нативной или природной среды. Для целей изобретения рекомбинантно продуцируемые полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считаются выделенными, как и нативные или рекомбинантные полипептиды, отделенные, фракционированные или частично или в значительной степени очищенные любым подходящим способом.

Кроме того, полипептиды согласно настоящему изобретению включают фрагменты, производные, аналоги или варианты вышеупомянутых полипептидов и любые их комбинации. Термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог" при ссылке на антитела или полипептиды антител согласно настоящему изобретению включают любые полипептиды, сохраняющие по меньшей мере некоторые антиген-связывающие свойства соответствующей нативной связывающей молекулы, антитела или полипептида. Фрагменты полипептидов согласно настоящему изобретению включают протеолитические фрагменты, а также делеционные фрагменты. Варианты полипептидов включают фрагменты, описанные выше, а также полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями вследствие аминокислотных замен, делеций или инсерций. Варианты могут возникать естественным путем или не встречаться в природе. Не встречающиеся в природе варианты можно получить с использованием известных в данной области техники способов мутагенеза. Вариантные полипептиды могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеций или добавления. Кроме того, в настоящем документе вариантные полипептиды могут также называться "аналогами полипептидов". В настоящем документе производные полипептидов рассматриваются как полипептиды, которые за счет модификаций приобрели дополнительные свойства, не характерные для нативного полипептида. Примеры включают гибридные белки или функционально модифицированные полипептиды, например, ПЭГилированные полипептиды, полипептиды, связанные с гранулами, и полипептиды, ковалентно связанные с одним или более другими агентами или соединениями. В одном варианте реализации "производное" полипептида относится к рассматриваемому полипептиду, содержащему один или более остатков, химически модифицированных в результате реакции функциональной боковой группы. "Производные" также включают пептиды, содержащие одно или более из природных производных двадцати стандартных аминокислот. Например, 4-гидроксипролин может заменять пролин; 5-гидроксилизин может заменять лизин; 3-метилгистидин может заменять гистидин; гомосерин может заменять серин; а орнитин может заменять лизин.

В одном варианте реализации аналоги специфически выявленных полипептидов могут характеризоваться приблизительно 70% идентичностью последовательности по сравнению с последовательностью указанного полипептида, например, аминокислотной последовательностью, продоместрированной на фигурах, или ее фрагментами, например, последовательностью из 10 или более смежных аминокислот, т.е. 70% остатков каждого полипептида совпадают. В дополнительном варианте реализации аналоги

специфически выявленных полипептидов могут характеризоваться идентичностью более 75%. В дополнительном варианте реализации аналоги специфически выявленных полипептидов могут характеризоваться идентичностью более 80%. В дополнительном варианте реализации аналоги специфически выявленных полипептидов могут характеризоваться идентичностью более 85%. В дополнительном варианте реализации аналоги специфически выявленных полипептидов могут характеризоваться идентичностью более 90%. В дополнительном варианте реализации аналоги специфически выявленных полипептидов могут характеризоваться идентичностью более 95%. В дополнительном варианте реализации аналоги специфически выявленных полипептидов могут характеризоваться идентичностью более 99%. В дополнительном варианте реализации аналоги полипептидов согласно настоящему изобретению могут содержать менее приблизительно 20, например, менее 10 аминокислотных замен, модификаций или делеций по сравнению с последовательностью указанного полипептида.

В дополнительном варианте реализации полипептиды могут характеризоваться гомологией более 70%. В дополнительном варианте реализации полипептиды могут характеризоваться гомологией более 75%. В дополнительном варианте реализации полипептиды могут характеризоваться гомологией более 80%. В дополнительном варианте реализации полипептиды могут характеризоваться гомологией более 85%. В дополнительном варианте реализации полипептиды могут характеризоваться гомологией более 90%. В дополнительном варианте реализации полипептиды могут характеризоваться гомологией более 95%. В дополнительном варианте реализации полипептиды могут характеризоваться гомологией более 99%. В дополнительном варианте реализации производные и аналоги полипептидов согласно настоящему изобретению могут содержать менее приблизительно 20, более предпочтительно, менее 10 аминокислотных замен, модификаций или делеций. Предпочтительными заменами являются замены, известные в данной области техники как консервативные, т.е. замещенные остатки обладают общими физическими или химическими свойствами, например, гидрофобностью, размером, зарядом или функциональными группами.

Кроме того, рассматриваются аналоги полипептидов, обладающие определенной степенью идентичности в диапазоне указанного количества смежных аминокислотных остатков. Например, аналог указанного полипептида в одном варианте реализации характеризуется более чем 90% идентичностью аминокислотной последовательности в диапазоне 10 или более смежных аминокислот эталонной/указанной последовательности. В еще одном варианте реализации аналог указанного полипептида характеризуется более чем 90% идентичностью аминокислотной последовательности в диапазоне 20 или более смежных аминокислот эталонной/указанной последовательности.

Термин "полинуклеотид" предназначен для охвата нуклеиновой кислоты в единственном числе, а также нуклеиновых кислот во множественном числе, и относится к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты или нуклеотидному конструкту, включая, например, матричную РНК (мРНК) или плазмидную ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать обычную фосфодиэфирную связь или нетрадиционную связь (например, амидную связь, например, в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" относится к любому одному или нескольким нуклеотидным сегментам, например, фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде. Под "выделенной" нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, извлеченная из своего естественного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий антитело или антиген, содержащийся в векторе, считается выделенным для целей настоящего изобретения. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, содержащиеся в гетерологичных клетках-хозяевах или очищенные (частично или по существу) полинуклеотиды в растворе. Выделенные молекулы РНК включают РНК-транскрипты полинуклеотидов *in vivo* или *in vitro*, описанные в настоящем документе. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, дополнительно включают такие молекулы, полученные синтетическим путем. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота могут представлять собой или могут содержать регуляторный элемент, например, промотор, сайт связывания рибосом или терминатор транскрипции.

В настоящем документе термин "образец" относится к любому биологическому материалу, полученному от субъекта или пациента, хотя следует принимать во внимание, что в большинстве описанных в настоящем документе вариантов реализации (например, способов) следует отдавать предпочтение образцам, в которых могут присутствовать одно или более из антител. В одном варианте реализации образец может содержать кровь, плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость ("ЦСЖ") или мочу. Например, образец может содержать цельную кровь, плазму, В-клетки, полученные путем обогащения из образцов крови, или культивируемые клетки (например, В-клетки от субъекта). Образец также может включать образец биоптата или ткани, в том числе слизистой или нервной ткани. В других вариантах реализации образец может содержать целые клетки и/или лизат клеток. Способы сбора и/или получения образцов хорошо известны в данной области техники.

Под "субъектом", "индивидом", "животным", "пациентом" или "млекопитающим" подразумевается любой субъект, в частности субъект-млекопитающее, например, пациент-человек, для которого желательны диагноз, прогноз, профилактика или терапия.

В настоящем документе термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предохранительным мерам, целью которых является предотвраще-

ние или замедление (уменьшение) нежелательных физиологических изменений или расстройств, например, развития или прогрессирования ревматизма или APSGN. Благоприятные или желательные клинические результаты включают ослабление симптомов, снижение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния, клиренс патогенного организма и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемые или не обнаруживаемые, но не ограничиваются ими. "Лечение" также может означать увеличение выживаемости по сравнению с прогнозируемой выживаемостью в отсутствие лечения. "Нуждающиеся в лечении" включают индивидов с указанным состоянием или расстройством, а также индивидов, склонных к этому состоянию или расстройству, или индивидов, у которых необходимо предотвратить проявление этого состояния или расстройства.

В некоторых вариантах реализации антигена, описанные в настоящем документе, применяют для количественного или качественного обнаружения антител, специфичных по отношению к *Streptococcus ruogenes*, в образце. Этого можно достичь с помощью способов, позволяющих получать визуально обнаружимый сигнал, который может представлять собой любой вариант из флуоресценции (иммунофлуоресценции), хромогенного продукта ферментативной реакции, образования осадка, хемиллюминесценции или биоллюминесценции. Некоторые варианты реализации используют антитело с флуоресцентной или цветной меткой в комбинации со световой микроскопией, проточной цитометрией или флуориметрическим обнаружением. Другие методики и метки, которые можно использовать для обнаружения антитела, включают коллоидное золото, радиоактивную метку, GFP (зеленый флуоресцентный белок) и т.п., авидин/стрептавидин-биотин, магнитные гранулы, а также физические системы, например, нанотехнологическую систему, чувствительную к факту связывания, но не ограничиваются ими.

Антигены, антитела или их фрагменты можно применять при гистологическом окрашивании, например, при иммуногистохимии, иммунофлуоресцентной или иммуноэлектронной микроскопии, а также для обнаружения антител или белков *in situ*. Для специалистов в данной области техники очевидно, что любой из широкого спектра гистологических способов, например, процедур окрашивания, можно модифицировать для достижения такого обнаружения *in situ*.

Одним из способов, которыми можно метить и непосредственно обнаруживать антитело или антиген, описанные в настоящем документе, является их связывание с ферментом и использование в иммуноферментном анализе (ИФА). Этот фермент, в свою очередь, при последующем воздействии соответствующего субстрата реагирует с этим субстратом таким образом, что образуется химическая группа, которую можно обнаружить, например, спектрофотометрическим, флуориметрическим или визуальным путем. Ферменты, которые можно использовать для обнаружимого мечения антитела или антигена, включают малатдегидрогеназу, стафилококковую нуклеазу, дельта-5-стероидизомеразу, дрожжевую алкогольдегидрогеназу, альфа-глицерофосфатдегидрогеназу, триозофосфатизомеразу, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, аспарагиназу, глюкозооксидазу, бета-галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетилхолинэстеразу, но не ограничиваются ими. Обнаружение можно выполнять колориметрическими способами, в которых используется хромогенный субстрат фермента. В некоторых вариантах реализации обнаружение осуществляют путем визуального сравнения степени ферментативной реакции субстрата с аналогично полученными стандартами, и эта процедура подходит как для растворимых цветных продуктов, так и для нерастворимых цветных продуктов, в том числе, например, применяемых на нитроцеллюлозных или пластмассовых подложках, в тест-полосках и т.п.).

В некоторых вариантах реализации обнаружению реакции антитела с антигеном может в соответствующих случаях дополнительно способствовать применение вторичного антитела или другого партнера по связыванию, который связывает комплекс "антиген:антитело" (реагируя с антигеном или, чаще, антителом). Как правило, это вторичное антитело или лиганд является обнаружимо меченым, причем обнаружение вторичного антитела позволяет сделать вывод о присутствии комплекса "антиген:антитело".

Партнеры по специфичному связыванию, например, вторичные антитела, часто реагируют с консервативной областью иммуноглобулина, характерного для вида животного, из которого получен образец. В подробно рассмотренных в настоящем документе примерах вторичное антитело или партнер по специфичному связыванию обладает сродством к иммуноглобулинам человека, например, IgG. Выбор вторичного антитела по меньшей мере частично зависит от источника образца и, следовательно, от природы антител, которые, согласно ожиданиям, должны присутствовать в нем.

Ряд хорошо известных способов обнаружения пригодны для применения при реализации способов, описанных в настоящем документе. Например, для обнаружения специфичных антител легко адаптировать иммуноферментный анализ, например, иммунофлуоресцентный анализ (IFA), фотометрический анализ, твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА), анализ ELISPOT и иммунолоттинг.

Другие системы обнаружения, которые также можно применять, включают системы, основанные на использовании белка А, полученного из штамма *Staphylococcus aureus* Cowan I, белка G *Streptococcus* группы С (например, штамма 26RP66), или систем, в которых используется реакция связывания биотин-авидин.

Другими способами иммуноферментного обнаружения, в которых можно применять описанные в

настоящем документе антигены и антитела, являются вестерн-блоттинг и дот-блоттинг, при которых реагент отделяют электрофорезом и переносят на нитроцеллюлозную мембрану или другую подходящую подложку. Затем в контакт с мембраной приводят исследуемый образец (например, плазму), и обнаруживают присутствие образовавшихся иммунных комплексов уже описанным способом. В одном из вариантов этого способа очищенный антиген наносят на мембрану в виде линий или пятен и позволяют ему связываться с антителами, присутствующими в образце, а образовавшиеся иммунные комплексы обнаруживают с использованием методик, описанных в настоящем документе.

Присутствие комплексов "антитело:антиген" также можно обнаруживать с помощью агглютинации. В одном типичном примере такого способа антигены, описанные в настоящем документе, применяют для покрытия, например, частиц латекса с образованием однородной суспензии. При смешивании с образцом, например, сывороткой, содержащей специфичные антитела, способные распознавать антигены, частицы латекса агглютинируют, и визуально можно обнаружить наличие крупных агрегатов.

Обнаружению реакции антитела с антигеном может способствовать применение антитела или лиганда, меченого обнаружимой группой способами, известными в данной области техники.

Такая обнаружимая группа обеспечивает визуальное обнаружение осадка или изменения цвета, визуальное обнаружение с помощью микроскопии или автоматическое обнаружение с помощью спектрометрии или радиометрического измерения и т.п. Примеры обнаружимых групп включают флуоресцеин и родамин (для флуоресцентной микроскопии), пероксидазу хрена и щелочную фосфатазу (для световой микроскопии или электронной микроскопии и биохимического обнаружения и для биохимического обнаружения по изменению цвета) и биотин-стрептавидин (для световой или электронной микроскопии). Используемые способы обнаружения и группы можно выбрать, например, из вышеприведенного списка или других подходящих примеров по стандартным критериям, применяемым к таким выборкам, которые хорошо известны в данной области техники.

Хотя способы, основанные на радиоизотопах, в настоящее время, как правило, считаются менее предпочтительными, чем ранее, имеются способы обнаружения радиоактивных веществ, которые осуществляют обнаружение путем радиоактивного мечения антигенов, антител или фрагментов антител и использования радиоиммуноанализа (РИА). Радиоактивный изотоп можно обнаружить с помощью таких средств, как использование гамма/бета-счетчика или сцинтилляционного счетчика или автордиографии.

Более распространенные способы включают мечение антитела или антигена, подлежащего обнаружению, нерадиоактивными обнаружимыми метками, например, флуоресцентным соединением. После воздействия света соответствующей длины волны на флуоресцентно меченное антитело или антиген можно обнаружить его присутствие по флуоресценции. В число наиболее часто используемых флуоресцентных меченых соединений входят изотиоцианат флуоресцеина, родамин, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталальдегид и флуорескамин.

Антитело или антиген также можно обнаружимо метить, используя металлы, испускающие флуоресцентное излучение, например,  $^{152}\text{Eu}$  или другие элементы ряда лантаноидов. Эти металлы можно присоединять к антителу или антигену с использованием таких металлохелатных групп, как диэтилентриаминпентауксусная кислота (ЭТПА).

Антитело или антиген также можно обнаружимо метить, связав его с хемилюминесцентным соединением. Затем определяют присутствие антитела или антигена с хемилюминесцентной меткой путем обнаружения люминесценции, возникающей во время химической реакции. Примерами соединений, особенно пригодных в качестве хемилюминесцентной метки, являются люминол, изолюминол, ароматический сложный эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и сложный эфир оксалата.

Аналогично, для мечения антитела или антигена можно использовать биоломинесцентное соединение. Биоломинесценция происходит в биологических системах, как правило, благодаря активности каталитического белка, который увеличивает эффективность хемилюминесцентной реакции. Присутствие данного биоломинесцентного белка определяют путем обнаружения люминесценции. Важными биоломинесцентными соединениями для целей мечения являются люциферин, люцифераза и экворин.

Конкретные примеры способов обнаружения антител в биологических образцах, включая способы, использующие тест-полоски или другие иммобилизованные аналитические устройства, описаны, например, в следующих патентах: патенте США № 5965356 (специфичный серологический анализ вируса простого герпеса); патенте США № 6114179 (способ и набор для обнаружения антигенов и/или антител); патенте США № 6077681 (диагностика двигательной невропатии по обнаружению антител); патенте США № 6057907 (маркер для патологий, включающий аутоиммунную реакцию и/или для воспалительных заболеваний); и патенте США № 5552285 (способы иммуноанализа, композиции и наборы для обнаружения антител к окисленным основаниям ДНК).

В качестве примера, для обнаружения одного или более антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам *Streptococcus pyogenes* в биологических жидкостях (например, образце крови или сыворотке субъекта) можно применять микросферный анализ (также называемый анализом на гранулах в потоке). Эта технология, представленная системами, разработанными Lumindex Corporation и другими системами, разработанными Becton Dickinson, позволяет обрабатывать очень небольшое количество образца, обычно 20 мкл, для обнаружения одного или более анализируемых соединений. Принцип



этого анализа основан на соединении захватывающего антитела с микросферами, содержащими определенные количества красного красителя и инфракрасного красителя. После инкубирования этих микросфер с образцом вторичного детекторного антитела, связанного с фикоэртрином (PE), гранулы анализируют с помощью проточного цитометра. Один лазер обнаруживает гранулы, а второй - интенсивность PE, связанного с этими гранулами. Эту технологию используют для обнаружения многих биологически важных молекул или агентов, в том числе цитокинов в многоканальных анализах, серотипирования *Streptococcus pneumoniae*, одновременного измерения хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и альфа-фетопротеина (АФП), одновременного обнаружения сывороточного IgG против *Toxoplasma gondii*, вируса краснухи, цитомегаловируса и вируса простого герпеса 1 и 2 типов (см. технические примечания, полученные от Luminex Corp., например, на их веб-сайте или в их каталоге).

В некоторых вариантах реализации одно или более из антител, специфичных по отношению к одному или более из антигенов *Streptococcus pyogenes*, присутствующих в биологическом образце, связываются с антигенным белком, связанным с микросферами. В некоторых вариантах реализации вторичное детекторное антитело (пример того, что в настоящем документе также называют партнером по специфичному связыванию) представляет собой моноклональное антитело, например, против IgG человека. В других вариантах реализации вторичное детекторное антитело представляет собой поликлональное антитело, например, против IgG человека. Вторичные антитела, используемые в таких способах, можно связать, например, с биотином, или обнаружимо метить иным образом.

Иммунологические способы, подходящие для вариантов применения, рассматриваемых в настоящем документе, включают иммунологические способы, основанные на образовании комплексов "антитело:антиген", например, с использованием меченых антител или фрагментов антител, включая меченые вторичные антитела. Типичные способы включают в себя способы на основе твердофазного ИФА, например, непрямой твердофазный ИФА, конкурентный твердофазный ИФА, твердофазный сэндвич-ИФА, в дополнение к другим иммунологическим способам, агентам или аппаратам, например, иммунохроматографическим полоскам, флуоресцентным иммуномикрочастицам, вестерн-блоттингу, биосенсорам на основе электрохимических реакций, катализируемых ферментами, присоединенными к антителам, магнитным частицам, покрытым антителами, поверхностным плазмонным резонансом и другими методиками, в которых обнаруживают анализируемое соединение, связанное с антителом. Существуют различные способы и технологии для реализации этих способов; они хорошо известны специалистам в данной области техники и могут включать микрожидкостные технологии, автоматизированные и/или высокопроизводительные технологии.

Подходящие анализы могут представлять собой количественные методики, например, твердофазный ИФА, или качественные методики, например, быстрый иммунохроматографический анализ, иммуноблоттинг, тест-полоски и т.п. Следует принимать во внимание, что анализы, обычно используемые в качестве количественных анализов, при определенных обстоятельствах можно использовать как качественные.

Качественные, необязательно быстрые анализы, например, иммунохроматографический анализ, особенно с использованием иммунохроматографических полосок, особенно подходят для использования в областях, где недоступны или нецелесообразны более сложные аналитические технологии, например, в развивающихся странах, или в качестве средств диагностики первой линии для выявления субъектов, которым может быть полезна дальнейшая оценка.

Например, в одном варианте реализации качественного анализа, позволяющем определять присутствие или количество одного или более из антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам *Streptococcus pyogenes*, большее или меньшее определенное количество, используют качественный твердофазный ИФА с использованием двух или более антигенов, описанных в настоящем документе. Эту процедуру выполняют с помощью набора, описанного в настоящем документе, например, набора, содержащего композицию, например, буферный раствор или растворы для получения образца, содержащего один или более из антигенов *Streptococcus pyogenes*, необязательно отрицательный контроль, не содержащий антител, специфичных по отношению к антигену *Streptococcus pyogenes*, необязательно положительный контроль, содержащий одно или более антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам *Streptococcus pyogenes*, и компоненты твердофазного ИФА, например, реакционный сосуд, например, многоруночный планшет, и одно или более из вторичных детекторных антител для обнаружения образования комплекса между одним или более антителами, специфичными по отношению к одному или более антигенам *Streptococcus pyogenes*, и одним или более антигенами *Streptococcus pyogenes*, и, необязательно, один или более компонентов для иммобилизации комплекса и/или для проявления анализа. В одном варианте реализации композицию, содержащую один или более из антигенов *Streptococcus pyogenes*, сначала вводят в реакционный сосуд, например, планшет для твердофазного ИФА, в условиях иммобилизации одного или более антигенов на сосуде. В еще одном варианте реализации реакционный сосуд, например, планшет для твердофазного ИФА, снабжен одним или более антигенами *Streptococcus pyogenes*, уже иммобилизованными на нем. В еще одном подробно рассматриваемом примере одно или более из вторичных антител для обнаружения либо уже иммобилизованы на или в реакционном сосуде, либо содержатся в композиции и вводятся в реакционный сосуд в условиях для им-

мобилизации детекторных антител в нем. Специалисты в данной области техники должны понимать, что существуют различные альтернативные способы, в соответствии с которыми образование, захват и мечение комплекса, зависящего от анализируемого соединения, обеспечивают обнаружимый сигнал, и что возможность обнаружения в этих способах обычно зависит от иммобилизации комплекса "антитело:антиген".

В еще одном варианте реализации качественного анализа, при котором определяют наличие одного или более антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам *Streptococcus pyogenes*, или при котором определяют, является ли количество указанных антител большим или меньшим определенного порога, используют иммунохроматографические тест-полоски. В одном примере указанная полоска содержит два или более из антигенов, описанных в настоящем документе, и, как правило, снабжена одной или более композициями, например, буферным раствором или растворами для получения образца, необязательно отрицательным контролем, не содержащим антител к антигену *Streptococcus pyogenes*, необязательно положительным контролем, содержащим одно или более антител, специфичных по отношению к одному или более антигенам, партнером по специфичному связыванию для обнаружения образования комплекса между одним или более антителами, специфичными по отношению к одному или более антигенам *Streptococcus pyogenes*, одним или более антигенами *Streptococcus pyogenes* и, необязательно, одним или более компонентами для проявления анализа. В одном примере в качестве отрицательного контроля предложена отдельная иммунохроматографическая полоска, в которой отсутствуют антигены *Streptococcus pyogenes*. В других вариантах реализации одна или более из иммунохроматографических полосок содержат по меньшей мере две различные области, одна из которых содержит один или более антигенов *Streptococcus pyogenes*, а другая необязательно не содержит антигенов *Streptococcus pyogenes*, и необязательно содержит одно или более из иммобилизованных антител или других агентов, способных связываться со вторичным детекторным антителом или партнером по специфичному связыванию, и, таким образом, действует в качестве области положительного контроля.

В одном конкретном варианте реализации обнаружение осуществляют посредством твердофазного ИФА с захватом. Твердофазный ИФА с захватом (также известный как твердофазный "сэндвич"-ИФА) является чувствительным анализом для количественного определения очень малых (от пикограммов до микрограммов) количеств веществ (например, гормонов, клеточных сигнальных соединений, антигенов возбудителей инфекционных заболеваний и цитокинов, а также, в контексте настоящего изобретения, антител). Этот тип твердофазного ИФА обычно рассматривают, когда анализируемое вещество может быть слишком разбавленным для связывания с материалом носителя, например, полистирольным титрационным микропланшетом (например, белок в супернатанте клеточной культуры), или плохо связывается с пластмассами (например, низкомолекулярное органическое соединение). Оптимальные степени разбавления захватывающего реагента (например, захватывающего антигена), образцов, контролей и детекторных антител, а также время инкубирования, как правило, определяют опытным путем, что может требовать интенсивного титрования. В идеале можно использовать меченное ферментом детекторное антитело или детекторный антиген. Однако если детекторное антитело или антиген не содержат метки, вторичное антитело не должно перекрестно реагировать с иммобилизованным антителом или антигеном.

В настоящем документе термины "обнаружимая группа", "обнаружимая метка" и их грамматические эквиваленты относятся к любому атому, молекуле или ее фрагменту, реагенту или агенту, наличие, отсутствие или уровень которых можно непосредственно или косвенно отслеживать. Один из примеров включает радиоактивные изотопы. Другие примеры включают (i) ферменты, которые могут катализировать цветовые или светоизлучающие (люминесцентные) реакции, и (ii) флуорофоры. Обнаружение снаружи мой группы можно осуществлять непосредственно при условии, что обнаружимая группа является обнаружимой сама по себе, как, например, в случае флуорофоров. В качестве альтернативы, обнаружение обнаружимой группы можно осуществлять косвенно. В последнем случае обычно используют вторую группу, которая реагирует с обнаружимой группой, причем она сама по себе является непосредственно обнаружимой. Обнаружимая группа может входить в состав антитела или меченого антигена, например, присоединяться к ним ковалентной связью. Например, в качестве косвенно обнаружимой группы, с которой может специфично связываться вторичное антитело, содержащее непосредственно обнаружимую группу, можно использовать константную область антитела.

Таким образом, вторичные антитела являются особенно подходящими средствами для обнаружения антител в способах, описанных в настоящем документе. Это вторичное антитело само может быть конъюгировано с обнаружимой группой. Одним из способов, которыми можно обнаружимо метить антитело в соответствии с настоящим изобретением, является его связывание с ферментом. Этот фермент, в свою очередь, при последующем воздействии соответствующего субстрата реагирует с этим субстратом таким образом, что образуется химическая группа, которую можно обнаружить, например, спектрофотометрическим, флуорометрическим или визуальным путем. Ферменты, которые можно использовать для обнаружимо мечения антитела, включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, малатдегидрогеназу, стафилококковую нуклеазу, дельта-5-стероидизомеразу, дрожжевую алкогольдегидрогеназу, альфа-глицерофосфатдегидрогеназу, триозофосфатизомеразу, аспарагиназу, глюкозооксидазу, бета-галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетил-

холинэстеразу, но не ограничиваются ими.

Обнаружение можно выполнять колориметрическими способами, в которых используется хромогенный субстрат фермента. Обнаружение также может достигаться путем визуального сравнения степени ферментативной реакции субстрата по сравнению с аналогично полученными стандартами.

В вариантах реализации (например, способов, анализов и наборов), в которых используется твердая подложка, с которой связан реагент, например, в соответствующих случаях, антиген или антитело, твердая подложка представляет собой любую нерастворимую в воде, не поддающуюся воздействию воды твердую подложку. Примеры подходящей твердой подложки включают гранулы, например, из полистирола, фильтровальную бумагу, пробирки, тест-полоски и титрационные микропланшеты. Связанный реагент может быть связан с твердой подложкой ковалентными связями или путем адсорбции. Преимущество применения твердой подложки состоит в том, что для разделения твердой и жидкой фазы не требуется стадия центрифугирования, хотя в конкретных вариантах реализации, например, в анализах на основе гранул, для облегчения обработки можно использовать центрифугирование.

Вышеупомянутая твердая подложка может включать полимеры, например, полистирол, агарозу, сефарозу, целлюлозу, стеклянные гранулы и намагничиваемые частицы целлюлозы или других полимеров. Твердая подложка может принимать форму больших или маленьких гранул или частиц, трубок, пластин, полосок или другую форму.

В качестве твердой подложки обычно используют пробирку или титрационный микропланшет, внутренние стенки которых покрыты первым антителом или антигеном, например, антигенами, специфичными по отношению к обнаруживаемым антителам против *Streptococcus pyogenes*, или их фрагментами или производными, например, конкретными антигенами, описанными в настоящем документе.

Кроме того, предложен набор, содержащий один или более компонентов, необходимых для выполнения одного или более способов, описанных в настоящем документе. Указанный набор обычно содержит композицию, содержащую по меньшей мере один из антигенов *Streptococcus pyogenes*, описанных в настоящем документе, например, композицию, содержащую два или более из указанных антигенов. В набор можно включать другие компоненты для выполнения способа в соответствии с настоящим изобретением. Например, набор может содержать один или более из реагентов для создания среды, благоприятной для контакта одного или более антигенов с биологическим образцом. Набор также может содержать оборудование для сбора образцов, например, тампон-зонд, пипетку или аналогичные средства для сбора, и оборудование для выполнения одной или более стадий реакции, во время которых реагенты вступают в контакт, например, средства инкубирования, включающие жидкость или полужидкий носитель, помещенный на пластину, в пробирку, на стеклянную или пластмассовую поверхность, в лунку или на полоску из впитывающей бумаги, или аналогичные средства. Другие компоненты набора могут включать один или более из реагентов, позволяющих обнаруживать комплекс, образованный между одним или более антигенами и одним или более антителами, специфичными по отношению к антигену *Streptococcus pyogenes*, присутствующими в биологическом образце.

Способы, анализы и наборы, рассматриваемые в настоящем документе, могут в определенных вариантах реализации включать или использовать контакт одного или более образцов с другими реагентами для анализа (например, одним или более из антигенов *Streptococcus pyogenes*) с реагентами, расположенными в матрице, что, например, позволяет выполнять быструю обработку нескольких образцов, включая высокопроизводительные варианты реализации.

В настоящем документе термин "матрица" относится к "адресуемому" пространственному расположению распознающего(их) агента(ов), например, комбинации двух или более антигенов *Streptococcus pyogenes*. Каждый "адрес" матрицы является заранее определенной конкретной пространственной областью, содержащей один или более из распознающих агентов. Например, матрица может представлять собой множество сосудов (пробирок), планшетов, микролунок в микропланшете, каждая из которых содержит набор антигенов. Предусмотрены различные варианты реализации матриц. В одном варианте реализации каждый адрес содержит аналогичные или идентичные распознающие агенты, и происходит анализ нескольких образцов, по одному на каждый адрес. В еще одном варианте реализации каждый адрес содержит свой распознающий агент или свою комбинацию распознающих агентов, и в каждый адрес вводят аликвоты одного образца. В других вариантах реализации используют комбинацию этих подходов. Матрица также может представлять собой любую твердую подложку, несущую в отдельных областях (точках, линиях, столбцах) известные распознающие агенты, например, когда различные распознающие агенты располагаются в различных комбинациях в одном или более различных местоположениях, или когда различные образцы приводят в контакт в различных местоположениях. В некоторых вариантах реализации матрица включает встроенные соответствующие контроли, например, области без образца, области без антигена, области без образца и антигена (например, содержащие только растворитель и реагенты) и области, содержащие синтетические или выделенные антитела, связанные с один или более антигенами, в качестве положительного контроля.

Твердые подложки, используемые в настоящем документе, например, для матрицы или набора, обычно практически нерастворимы в жидких фазах. Твердые подложки согласно настоящему изобретению не ограничиваются конкретным типом подложки. Напротив, существует большое количество под-

ложек, и они известны специалистам в данной области техники. Таким образом, пригодные для применения твердые подложки включают твердые и полужидкие матрицы, например, аэрогели и гидрогели, смолы, гранулы, биочипы (включая биочипы с тонкопленочным покрытием), микрожидкостной чип, кремниевый чип, многолуночные планшеты (также называемые титрационными микропланшетами или микропланшетами), мембраны, фильтры, проводящие и непроводящие металлы, стекло (включая предметные стекла микроскопа) и магнитные подложки. Более конкретные примеры пригодных для применения твердых подложек включают силикагели, полимерные мембраны, частицы, модифицированные пластмассовые пленки, стеклянные гранулы, вату, пластмассовые гранулы, гели оксида алюминия, полисахариды, например, сефарозу, нейлон, латексные гранулы, магнитные гранулы, парамагнитные гранулы, суперпарамагнитные гранулы, крахмал и т.п.

#### Антигены.

Следует принимать во внимание, что в способах, описанных в настоящем документе, и, в частности, в многоканальных способах, описанных в настоящем документе, в принципе можно использовать любой антиген *Streptococcus pyogenes*, к которому у субъекта генерируются антитела *in vivo*. Как показано в разделе "Примеры" настоящего документа, клинически установленные антигены ДНКазы В и SLO можно перекрестно присоединять к гранулам для использования в многоканальном СВА-анализе. Авторы настоящей заявки установили, что в определенных случаях, безотносительно к теоретическим представлениям, определенные антигены, например SpnA, можно эффективно стабилизировать для облегчения их включения в многоканальные анализы, описанные в настоящем документе. В случае SpnA укорачивание полноразмерного полипептида улучшало иммунологическую стабильность, особенно при перекрестном присоединении или ином связывании с твердой подложкой (в данном случае гранулами), применяемой в вариантах реализации способов, описанных в настоящем документе.

В одном варианте реализации используют два или более, и в подробно рассматриваемых примерах - три или более антигена *Streptococcus pyogenes*, например, в одном многоканальном анализе. В одном примере каждый антиген связан с гранулами или другой подложкой, причем каждая популяция гранул, связанных с антигеном, отличается от других популяций. Один пример такого многоканального анализа представлен в разделе "Примеры" настоящего документа, где каждый из антигенов SLO, ДНКазы В и SpnA ковалентно связан со своей популяцией гранул, так что каждую популяцию гранул, меченых антигеном, можно выявлять по отдельности, и, как следствие, в одном анализе можно определить количество антитела, специфичного по отношению к каждому антигену.

В некоторых вариантах реализации предложены два или более антигена *Streptococcus pyogenes* в составе одной композиции, например, в одном растворе, содержащем любые необходимые буферы или носители, стабилизаторы и т.п., например, при приведении в контакт с образцом, что, таким образом, особенно подходит для многоканального варианта реализации. В одном примере предложен антиген SpnA *Streptococcus pyogenes* вместе с по меньшей мере одним из других антигенов *Streptococcus pyogenes*, например, SpnA и по меньшей мере один из других антигенов *Streptococcus pyogenes* в составе одной композиции, например, при контакте с образцом. В подробно рассматриваемом примере предложены антиген SpnA и SLO *Streptococcus pyogenes*, например, в составе одной композиции, например, при приведении их в контакт с образцом. В другом подробно рассматриваемом примере предложены антиген SpnA и ДНКазы В *Streptococcus pyogenes*, например, в составе одной композиции, например, при приведении их в контакт с образцом. В еще одном подробно рассматриваемом примере предложены антигены SpnA, ДНКазы В и SLO *Streptococcus pyogenes*, например, в составе одной композиции, например, при приведении их в контакт с образцом.

SLO (AAK33267.1) представляет собой секретлируемый порообразующий цитолизин. В одном варианте реализации SLO получают из GAS *Streptococcus pyogenes* M1 (штамм: SF370, серотип: M1, метка генного локуса: SPy\_0167 (NCBI: NP\_268546.1)). В одном примере используют рекомбинантный фрагмент SLO, например, рекомбинантный полипептид, содержащий аминокислоты 34-571 (см. фиг. 6A, SEQ ID NO: 1). В одном примере рекомбинантный полипептид метят, например, для облегчения очистки, и в особенности рассматривают возможность использования N-концевых или C-концевых His-меток. В еще одном варианте реализации используют "детоксифицированный" аналог SLO, в котором одна или более аминокислот, определенных как способствующие токсичности, заменяют другими аминокислотами, что приводит к получению полипептида, который иммунологически перекрестно реагирует с SLO дикого типа, но проявляет пониженную токсичность (например, для устранения ограничений или требований к производству, обращению или изоляции). Аминокислотная последовательность типичного примера детоксифицированного аналога SLO представлена на фиг. 6B и в SEQ ID NO: 2. В этом примере детоксифицированного SLO две точечные мутации в кодирующей нуклеотидной последовательности приводят к заменам P427L и W535F: замещенные аминокислоты подчеркнуты на фиг. 6A и 6B.

ДНКазы В (AAK34710.1) является секретлируемым ферментом, который разрушает ДНК. В одном варианте реализации ДНКазы В получают из GAS *Streptococcus pyogenes* M1 (штамм: SF370, серотип: M1, метка генного локуса: SPy\_2043 (NCBI: NP\_269989.1)). В одном примере используют рекомбинантный фрагмент ДНКазы В, например, рекомбинантный полипептид, содержащий аминокислоты 43-271 (см. фиг. 7, SEQ ID NO: 5). В одном примере рекомбинантный полипептид метят, например, для облег-

чения очистки, и в особенности рассматривают возможность использования N-концевых или C-концевых His-меток.

SpnA (AAK33693.1) представляет собой прикрепленный к клеточной стенке фермент, который также разрушает ДНК. В одном варианте реализации SpnA получают из GAS *Streptococcus pyogenes* M1 (штамм: SF370, серотип: M1, метка генного локуса: SPy\_0747 (NCBI: NP\_268972.1)). В одном примере используют рекомбинантный фрагмент SpnA, например, рекомбинантный полипептид, содержащий аминокислоты 28 - 854 (см. фиг. 8, SEQ ID NO: 8). В одном примере рекомбинантный полипептид метят, например, для облегчения очистки, и в особенности рассматривают возможность использования N-концевых или C-концевых His-меток.

Специалисты в данной области техники должны понимать, что в определенных вариантах реализации изобретение, описанное в настоящем документе, включая способы, полипептиды, гранулы, композиции и наборы, описанные в настоящем документе, и, в частности, варианты реализации, относящиеся к многоканальным способам диагностики и композициям, описанным в настоящем документе, обеспечивает точную и быструю диагностику и/или выявление пациентов, которым требуется лечение недавно возникшего ревматизма или острого PSGN или острой инфекции *Streptococcus pyogenes*, но которым не требуется длительное лечение, включая длительное профилактическое лечение ревматизма, PSGN или персистирующей инфекции *Streptococcus pyogenes*, или требуется только постоянный мониторинг, например, для быстрого выявления последующей инфекции *Streptococcus pyogenes*.

В различных вариантах реализации, например, при использовании способа, описанного в настоящем документе, выявляют пациента, подвергающегося или недавно подвергшегося воздействию *Streptococcus pyogenes*, или недавно перенесшего инфекцию *Streptococcus pyogenes*; указанный пациент подлежит как лечению, подходящему для лечения недавней инфекции *Streptococcus pyogenes*, так и текущему лечению, например, профилактическому лечению для предотвращения последующей инфекции *Streptococcus pyogenes* или для ослабления одного или более симптомов ревматизма, PSGN, хронической ревматической болезни сердца или для мониторинга состояния заболевания. В других вариантах реализации при применении способа, описанного в настоящем документе, выявляют пациента, подвергающегося или в прошлом подвергшегося воздействию *Streptococcus pyogenes*, или в прошлом перенесшего инфекцию *Streptococcus pyogenes*; указанный пациент подлежит текущему лечению, например, профилактическому лечению для предотвращения последующей инфекции *Streptococcus pyogenes* или для ослабления одного или более симптомов ревматизма, PSGN, хронической ревматической болезни сердца или для мониторинга состояния заболевания. Типичные способы лечения включают способы, описанные в настоящем документе в отношении

Следующие примеры, перечень последовательностей и фигуры приведены для облегчения понимания настоящего изобретения, истинная сущность которого изложена в прилагаемой формуле изобретения. Следует понимать, что возможны модификации изложенных процедур без отклонения от сущности изобретения.

### Примеры

#### Пример 1.

В этом примере описана разработка многоканального анализа на основе гранул для определения наличия и количества GAS-специфичных антител в биологических образцах.

#### Способы.

#### Исследуемые субъекты.

В данном исследовании сыворотку человека получали из четырех различных источников. Пациентам с ARF ставили диагноз в соответствии с новозеландской модификацией критериев Джонса [3] и включали в исследование во время госпитализации в детской больнице Старшип в Окленде в 2004-2006 гг. (n=8) и в больнице Вайкато в Гамильтоне в 2012-2015 гг. (n=8). Сыворотку этнически сопоставимых здоровых детей в возрасте 6 лет получили в исследовании Children of Score (CoS). Кроме того, сыворотку получали от не подвергавшихся сопоставлению здоровых добровольцев в возрасте 20 лет и старше, набранных в Оклендском университете в качестве дополнительной контрольной группы. Демографические характеристики показаны в табл. 1. Все участники предоставили письменное информированное согласие, и для каждого из четырех центров было получено одобрение соответствующего совета по этике.

Таблица 1

|                                       | Участники исследования* |                        |
|---------------------------------------|-------------------------|------------------------|
|                                       | ARF (n = 16)            | Здоровые дети (n = 13) |
| <b>Пол (n)</b>                        |                         |                        |
| Мужской/женский                       | 11/5                    | 7/6                    |
| <b>Возраст (лет)</b>                  |                         |                        |
| Среднее значение                      | 10,3                    | 6                      |
| Диапазон                              | 6 - 15                  | 6 - 6                  |
| <b>Этническая принадлежность</b>      |                         |                        |
| Маори/уроженцы островов Тихого океана | 13/3                    | 11/2                   |

\* В группу здоровых взрослых (n=18) входили взрослые добровольцы старше 20 лет без недавнего фарингита в анамнезе. Данные об этнической принадлежности этих участников отсутствовали.

#### Получение антигенов.

Все рекомбинантные антигены, использованные в этом исследовании, получали в виде зрелых форм без N-концевых сигнальных последовательностей. SLO с молекулярной массой 64,4 кДа (аминокислоты 34-571, SEQ ID NO: 1) и N-концевой His<sub>6</sub>-меткой приобрели в Fitzgerald Industries International. Ген, кодирующий ДНКазу В, амплифицировали из геномной ДНК *S. pyogenes* SF370 (ATCC 700294) с использованием следующих праймеров: прямого 5' CACCATGCGACAAACACAGGTCTCAAATGATGTTG-3' [SEQ ID NO: 3] и обратного 5' ТТСТGAGTAGGTGTACCGTTATGGTAGTТААТGG-3' [SEQ ID NO: 4] для клонирования в рЕТ101/D ТОРО (Life Technologies) с использованием методологии клонирования Торо. Полученный вектор кодировал ДНКазу В (аминокислоты 43-271, аминокислотная последовательность изображена в настоящем документе как [SEQ ID NO: 5]) с С-концевой His<sub>6</sub>-меткой и общей молекулярной массой 29 кДа. Белок экспрессировали в клетках *Escherichia coli* BL21ADE3 с индукцией 1 мМ IPTG при 37°C в течение 3 ч в среде с жидкой средой Леннокса (LB) с добавлением ампициллина и 0,1% глюкозы. SpnA амплифицировали из геномной ДНК *S. pyogenes* SF370 с использованием праймеров, содержащих сайты рестриктаз KasI и XhoI (подчеркнуты): прямого 5' AAAGCGCCCCGCCAAААТТGACTTATGCCAA-3' [SEQ ID NO: 6] и обратного 5' AAАСТGAGСТАТТGGAAAАТGATAАТTGAAGTAAСA-3' [SEQ ID NO: 7]. Полученный ампликон spnA (кодирующий аминокислоты SpnA 28-854, [SEQ ID NO: 8]) клонировали в вектор рPro-ExНта, кодирующий N-концевую His<sub>6</sub>-метку, и трансформировали в клетки *E. coli* BL21ADE3. Экспрессию белка индуцировали 0,3 мМ IPTG при 18°C в течение 16 ч в среде LB, содержащей ампициллин. Как rDNaseB, так и rSpnA выделяли из лизата клеток *E. coli* с использованием стандартной аффинной хроматографии на Ni<sup>2+</sup>-NTA. His<sub>6</sub>-метку отщепляли от rSpnA с использованием рекомбинантной протеазы вируса гравировки табака (соотношение rTEV к рекомбинантному белку 1:100), получая белок размером 85 кДа. Чистоту всех антигенов подтверждали электрофорезом в ДСН-ПААГ.

#### Очистка антиген-специфичного IgG.

IgG, специфичные по отношению к SLO, ДНКазе В и SpnA, очищали от общего иммуноглобулина человека (внутривенного иммуноглобулина, IVIG (Intragam® P)). Аффинные колонки для каждого из антигенов GAS получали путем ковалентного связывания антигенов с агарозной смолой через их первичные аминогруппы с использованием набора для присоединения AminoLink® (Thermo Scientific). 5 мл раствора IVIG четырехкратно разбавляли физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) (pH 7,4) и пропускали через смолу, обеспечивая связывание антител. Смолу четыре раза промывали PBS для удаления несвязанного антитела. Связанное антитело элюировали, используя 0,2 М глицин-HCl буфер (pH 2,5-3,0), и немедленно нейтрализовали 1 М трис-буфером (pH 9). Следы IgA удаляли с использованием центрифужных колонок Melon (Thermo Scientific), полученный антиген-специфичный IgG концентрировали с использованием центробежного фильтра (Merck Millipore). Для подтверждения специфичности элюированного IgG по отношению к антигену, против которого он был выделен, выполняли иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА). На планшетах иммобилизовали антиген в концентрации 5 мкг/мл и блокировали планшеты PBS с добавлением 0,1% твин-20 и 5% сухого обезжиренного молока (PBST-5% молока) в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). Очищенный IgG добавляли на 1 ч при комнатной температуре, связывание определяли с использованием вторичного антитела с пероксидазой хрена (ПХ) против антител человека (1:3000; Santa Cruz Biotechnology), как опубликовано ранее [4].

### Анализ Cytometric Bead Array.

Каждый из антигенов связывали с функциональными гранулами, используя амин-сульфгидрильный перекрестно сшивающий агент сульфо-SMCC в соответствии с инструкциями изготовителя (Becton, Dickinson and Company). Вкратце, полистирольные гранулы размером 7,5 мкм с цветовой кодировкой подготавливали к конъюгированию путем добавления 25 мМ дитиотрейтола (DTT). Антиген-мишень (90 мкг) модифицировали путем добавления 44 мкг/мл раствора сульфо-SMCC, непрореагировавший белок удаляли с использованием центрифужной колонки Bio-Rad (Biorad). Затем модифицированный белок и функциональные гранулы смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем добавляли N-этилмалеимид (44 мкг/мл) и инкубировали в течение еще 15 мин. Промытые конъюгированные гранулы хранили при 4°C в защищенном от света месте. Антигены конъюгировали с функциональными гранулами, содержащими различные соотношения флуорофоров (APCy7 и APC) для обеспечения флуоресценции в уникальных положениях с использованием двух детекторов (FL3 и FL4) на проточном цитометре. Положения гранул, обеспечивавшие максимальное разделение между антигенами, выбирали следующим образом: rSLO - положение E4; rDNaseB - положение A4; и rSpnA - положение A9.

Инкубирование для экспериментов с Cytometric Bead Array (CBA) выполняли в двух повторностях в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Одноканальные анализы выполняли путем инкубирования гранул, покрытых rSLO, rDNaseB и rSpnA, по отдельности в течение 1 ч при комнатной температуре с образцами сыворотки, разбавленными аналитическим разбавителем в соотношении 1:10000. Для определения связывания сывороточных антител добавляли конъюгированное с R-фигоэритрином антитело осла против Fcγ IgG человека (Jackson ImmunoResearch) в концентрации 1:100 на 2 ч при комнатной температуре. Медианную интенсивность флуоресценции (MFI) для каждой реакции считывали на проточном цитометре (BD Accuri C6). Многоканальные анализы с гранулами выполняли, следуя тому же протоколу, за исключением того, что гранулы, связанные с rSLO, rDNaseB и rSpnA, смешивали в равных соотношениях перед добавлением образцов сывороток, разбавленных в соотношении 1:10000. В многоканальных анализах для обнаружения использовали антитело осла против Fcγ IgG человека, разбавленное в соотношении 1:30.

Для каждого антигена строили стандартную кривую из семи точек путем смешивания известных начальных концентраций антител, специфичных по отношению к SLO, ДНКазе B и SpnA, в одной пробирке и выполнения серии двукратных разведений. В качестве начальной концентрации для SLO и ДНКазы B использовали 500 нг/мл, а для SpnA - 1500 нг/мл. Гранулы инкубировали с каждым из разбавленных стандартов в течение 1 часа с последующим определением антитела осла против Fcγ IgG человека, как описано выше. Значения MFI преобразовывали в концентрацию (мкг/мл) и использовали пятипараметрическое уравнение логистической регрессии для создания стандартной кривой для каждого антигена с использованием программы Array Flow Cytometric Analysis Program (FCAP) версии 3 (BD). При использовании сывороток исследуемых субъектов в ходе многоканального анализа наряду со стандартными кривыми из семи точек для каждого антигена MFI преобразовывали в концентрацию (мкг/мл) с использованием программного обеспечения FCAP Array. Нижний предел обнаружения каждого антигена определяли как минимальную концентрацию на стандартной кривой, для которой MFI превышала показания для холостого образца на 3 стандартных отклонения (где холостой образец представлял собой гранулы с вторичным антителом), как опубликовано ранее [5].

Анализ и статистическая обработка данных.

Значения верхнего предела нормы (ВГН) рассчитывали для каждого антигена путем ранжирования концентраций антител, определенных для каждого из образцов сыворотки CoS, и определения 80-го перцентиля в Microsoft Excel (версия 15.24). Статистический анализ и графики получали с использованием GraphPad Prism (версия 7a). Все корреляции анализировали с использованием линейной регрессии.

Получение титров ASO и ADB с использованием коммерческих тест-систем.

Титры ASO и ADB определяли в Labtests Pathology, Окленд, Новая Зеландия. Титры ASO (МЕ/мл) измеряли турбидиметрическим методом с использованием набора анти-стрептолизин-О человека на анализаторе SPAplus (The Binding Site, штат Калифорния, США). Титры ADB (Ед/мл) измеряли с помощью анализа ингибирования фермента (bioMerieux, Марси л'Этуаль, Франция). Этот анализ дает неточные значения для низких титров <100 Ед/мл; среднее значение для образцов, попавших в этот диапазон, составило 50 ед/мл.

Результаты.

Связывание с гранулами и многоканальный анализ.

Для создания гранул, связанных с антигеном GAS, для анализа в этом исследовании получили высокоочищенные препараты каждого из трех антигенов с применением рекомбинантных технологий в E.coli. Секретируемые белки (SLO и DNaseB) экспрессировались без N-концевой сигнальной последовательности, а SpnA экспрессировался без N-концевой сигнальной последовательности и в форме, укороченной по остатку K854 выше мотива сортазы, для улучшения стабильности белка. Каждый из трех белков связывали с функциональной CBA-гранулой, которая флуоресцировала в уникальном положении: rSLO (положение E4), rDNaseB (положение A4) и rSpnA (положение A9). Положения гранул выбирали

для обеспечения максимального разделения на графике двухцветной флуоресценции. Для определения линейного диапазона и точки насыщения анализа исследовали различные разведения сыворотки и концентрации реагента для обнаружения антител против IgG. Этот процесс проб и ошибок позволил установить, что разведение сыворотки 1:10000 находилось в линейном диапазоне для всех трех антигенов.

Для оценки возможности одновременного измерения титров трех антигенов результаты одноканальных анализов сравнили с многоканальными анализами. Выполнили одноканальные анализы, в которых каждую гранулу инкубировали с сыворотками от 10 участников, разбавленными в соотношении 1:10000. Эти 10 сывороток представляли собой смесь образцов ARF и контрольных образцов, отобранных на основании ранее выполненного твердофазного ИФА, который показал, что реакционная способность сывороток этих участников против трех антигенов варьировалась от низкой до высокой, обеспечивая хорошее распределение MFI в СВА-анализе (фиг. 1). Затем эти же 10 сывороток исследовали в многоканальных анализах, при которых три гранулы антигена смешивали в равных частях и инкубировали с исследуемой сывороткой в одной лунке для анализа. MFI в этих многоканальных анализах продемонстрировала чрезвычайно выраженную корреляцию с одноканальной MFI для каждого антигена, как показано на фиг. 1 (значения  $R^2$ : SLO=0,999; ДНКазы В=0,998; и SpnA= 0,998). Это указывает на отсутствие мешающего влияния или перекрестной реакционной способности IgG между гранулами и демонстрирует возможность проведения многоканального анализа, включающего три стрептококковых антигена.

Стандартизация и точность многоканального СВА-анализа.

Для определения концентрации антител, связывающих гранулы с присоединенными антигенами, и обеспечения возможности сравнения между циклами анализа получили стандартные кривые для каждого из трех антигенов. IgG, специфичные по отношению к SLO, ДНКазы В и SpnA, очищали от IVIG аффинной хроматографией. Специфичность очищенных антител подтверждали с помощью твердофазного ИФА. Как показано на фиг. 2, антитела, специфичные по отношению к SLO, ДНКазы В и SpnA, демонстрировали реакционную способность только по отношению к своему антигену и не обладали обнаружимой реакционной способностью по отношению к двум другим антигенам. Очищенный IgG использовали для получения семиточечных стандартных кривых для каждого антигена. Известные концентрации очищенного IgG двукратно разбавляли, начиная с концентраций 500 нг/мл для антитела против SLO и антитела против ДНКазы В и 1500 нг/мл для антитела против SpnA. Эти разбавленные стандарты инкубировали с гранулами с присоединенным антигеном в многоканальном формате и аппроксимировали стандартные кривые с использованием пятипараметрической логистической формулы. Пример стандартных кривых показан на фиг. 5. Стандартные кривые воспроизводились в высокой степени, точность аппроксимации составляла по меньшей мере 98%, что демонстрировало применимость аффинно очищенных поликлональных антител в качестве эталонных стандартов для этих антигенов.

Стандарты очищенных антител использовали для определения нижних пределов обнаружения указанных трех антигенов при СВА-анализе: антитело против SLO - 1 нг/мл; антитело против ДНКазы В - 0,1 нг/мл; и антитело против SpnA - 0,1 нг/мл. Коэффициент вариации (CV) для многоканального анализа оценивали с использованием тех же 10 сывороток, что и в вышеприведенном сравнении одно/многоканального анализа. Концентрации IgG в этих 10 сыворотках измеряли в ходе анализа, включающего стандартные кривые IgG; и средние значения CV для каждого из антигенов в пределах анализа и между анализами составляли <4% и <15%, соответственно (табл. 2). Эти CV демонстрируют хорошую точность и воспроизводимость многоканального анализа на основе гранул. Воспроизводимость как стандартной кривой, так и результатов анализа означает, что эти реагенты можно применять для проверки эффективности присоединения и целостности будущих партий гранул с присоединенным антигеном.

Таблица 2

|                         | Коэффициенты вариации |          |       |
|-------------------------|-----------------------|----------|-------|
|                         | SLO                   | ДНКазы В | SpnA  |
| CV в рамках анализа (%) | 3,05                  | 3,44     | 3,24  |
| CV между анализами (%)  | 11,17                 | 12,32    | 12,03 |

Измерение титров антител в сыворотках пациентов с ARF.

Для оценки применимости антигена SpnA и технологии на основе гранул в клинической стрептококковой серологии выполнили многоканальный анализ для всех субъектов (табл. 1). Концентрацию IgG, специфичных по отношению к SLO, ДНКазы В и SpnA, можно определить для всех 47 субъектов в одном эксперименте, выполняемом одним оператором в течение 1 дня. Как показано на фиг. 3, средние титры антител для каждого из трех антигенов в образцах ARF были значительно выше, чем средние титры как у здоровых детей, так и у контрольных групп здоровых взрослых. В соответствии с наблюдениями в пре-



дыдущих исследованиях [6], титры для ASO и ADB были повышены и демонстрировали большее распространение у здоровых детей, чем у здоровых взрослых людей, на что указывают более высокие значения доверительных интервалов в табл. 3. Примечательно, что титры SpnA у здоровых детей были аналогичны титрам у здоровых взрослых и характеризовались более узкими доверительными интервалами по сравнению с таковыми для ASO и ADB в группе здоровых детей (табл. 1). Это подтверждает предыдущие наблюдения низких фоновых титров SpnA у здоровых людей [2].

Способность антигенов обнаруживать воздействие GAS в прошлом для диагностики ARF оценивали с использованием значений ВГН. Рассчитанная ВГН, или 80-й процентиль, в группе здоровых детей составил 644, 360 и 170 мкг/мл для SLO, ДНКазы В и SpnA, соответственно. Более низкая ВГН для SpnA отражает снижение титров, наблюдаемое у здоровых детей, по сравнению с SLO и ДНКазой В. Эти экспериментально определенные пороговые значения, показанные точечной линией на фиг. 3, затем применяли к образцам ARF для определения чувствительности каждого антигена. Это количество истинных положительных результатов, обнаруженное в зависимости от того, был ли наблюдаемый титр выше ВГН. ДНКазы В обеспечивала наименьшую чувствительность и позволила обнаружить только 9 из 16 образцов ARF (56,25%). SLO обеспечивал промежуточную чувствительность и позволил обнаружить 12 из 16 образцов ARF (75%). SpnA обеспечивал наивысшую чувствительность, позволив обнаружить 14 из 16 образцов ARF (87,5%).

Таблица 3

Сводная статистика по концентрации антител (мкг/мл), специфичных по отношению к SLO, ДНКазе В и SpnA, определенной с помощью анализа Cytometric Bead Assay

| Антиген                     | Острый ревматизм (n = 16) | Здоровые дети (n = 13) | Здоровые взрослые (n = 18) |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|
| <b>Стрептолизин-О</b>       |                           |                        |                            |
| Среднее значение (95% ДИ)   | 1539 (859,9-2218,0)       | 559 (115,2-1003,0)     | 173 (89,6-256,2)           |
| Медианное значение (95% ДИ) | 1225 (601,4-1948,0)       | 326 (123,7-757,9)      | 123 (53,6-201,4)           |
| <b>ДНКазы В</b>             |                           |                        |                            |
| Среднее значение (95% ДИ)   | 718,5 (387,4-1050)        | 180,9 (56,2-305,5)     | 41,7 (24,7-58,7)           |
| Медианное значение (95% ДИ) | 439,5 (240,9-1071)        | 89,01 (0-383,7)        | 29,38 (22,8-49,6)          |
| <b>SpnA</b>                 |                           |                        |                            |
| Среднее значение (95% ДИ)   | 1029 (304,9-1752)         | 119,8 (36,7-202,9)     | 52,2 (1,3-103,1)           |
| Медианное значение (95% ДИ) | 422,2 (229,1-1156)        | 76,01 (0-177,3)        | 7,4 (0-49,7)               |

Сравнение с существующими серологическими тестами.

Для сравнения многоканального СВА-анализа с существующей коммерчески доступной методологией в коммерческой лаборатории выполнили анализ ASO и ADB в сыворотке 20 участников, для которых имелись образцы достаточного объема. ASO измеряли с использованием широко используемого турбидиметрического способа, и получили точные значения в международных единицах (МЕ/мл). В противоположность этому, титры ADB измеряли с использованием анализа ингибирования фермента, который позволяет получать диапазоны титров (100, 200, 300, 400, 600, 800, 1200 и ~1600). Как показано на фиг. 4А, имела место превосходная корреляция между концентрацией IgG ASO, определенной при СВА-анализе и коммерчески доступным турбидиметрическим способом ( $R^2=0,968$ ). Как показано на фиг. 4В, хорошая корреляция также имела место между концентрацией IgG ADB, определенной при СВА-анализе и коммерчески доступным анализом ингибирования фермента ( $R^2=0,934$ ).

Однако на чертеже также проиллюстрирована недостаточная точность анализа ADB на основе ингибирования фермента. При анализе ингибирования фермента три образца были классифицированы как "1200", однако концентрация IgG против ДНКазы В, измеренная в нашем СВА-анализе, составила 1508, 1070 и 914 мкг/мл, соответственно (точки данных в рамке).

Обсуждение.

В данном примере представлена подготовка многоканального анализа серологии GAS на основе гранул и применение этого анализа для определения концентраций антител в ряде образцов от здоровых и ARF-субъектов. Данный пример успешно продемонстрировал, что в одном многоканальном анализе можно использовать три антигена *Streptococcus pyogenes* в комбинации для выявления присутствия различных популяций антител, специфичных по отношению к *Streptococcus pyogenes*, не обладающих значительной перекрестной реакционной способностью, с использованием очень небольших объемов образца (1 мкл или менее).

Многоканальный анализ, представленный в настоящем документе, можно количественно использовать для каждого из комплексов "антиген:антитело", в отличие от, в частности, существующих анализов ДНКазы В. Кроме того, ожидается улучшение чувствительности/специфичности, частично из-за включения SpnA, который характеризуется более низкими фоновыми значениями у здоровых субъектов, и частично из-за улучшения чувствительности, на которую, в частности, не оказывает негативного влияния многоканальный вариант реализации.

Пример 2.

В этом примере описана разработка многоканального анализа на основе гранул с использованием платформы Luminex для определения наличия и количества GAS-специфичных антител в биологических образцах.

Способы.

Исследуемые субъекты.

В данном исследовании сыворотку человека получали, как описано выше в примере 1. Аналогичным образом, все участники дали письменное информированное согласие и было получено одобрение соответствующего совета по этике.

Получение сыворотки.

Образцы сыворотки собирали и разбавляли для анализа в соотношении 1:15000. Эталон IVIG перед использованием разбавляли в соотношении 1:60000.

Подготовка гранул Luminex и анализ.

Каждый из антигенов связывали с микросферами xMAP, используя амин-карбоксильный перекрестно сшивающий агент в соответствии с инструкциями изготовителя (Luminex Corporation). Для конъюгирования исследовали три различных соотношения "антигентагранулы", и для дальнейшего анализа выбрали гранулы, конъюгированные с 12,5 мкг антигена.

Выбрали три хорошо разделяемых положения гранул - гранулы с ДНКазой В в положении 030; гранулы с SLO в положении 072; и гранулы SpnA в положении 078. Конъюгированные гранулы инкубировали со вторичным антителом против IgG человека, разбавленным в соотношении 1:30, для многоканальных реакций.

Анализ Luminex выполняли в системе Magpix™ (Merck) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты.

Одноканальные и многоканальные анализы.

Для оценки возможности одновременного измерения титров трех антигенов результаты одноканальных анализов сравнили с многоканальными анализами. Выполнили одноканальные анализы, в которых каждую гранулу инкубировали с сыворотками участников, а затем эти же сыворотки исследовали в многоканальных анализах, при которых три гранулы антигена смешивали в равных частях и инкубировали с исследуемой сывороткой в одной лунке для анализа. MFI в этих многоканальных анализах продемонстрировала чрезвычайно выраженную корреляцию с одноканальной MFI для каждого антигена, как показано на фиг. 9; значения  $R^2$  составили: SLO=0,999 (фиг. 9A); ДНКазы В=0,998 (фиг. 9B); и SpnA=0,998 (фиг. 9C). Это указывает на отсутствие мешающего влияния или перекрестной реакционной способности IgG между гранулами и демонстрирует возможность проведения многоканального анализа на основе Luminex, включающего три стрептококковых антигена.

Коэффициент вариации (CV) для многоканального Luminex-анализа оценивали с использованием тех же 10 сывороток, что и в вышеприведенном сравнении одно/многоканального анализа. Концентрации IgG в этих 10 сыворотках измеряли в ходе анализа, включающего стандартные кривые IgG; и средние значения CV для каждого из антигенов в пределах анализа и между анализами составляли <2% и <11%, соответственно (табл. 3A).

Таблица 3А

| n = 10                  | Коэффициенты вариации |          |      |
|-------------------------|-----------------------|----------|------|
|                         | SLO                   | ДНКазы В | SpnA |
| CV в рамках анализа (%) | 1,8                   | 1,5      | 1,8  |
| CV между анализами (%)  | 9,3                   | 10,4     | 10,4 |

Эти CV демонстрируют хорошую точность и воспроизводимость многоканального анализа на основе Lumineх. Воспроизводимость как стандартной кривой, так и результатов анализа означает, что эти реагенты также можно применять для проверки эффективности присоединения и целостности будущих партий гранул с присоединенным антигеном.

Сравнение с существующими серологическими тестами.

Для сравнения Lumineх-анализа с существующей коммерчески доступной методологией выполнили анализ ASO и ADB в сыворотке 61 участника, для которых имелись образцы достаточного объема. ASO измеряли, как описано выше в примере 1, с использованием широко используемого турбидиметрического способа, и получили точные значения в международных единицах (МЕ/мл). Титры ADB измеряли (аналогичным образом, как описано выше в примере 1), с использованием анализа ингибирования фермента, который позволяет получать диапазоны титров (100, 200, 300, 400, 600, 800, 1200 и ~1600). Как показано на фиг. 10А, имела место хорошая корреляция между концентрацией IgG ASO, определенной коммерчески доступным турбидиметрическим способом и титром антитела против SLO, определенным при Lumineх-анализе ( $R^2=0,933$ ). Как показано на фиг. 10В, хорошая корреляция также имела место между концентрацией IgG ADB, определенной коммерчески доступным анализом ингибирования фермента, и титром антитела против ДНКазы В, определенным при Lumineх-анализе ( $R^2=0,942$ ).

Иммунокинетика при ARF.

Сыворотку пациентов с диагнозом ARF (исследование RFRF) стратифицировали по дням после госпитализации. Как видно на фиг. 11, уровни IgG против SpnA были значительно понижены в сыворотках, собранных более чем через 20 дней после госпитализации (n=17), по сравнению с уровнями в сыворотках, собранных менее чем через 20 дней (n=19), что свидетельствует об их более коротком периоде полувыведения, чем у антител против SLO или антител против ДНКазы В.

Это, в свою очередь, указывает, что SpnA обладает благоприятной иммунокинетикой для серологической стрептококки, и подтверждает возможность его применения в диагностических анализах, особенно в многоканальных анализах, например, описанных и приведенных в качестве примера в настоящем документе. Следует принимать во внимание, что анализы, осуществляемые с помощью изобретения, описанного в настоящем документе, позволяют быстро выявлять и лечить пациентов, недавно подвергшихся воздействию *Streptococcus pyogenes*, для которых длительное лечение антибиотиками, часто продолжающееся в течение многих лет с сопутствующими расходами и риском, является ненужным и его можно избежать.

Пример 3.

В этом примере описана дальнейшая оценка многоканального анализа на основе гранул с использованием платформы Lumineх для определения наличия, количества и иммунокинетики GAS-специфичных антител в биологических образцах.

Способы.

Исследуемые субъекты.

В данном исследовании сыворотку человека получали, как описано выше в примере 1.

Аналогичным образом, все участники дали письменное информированное согласие и было получено одобрение соответствующего совета по этике.

Получение сыворотки.

Образцы сыворотки пациентов с острым ревматизмом сгруппировали по дням получения образцов крови: менее чем через 20 дней после даты поступления в больницу; через 20 дней или более после госпитализации. Образцы сыворотки разбавляли для анализа в соотношении 1:15000. Эталон IVIG перед использованием разбавляли в соотношении 1:60000.

Подготовка гранул Lumineх и анализ.

Каждую из "антиген:хМАР-микросфер" готовили для использования в анализе, как описано в примере 2. Анализ Lumineх выполняли в системе Magpix™ (Merck) в соответствии с инструкциями производителя.

Сравнение титров антител в сыворотке для SLO, ДНКазы В и SpnA определяли с использованием трехканального Lumineх-анализа. Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7.0.

Результаты.

Иммунокинетика при ARF.

Сыворотку пациентов с диагнозом ARF (исследование RFRF) стратифицировали по дням после госпитализации. Результаты этого анализа показаны ниже в табл. 4 и на фиг. 12.

Таблица 4

| Иммунокинетика              |                       |                       |                  |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| Антиген                     | < 20 дней (n = 48)    | 20+ дней (n = 37)     | Значение p       |
| <u>SLO</u>                  |                       |                       |                  |
| среднее значение (95% ДИ)   | 834,9 (598,3 - 1072)  | 695,2 (552,1 - 838,4) |                  |
| медианное значение (95% ДИ) | 558,1 (430,9 - 740,6) | 592,0 (465 - 727,8)   | n/c (p = 0,8983) |
| <u>ДНКазы В</u>             |                       |                       |                  |
| среднее значение (95% ДИ)   | 341,2 (267,7 - 414,6) | 288,1 (220 - 356,2)   |                  |
| медианное значение (95% ДИ) | 279,6 (238,2 - 355,7) | 223,3 (184,2 - 293)   | нс (p = 0,3248)  |
| <u>SpnA</u>                 |                       |                       |                  |
| среднее значение (95% ДИ)   | 103,4 (79,4 - 127,5)  | 70,1 (51,7 - 88,5)    |                  |
| медианное значение (95% ДИ) | 75,1 (61,2 - 91,6)    | 59,3 (43,0 - 69,8)    | p = 0,0389       |

Значимые различия в титрах антител против SLO и ДНКазы В между этими группами отсутствовали. Вместе с тем, как видно на фиг. 12, уровни IgG против SpnA были значительно понижены в сыворотках, собранных более чем через 20 дней после госпитализации (n=37), по сравнению с уровнями в сыворотках, собранных менее чем через 20 дней после госпитализации (n=48), что согласуется с результатами, представленными выше в примере 2. Это подтверждает вывод, что антитела против SpnA характеризуются более коротким периодом полувыведения, чем антитела против SLO или антитела против ДНКазы В.

Это, в свою очередь, указывает, что SpnA обладает благоприятной иммунокинетикой для серологической стрептококки, и подтверждает возможность его применения в диагностических анализах (особенно в многоканальных анализах, например, описанных и приведенных в качестве примера в настоящем документе), терапевтических оценках и схемах лечения.

Пример 4.

В этом примере описано исследование термостабильности SpnA в рамках оценки пригодности для применения в диагностических анализах, например, в многоканальном анализе на основе гранул, например, платформы Luminex, или в анализах на основе тест-полосок/индикаторных полосок (особенно в тех случаях, когда хранение с использованием холодной цепи неосуществимо или недоступно).

Способы.

Стабильность SpnA определяли с использованием термических расплавов согласно опубликованным протоколам (Moreau, M. J. J., Morin, I. & Schaeffer, P. M. Mol. BioSyst. 6, 1285-1292 (2010)). Вкратце, термостабильность исходного конструкта SpnA (AK 28-877) сравнивали с усеченным конструктом (AK 28-854) путем инкубирования белков в идентичных буферах в течение 5 мин при температурах, показанных на фиг. 13А.

Затем следовал этап охлаждения и центрифугирования для удаления агрегатов белка. Процент белка с характерной трехмерной структурой определяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, значения Tagg (температура, при которой агрегируется 50% молекул белка) рассчитывали по профилям термической агрегации с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7.0.

### Результаты.

Процент белка с характерной трехмерной структурой при каждой температуре согласно оценке с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, показан на хроматограмме на фиг. 13А. Построили график Tagg (температура, при которой агрегируется 50% молекул белка) для каждого белка при каждой температуре (фиг. 13В), на котором ясно показаны различия в кривых расплава этих двух белков. Среднее значение Tagg для усеченного конструкта,  $51,0 \pm 0,6^\circ\text{C}$  по трем повторным экспериментам, было значительно выше, чем Tagg исходного конструкта, которая составляла  $47,5 \pm 0,9^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ), что ясно видно на фиг. 13С.

Это явным образом демонстрирует повышенную термостабильность усеченного полипептида SpnA, подтверждая возможность его применения в диагностических анализах, терапевтических оценках и схемах лечения, особенно в условиях длительного хранения реагентов или хранения в условиях, неоптимальных для типичных композиций на основе белков, например, при отсутствии холодной цепи.

### Публикации.

1. Johnson DR, Kurlan R, Leckman J, Kaplan EL. The human immune response to streptococcal extracellular antigens: clinical, diagnostic, and potential pathogenetic implications. *Clin. Infect. Dis.* 2010;50:481–90.
2. Chang A, Khemlani A, Kang H, Proft T. Functional analysis of *Streptococcus pyogenes* nuclease A (SpnA), a novel group A streptococcal virulence factor. *Molecular Microbiology.* 2011;79:1629–42.
3. Atatoa-Carr P, Lennon D, Wilson N, New Zealand Rheumatic Fever Guidelines Writing Group. Rheumatic fever diagnosis, management, and secondary prevention: a New Zealand guideline. *N Z Med J.* 2008;121:59–69.
4. Raynes JM, Frost HRC, Williamson DA, Young PG, Baker EN, Steemson JD, et al. Serological Evidence of Immune Priming by Group A Streptococci in Patients with Acute Rheumatic Fever. *Front Microbiol.* 2016;7:1119.
5. Dabitoa D, Margolick JB, Lopez J, Bream JH. Multiplex measurement of proinflammatory cytokines in human serum: comparison of the Meso Scale Discovery electrochemiluminescence assay and the Cytometric Bead Array. *J Immunol Methods.* 2011;372:71–7.
6. Steer AC, Vidmar S, Ritika R, Kado J, Batzloff M, Jenney AWJ, et al. Normal ranges of streptococcal antibody titers are similar whether streptococci are endemic to the setting or not. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009;16:172–5.
7. Moreau, M. J. J., Morin, I. & Schaeffer, P. M. *Mol. BioSyst.* 6, 1285–1292 (2010).

Полные описания всех заявок, патентов и публикаций, упомянутых выше и ниже (при их наличии), включены в настоящий документ посредством ссылки.

Любое упоминание предшествующего уровня техники в данном описании не является и не должно восприниматься как подтверждение или какая-либо форма указания на то, что указанный предшествующий уровень техники является частью общих знаний в области деятельности в любой стране мира.

Кроме того, можно сказать, что изобретение в широком смысле состоит из частей, элементов и признаков, упомянутых или указанных в спецификации заявки, по отдельности или вместе, во всевозможных комбинациях двух или более из указанных частей, элементов или признаков.

Если в вышеприведенном описании упоминаются целые числа или компоненты, имеющие известные эквиваленты, эти целые числа включены в настоящий документ, как если бы они были изложены по отдельности.

Следует отметить, что для специалистов в данной области техники очевидны различные изменения и модификации описанных в настоящем документе предпочтительных вариантов осуществления. Такие изменения и модификации можно вносить без отступления от сущности изобретения и без уменьшения его сопутствующих преимуществ. Следовательно, предполагается, что такие изменения и модификации должны входить в настоящее изобретение.

Кроме того, можно сказать, что изобретение в широком смысле состоит из частей, элементов и признаков, упомянутых или указанных в спецификации заявки, по отдельности или вместе, во всевозможных комбинациях двух или более из указанных частей, элементов или признаков.

Аспекты настоящего изобретения описаны исключительно в качестве примера, и следует принимать во внимание, что в него могут быть внесены модификации и дополнения без отступления от его сущности.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обнаружения недавнего воздействия *Streptococcus pyogenes* у субъекта, причем указанный способ включает:

i) получение биологического образца, ранее полученного от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более антител, специфичных по отношению к антигенам *Streptococcus pyogenes*;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одним или более антигенами из нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes*, причем указанный один или более антигенов SpnA способен связывать антиген SpnA-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одного или более комплексов "антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело", если в биологическом образце присутствуют антиген SpnA-специфичные антитела; и

iii) обнаружение присутствия или отсутствия указанных антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело комплексов и

iv) оценку одного или более других диагностических критериев наличия *Streptococcus pyogenes* или ревматизма, или постстрептококкового гломерулонефрита у субъекта,

причем обнаружение присутствия одного или более комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело или обнаружение количества одного или более комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело выше порогового значения указывает на недавнее воздействие *Streptococcus pyogenes* у субъекта и

присутствие одного или более других диагностических критериев ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита при отсутствии комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело или количества комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело ниже порогового значения указывает на недавнее воздействие *Streptococcus pyogenes* у субъекта.

2. Способ по п.1, включающий:

i) обеспечение биологического образца, ранее полученного от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более антител, специфичных по отношению к SpnA;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одним или более антигенами из SpnA, причем указанный один или более антигенов SpnA способен связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одного или более комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело, если в биологическом образце присутствуют антиген SpnA-специфичные антитела; и

iii) обнаружение присутствия или отсутствия указанных антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело комплексов, причем обнаружение количества одного или более комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело выше порогового значения указывает на недавнее воздействие *Streptococcus pyogenes* у субъекта.

3. Способ по п.1 или 2, включающий оценку одного или более других диагностических критериев присутствия *Streptococcus pyogenes* или ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита (PSGN) у субъекта, причем:

i) обнаружение присутствия комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело или количества комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело выше порогового значения указывает на недавнее воздействие *Streptococcus pyogenes* у субъекта и

ii) присутствие одного или более других диагностических критериев ревматизма или PSGN при отсутствии комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело или при количестве *Streptococcus pyogenes* антиген SpnA-специфичных комплексов ниже порогового значения указывает на недавнее воздействие *Streptococcus pyogenes* у субъекта.

4. Способ обнаружения или диагностики ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита (PSGN), включая острый постстрептококковый гломерулонефрит (APSGN) у субъекта, или определения повышенной вероятности развития ревматизма, PSGN или APSGN у субъекта, причем указанный способ включает:

i) обеспечение биологического образца, ранее полученного от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более антител, специфичных по отношению к *Streptococcus pyogenes*;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одним или более антигенами из нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes*, причем указанный один или более антигенов SpnA способен связывать SpnA антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одного или более комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело, если в биологическом образце присутствуют антиген SpnA-специфичные антитела; и

iii) обнаружение присутствия или отсутствия комплексов SpnA антиген:SpnA антиген-специфичное антитело; и

iv) оценку одного или более других диагностических критериев наличия *Streptococcus pyogenes* или ревматизма или PSGN у субъекта;

причем присутствие одного или более других диагностических критериев ревматизма, PSGN или APSGN вместе с присутствием одного или более комплексов SpnA антиген:SpnA антиген-специфичное антитело или обнаружение количества комплексов SpnA антиген:SpnA антиген-специфичное антитело выше порогового значения указывает на повышенную вероятность развития ревматизма, PSGN или APSGN или указывает на недавнее воздействие Streptococcus pyogenes у субъекта как один из критериев наличия ревматизма, PSGN или APSGN у субъекта; и

при этом наличие одного или более других диагностических критериев ревматизма, PSGN или APSGN при отсутствии одного или более комплексов SpnA антиген:SpnA антиген-специфичное антитело или при обнаружении количества одного или более комплексов SpnA антиген:SpnA антиген-специфичное антитело ниже порогового значения указывает на наличие ревматизма или PSGN у субъекта, на недавнее воздействие Streptococcus pyogenes у субъекта как один из критериев наличия ревматизма или PSGN у субъекта, например повышенный риск последующей инфекции Streptococcus pyogenes.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанный способ включает:

i) обеспечение биологического образца, ранее полученного от субъекта, который может содержать или предположительно содержит одно или более антител, специфичных по отношению к Streptococcus pyogenes SpnA;

ii) приведение указанного биологического образца в контакт с одним или более антигенами из Streptococcus pyogenes SpnA, причем указанный один или более антигенов Streptococcus pyogenes SpnA способен связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одного или более комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело, если в биологическом образце присутствуют антиген SpnA-специфичные антитела; и

iii) обнаружение указанных комплексов, причем обнаружение количества одного или более комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело выше порогового значения указывает на повышенную вероятность развития ревматизма, PSGN или APSGN или указывает на недавнее воздействие Streptococcus pyogenes у субъекта как один из критериев наличия ревматизма, PSGN или APSGN у субъекта; и

iv) оценку одного или более диагностических критериев наличия ревматизма или постстрептококкового гломерулонефрита у субъекта; и

причем обнаружение количества одного или более комплексов антиген SpnA:антиген SpnA-специфичное антитело выше порогового значения в комбинации с одним или более другими диагностическими критериями ревматизма или острого постстрептококкового гломерулонефрита указывает на наличие ревматизма или острого постстрептококкового гломерулонефрита у субъекта.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанное пороговое значение представляет собой контрольный уровень антигена, установленный для каждой исследуемой популяции.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанными одним или более диагностическими критериями является наличие или отсутствие одного или более из клинических симптомов, ассоциированных с ревматизмом, PSGN или APSGN.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанные один или более из клинических симптомов выбраны из мигрирующего полиартрита, кардита, гематурии, ревматической эритемы, подкожных узелков, хорей Сиденгама или пиодермии.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что оценка одного или более из других диагностических критериев включает следующие этапы:

i) приведение биологического образца в контакт с одним или более антигенами из ДНКазы B Streptococcus pyogenes и/или одним или более антигенами из SLO Streptococcus pyogenes, причем указанный один или более антиген Streptococcus pyogenes может связывать антиген-специфичные антитела, присутствующие в биологическом образце, с образованием одного или более комплексов "антиген:антиген-специфичное антитело" при наличии антиген-специфичных антител в биологическом образце; и

ii) обнаружение указанных комплексов, причем:

a) присутствие комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, или определение количества комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, выше порогового значения указывает на недавнее воздействие Streptococcus pyogenes на субъекта; и

b) присутствие комплексов, специфичных по отношению к ДНКазе B Streptococcus pyogenes, и/или комплексов, специфичных по отношению к SLO Streptococcus pyogenes, и отсутствие комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, или обнаружение количества комплексов, специфичных по отношению к SpnA Streptococcus pyogenes, ниже порогового значения указывает на воздействие Streptococcus pyogenes на субъекта в прошлом.

10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что один или более из антигенов Streptococcus pyogenes выбран из группы, состоящей из:

i) нуклеазы A (SpnA) Streptococcus pyogenes или

ii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или

iii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или

iv) дезоксирибонуклеазы B (ДНКазы B) или

- v) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или
- vi) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или
- vii) стрептолизина-О (SLO) или
- viii) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или
- ix) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или
- x) любой комбинации двух или более из i)-ix), приведенных выше.

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что биологический образец приводят в контакт с каждым из следующих антигенов *Streptococcus pyogenes*:

- i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes* или
- ii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или
- iii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и
- iv) дезоксирибонуклеазы В (ДНКазы В) или
- v) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или
- vi) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и
- vii) стрептолизина-О (SLO) или
- viii) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или
- ix) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

12. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что биологический образец приводят в контакт с каждым из следующих антигенов *Streptococcus pyogenes*:

- i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes* или антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и
- ii) дезоксирибонуклеазы В (ДНКазы В) или антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и
- iii) стрептолизина-О (SLO) или антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что обнаружение комплексов "антиген:антитело" включает воздействие партнера по специфичному связыванию, несущего обнаружимую метку, на комплексы, и обнаружение сигнала метки при наличии антиген-специфичных антител в биологическом образце.

14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что один или более из антигенов *Streptococcus pyogenes* мечены обнаружимой меткой.

15. Набор для обнаружения или диагностики ревматизма или PSGN у субъекта для выявления наличия инфекции *Streptococcus pyogenes* у субъекта или для выявления антиген-специфичных антител к *Streptococcus pyogenes* в биологическом образце, причем указанный набор содержит композицию, содержащую по меньшей мере один из антигенов *Streptococcus pyogenes*, выбранный из группы, состоящей из:

- i) нуклеазы А (SpnA) *Streptococcus pyogenes* или
- ii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или
- iii) антигенного фрагмента SpnA, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и по меньшей мере один из антигенов *Streptococcus pyogenes* необязательно выбран из группы, состоящей из:
- iv) дезоксирибонуклеазы В (ДНКазы В) или
- v) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или
- vi) антигенного фрагмента ДНКазы В, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, или
- vii) стрептолизина-О (SLO) или
- viii) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или



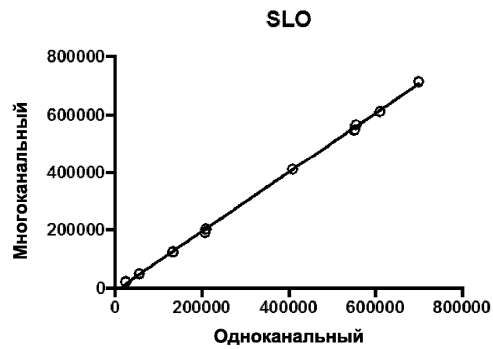
ix) антигенного фрагмента SLO, содержащего, по существу состоящего из или состоящего по меньшей мере из 10 соседних аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2,

необязательно, по меньшей мере одной композиции, содержащей контрольный образец антитела, причем контрольный образец антитела содержит антитело, специфичное по отношению к одному из антигенов *Streptococcus pyogenes*, присутствующих в наборе,

необязательно, одного или более из реагентов для создания среды, благоприятной для контакта одного или более антигенов с биологическим образцом,

необязательно, одного или более реагентов, позволяющих обнаружить комплекс, образованный между одним или более антигенами и одним или более антителами, специфичными к антигену *Streptococcus pyogenes*, присутствующий в биологическом образце, и инструкции по применению.

A



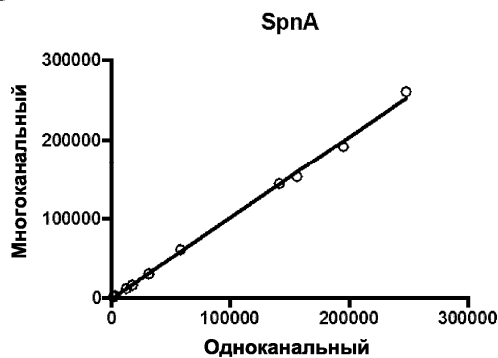
Фиг. 1А

B

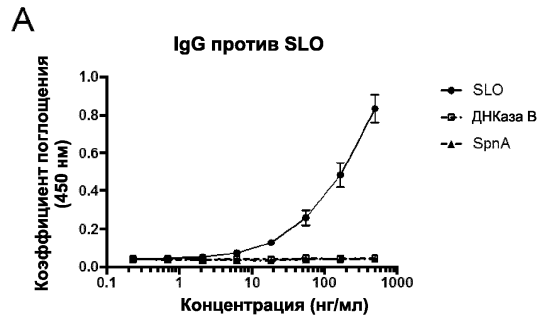


Фиг. 1В

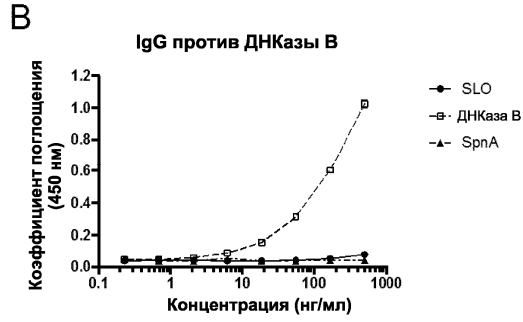
C



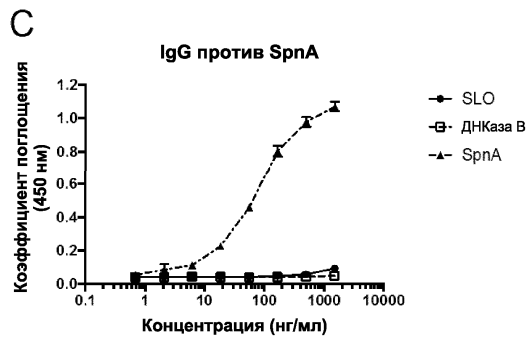
Фиг. 1С



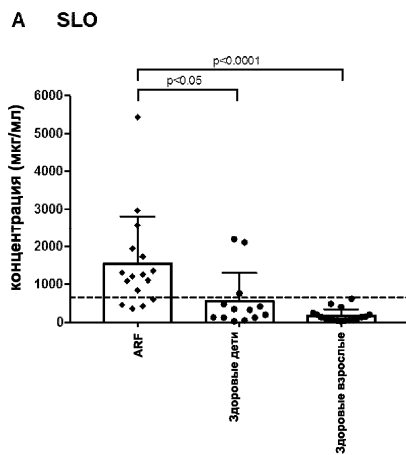
Фиг. 2А



Фиг. 2В

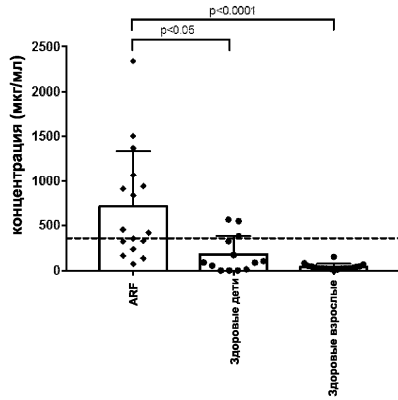


Фиг. 2С



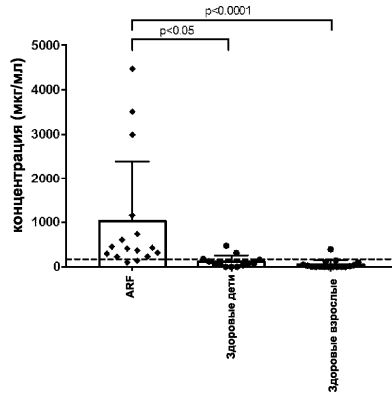
Фиг. 3А

**В ДНКаза В**

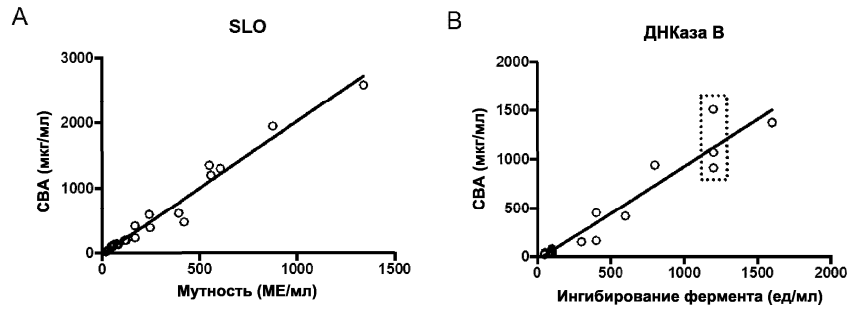


Фиг. 3В

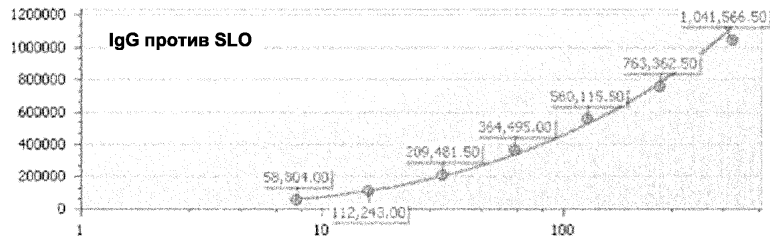
**С SpnA**



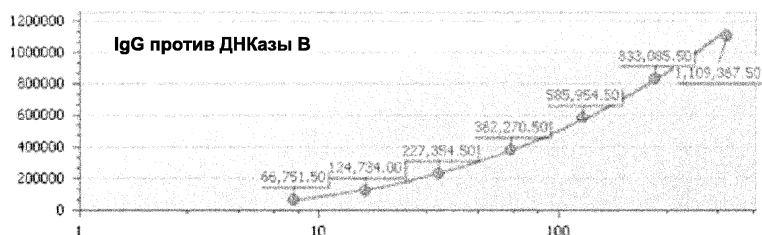
Фиг. 3С



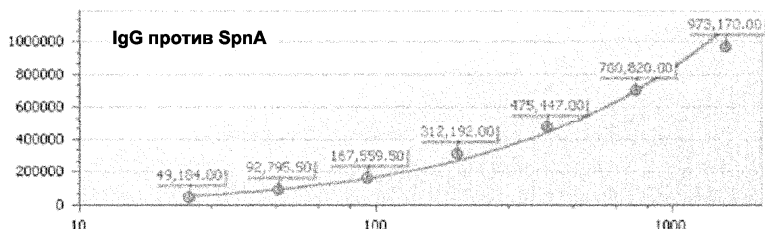
Фиг. 4



Фиг. 5А



Фиг. 5B



Фиг. 5C

>SLO дикого типа

```

ESNKQNTASTETTTTNEQPKPESELTEKAGQKTDDMLNSNDMIKLA PKEMPLESAEKE
EKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKKEGVKKADKFI VIER
KKKNINTTPVDISIIDSVDTRTYPAALQLANKGF TENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGMGD
KATVEVNDPPTYANVSTAI DNVLVQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNS
KILDGTLGIDFKSISKGEKVMIAAYKQIF YTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQQRKGV
NEAPPLFVSNVAYGRTV FVKLETSSKSNVDEA AFSALKGTDVKTNKGYSIDILENSFTA
VVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNL AYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTE
YVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEIN YDDKRGKEVITKRWDNNWYSKTSPPFS
TVIPLGANSRNIRIMARECTGLA EHWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK
    
```

Фиг. 6A

>Детоксифицированный SLO

```

ESNKQNTASTETTTTNEQPKPESELTEKAGQKTDDMLNSNDMIKLA PKEMPLESAEKE
EKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKKEGVKKADKFI VIER
KKKNINTTPVDISIIDSVDTRTYPAALQLANKGF TENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGMGD
KATVEVNDPPTYANVSTAI DNVLVQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNS
KILDGTLGIDFKSISKGEKVMIAAYKQIF YTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQQRKGV
NEAPPLFVSNVAYGRTV FVKLETSSKSNVDEA AFSALKGTDVKTNKGYSIDILENSFTA
VVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNL AYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTE
YVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEIN YDDKRGKEVITKRWDNNWYSKTSPPFS
TVIPLGANSRNIRIMARECTGLA EHWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK
    
```

Фиг. 6B

>ДНКазы В 43-271

```

RQTQVSNDDVVLNDGASKYLNEALAWTFNDSPNYKTLGTSQITPALFPKAGDILYSKLDELGRTRTARGTLTYANVEGSGYGRQSFQKNQNPAGWT
GNPNHVKKYKIEWLNGLSYVGDVWNRSHLIADSLGGDALRVNAVVTGTRTQNVGGRDQKGMRYTEQRAQEWLEANRDGYLYEAAPIYNADLIPRA
VVSVMQSSDNTINERVLVYNTANGYTYNYHNGTPTQK
    
```

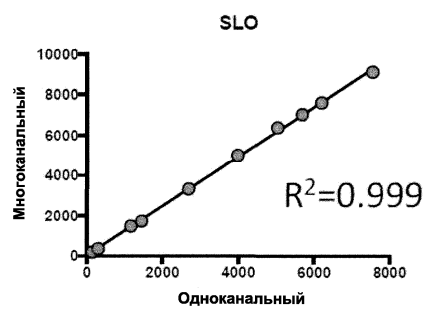
Фиг. 7

>SpnA 28-854

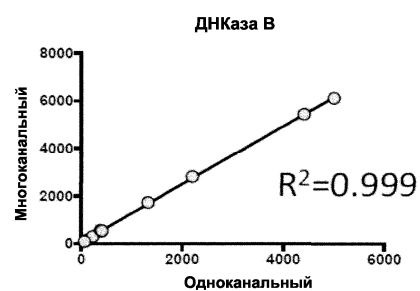
```

RQNLTYANEIVTQRPKRESV ISDKSNFPVISPYLASVDFGERKTELPDPKGVKVTTEQSTIAQVRKGPPEERFYTVTGTKITSVINGWGGYGFYIQDS
EGIGLYVYPQKDLGYSKGDIVQLTGLTRFRKGLQLQVTAHKKLELSPPTSVEAVISELETTTPSTLVKLSHVTGELSTDQYNNTSFLVRDSD
GKSI VVHIDHRTGVKGDVVTKISQGDILNLTAILSV DQQLRPFPSLEQLEVVKVTSSNSDASRNIVKIGEIQGASHTSPLLKAVTVEQVV
VTYLDSTHFYVQDLNGDGLATSDGIRVFAKNAKQVGVVLTISGEVEEFTGGRGYEERKQTDLTITQIVAKAVTKGTAVPSPVLVGLKDRIPAPA
NIIDNDGLRVDFPEEDAIDYWESMEGMLVAVDDAKILGPMKNEIYVLPGSSTRPLNNSGGVLLPANSYNTDVI PVLFKKGKQI IKAGDSYKGRLA
GPVSYSGNYKVFVDDSKNMPSLMDGHLKPEKTNLQKDL SKLSIASYNIENFSANPSSTKDEKVKRIAESFIHDLNAPDI IGLIEVQDNNGPTDDG
TTDATQSAQRLLIDAIKLLGGPTYRYVDIAPENNV DGGQPGGNI RTGFLYQPERVLSLSDKPKGGARDALTWVNGELNLSVGRIDPPTNAAWKDVKLS
AAEPIFQGRKVVVANHLNSKRGDNALYGCQPVTFKSEQRHVLANMLAQFAKEGAKHQANIVMLGDFNDFEFTKTIQLIEEGDMVNLVSRHDIS
DRYSYFHQGNQTLDNILVSRHLLDHYEFDMVHVNSPFMEAHGRASDHDP LLLQLSFSK
    
```

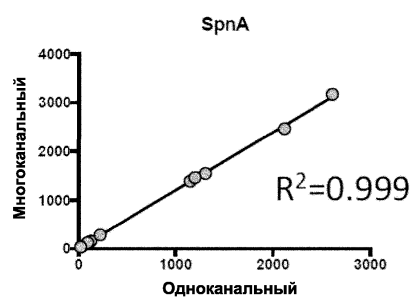
Фиг. 8



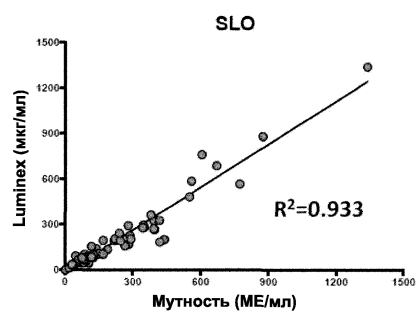
Фиг. 9А



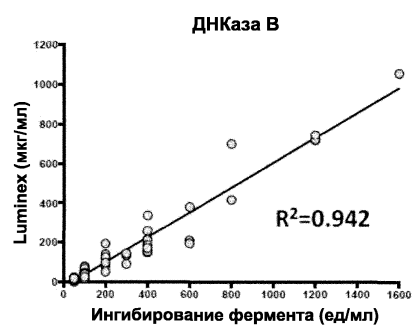
Фиг. 9В



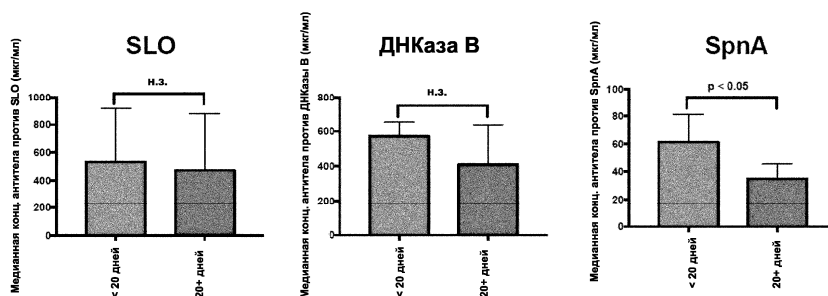
Фиг. 9С



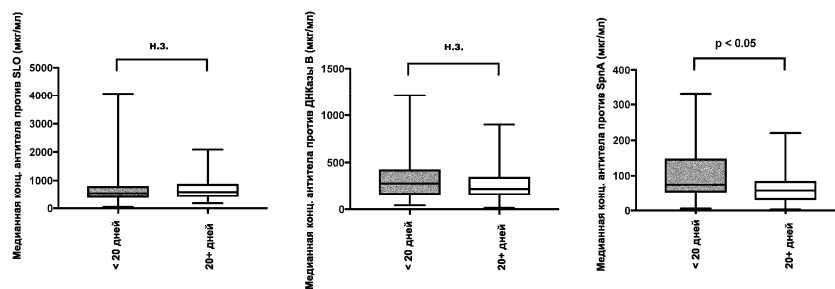
Фиг. 10А



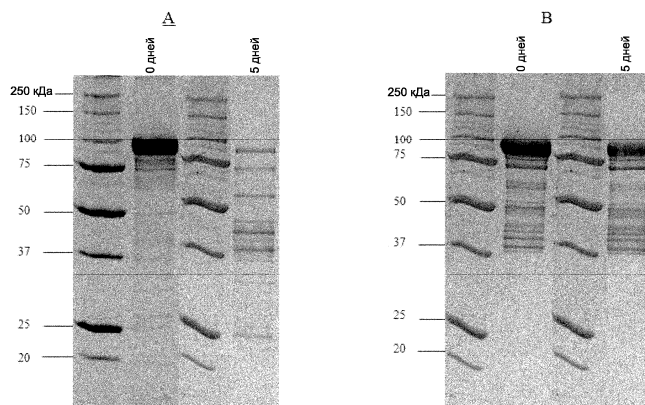
Фиг. 10В



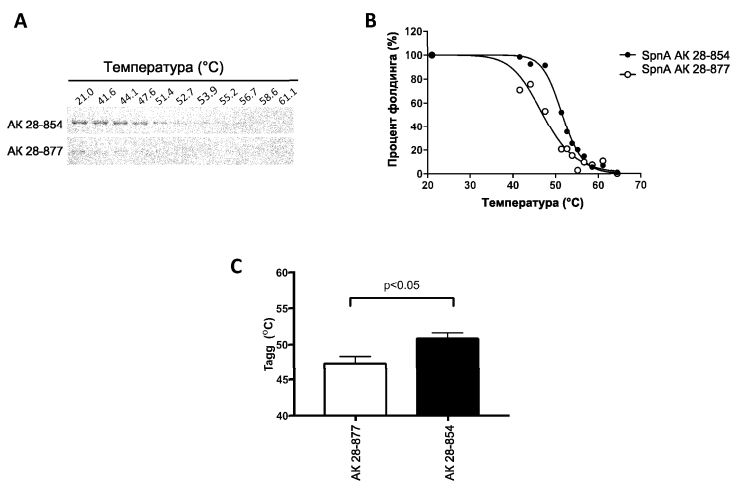
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

