(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292153 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.02

(22) Дата подачи заявки
2021.03.19

(51) Int. Cl. ***C12Q 1/28*** (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) СПОСОБ ТРИАЖА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕСКЛЕТОЧНЫХ НУКЛЕОСОМНЫХ УРОВНЕЙ

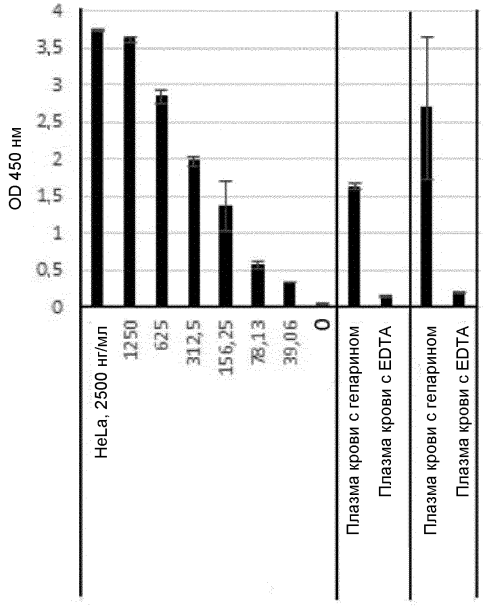
(31) **2004100.0; 202010265531.9; 2006723.7; 2010446.9; 2014263.4; 2016403.4; 2018835.5; 2100769.5**
(32) **2020.03.20; 2020.04.07; 2020.05.06; 2020.07.07; 2020.09.10; 2020.10.16; 2020.11.30; 2021.01.20**
(33) **GB; CN; GB; GB; GB; GB; GB; GB**
(86) **PCT/EP2021/057096**
(87) **WO 2021/186037 2021.09.23**

(71) Заявитель:
БЕЛЬДЖИАН ВОЛИШН СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
Экклстон Марк Эдвард, Микаллеф Жакоб Винсен, Террелл Джейсон Брэдли (BE)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к применению уровней бесклеточных нуклеосом для идентификации пациентов с риском развития ассоциированной с нетозом неблагоприятной реакции на инфекцию. Способы применяют для мониторинга прогрессирования заболевания и определения риска неблагоприятного исхода у пациента, страдающего инфекцией.



202292153 A1

202292153 A1

СПОСОБ ТРИАЖА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕСКЛЕТОЧНЫХ НУКЛЕОСОМНЫХ УРОВНЕЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к применению бесклеточных нуклеосом в качестве биомаркеров в образцах биологических жидкостей у пациентов с инфекцией, в частности, для обнаружения пациентов с высоким риском развития нетоз-ассоциированной неблагоприятной реакции на инфекцию. Оно также относится к применению антител к нуклеосоме в качестве терапевтических антител для лечения нетоз-ассоциированных состояний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Грипп распространяется по всему миру в виде ежегодных вспышек, приводящих к приблизительно трем-пяти миллионов случаев тяжелого заболевания и 290000-650000 смертей. Совсем недавно появление и быстрое прогрессирование новой инфекции, COVID-19, переросло в статус пандемии. Некоторые инфекции приводят к острому респираторному синдрому (ARS), острому респираторному дистресс-синдрому (ARDS) или тяжелому острому респираторному синдрому (SARS), которые представляют собой потенциально смертельные прогрессирующие заболевания, требующими медицинского лечения. Вспышки инфекций и пандемии создают серьезную нагрузку на международные службы здравоохранения, поэтому способы триажа пациентов для обнаружения тех, кому с наибольшей вероятностью потребуется стационарное вмешательство, имеют решающее значение, помогая медицинским работникам расставлять приоритеты для пациентов, спасать жизни и более эффективно справляться с более высокими требованиями к медицинским услугам.

COVID-19, грипп и другие инфекции могут прогрессировать до осложнений, связанных с нетом, которые могут быть тяжелыми и могут приводить к летальному исходу. Такие осложнения включают сепсис, опасную для жизни органную дисфункцию, которая может возникнуть как осложнение инфекции. Способы лечения несоответствующего нетоза, обнаружения индивидуумов с высоким риском осложнений, связанных с нетозом, мониторинга развития таких осложнений у лиц, нуждающихся в таком лечении, мониторинга эффективности лечения и мониторинга прогрессирования такого заболевания в настоящее время отсутствуют.

Holdenrieder *et al.*, Int. J. Cancer (2001) 95: 114–120 ранее описали обнаружение уровня нуклеосом в образцах сыворотки крови пациентов с доброкачественными и

злокачественными заболеваниями. Эпигенетический состав циркулирующих бесклеточных нуклеосом с точки зрения их модификации гистонов, вариантов гистонов, модификации ДНК и содержания аддуктов также был исследован в качестве биомаркеров рака на основе крови, см. WO 2005/019826, WO 2013/030577, WO 2013/030579 и WO 2013/084002.

В данной области техники сохраняется потребность в обеспечении эффективного лечения состояний, связанных с нетозом, а также в простых, экономически эффективных способах обнаружения и определения приоритетности лиц, у которых вероятно развитие осложнений, связанных с нетозом, с неблагоприятным прогнозом при инфицировании, а также для мониторинга лечения и прогрессирования заболевания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1. Результаты иммуноанализа нуклеосом, полученных из внеклеточной нейтрофильной ловушки (NET) , в образцах плазмы крови с EDTA и гепарином, взятых у 2 здоровых добровольцев. Образцы с EDTA содержат низкие уровни нуклеосомного материала, полученного из NET. В отличие от этого, гепарин индуцирует образование NET, а образцы плазмы крови с гепарином содержат высокие уровни нуклеосом, полученных из NET.

Фиг. 2. Результаты электрофореза биоанализатора нуклеосом, полученных из NET, в образцах плазмы крови с EDTA и плазмы крови с гепарином, взятых у 2 здоровых добровольцев. Образцы с EDTA содержат низкие уровни как мононуклеосом, так и нуклеосомного материала, полученного из NET. В отличие от этого, гепарин индуцирует образование NET, и образцы плазмы с гепарином содержат низкие уровни мононуклеосом (пик через примерно 60 секунд), но высокие уровни индуцированных нуклеосом, полученных из NET (широкий пик через примерно 110 секунд). Узкие пики через примерно 43 секунды и через примерно 110 секунд представляют собой образцы ДНК, добавленные для эталонных целей.

Фиг. 3. Уровни нуклеосом, содержащих изоформу гистонов H3.1, измеренные у 50 пациентов, госпитализированных с симптомами инфекции COVID-19, в том числе у 34 пациентов с симптомами, которые имели положительный результат в отношении инфекции COVID-19 на основе ПЦР, и у 16 – пациентов с симптомами, которые имели отрицательный результат на основе ПЦР, а также у 50 нормальных субъектов, не проявляющих симптомов заболевания.

Фиг. 4. Уровни нуклеосом, содержащих изоформу гистонов H3.1, измеренные у 15 пациентов с ПЦР-подтвержденной инфекцией COVID-19, в том числе: 5 образцов, взятых у пациентов, посещающих амбулаторный прием в больнице или при поступлении в

отделение неотложной помощи больницы (ER); 3 пациента, госпитализированные в обычные палаты; 2 пациента, госпитализированные в отделение интенсивной терапии (ICU), которым потребовалась респираторная поддержка, и они выжили; и 4 пациента, госпитализированные в ICU, которым потребовалась респираторная поддержка, и они умерли.

Фиг. 5. Уровни нуклеосом, содержащих гистоновую модификацию H3R8Cit, измеренные у 15 пациентов с ПЦР-подтвержденной инфекцией COVID-19, в том числе: 5 образцов, взятых у пациентов, посещающих амбулаторный прием в больнице или при поступлении в ER больницы; 3 пациента, госпитализированные в обычные палаты; 2 пациента, госпитализированные в ICU, которым потребовалась респираторная поддержка, и они выжили; и 4 пациента, госпитализированные в отделение интенсивной терапии, которым потребовалась респираторная поддержка, и они умерли.

Фиг. 6. Результаты эксперимента, описанного в Примере 12, показывают средние уровни нуклеосом, содержащих изоформу гистонов H3.1, измеренные у 16 свиней, индуцированных сепсисом, помещенных на плазмаферез. У 9 свиней плазму крови пропускали через картридж, содержащий вещества, связывающие NET (обработанные, заштрихованные столбцы), а у 7 свиней плазму крови пропускали через контрольный картридж, который не содержал вещества, связывающего NET (контроль, не заштрихованные столбцы).

Фиг. 7. Результаты эксперимента, описанного в Примере 12 и показанного на Фиг. 6, но для уровней у отдельных тестируемых субъектов.

Фиг. 8. Уровни H3.1-нуклеосом измеряли у субъектов-людей с диагнозом сепсис и у здоровых субъектов-людей.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом представлен способ мониторинга прогрессирования заболевания у субъекта, страдающего инфекцией, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента;

(ii) повторение стадии (i) один или несколько раз; и

(iii) применение любых изменений уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента для мониторинга прогрессирования инфекции у субъекта.

В соответствии с дополнительным аспектом представлен способ определения риска развития или прогрессирования медицинского осложнения у субъекта, страдающего

инфекцией, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня обнаруженных бесклеточных нуклеосом для определения вероятности развития или прогрессирования медицинского осложнения у указанного субъекта.

В соответствии с дополнительным аспектом представлен способ определения риска неблагоприятного исхода у субъекта, страдающего инфекцией, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня обнаруженных бесклеточных нуклеосом для определения вероятности неблагоприятного исхода у указанного субъекта,

при этом субъекту с высокой вероятностью неблагоприятного исхода назначают проведение медицинского вмешательства.

В соответствии с дополнительным аспектом представлен способ выбора субъекта, страдающего инфекцией, который нуждается в медикаментозном лечении медицинского осложнения инфекции, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня обнаруженных бесклеточных нуклеосом для указания наличия, прогрессирования или развития медицинского осложнения, требующего лечения, у указанного субъекта.

В предпочтительных вариантах осуществления инфекция представляет собой грипп, поражающий дыхательные пути, или коронавирусную инфекцию, а медицинское осложнение представляет собой ARS, ARDS или SARS или пневмонию. Таким образом, в одном варианте осуществления предлагается способ обнаружения субъекта, нуждающегося в медикаментозном лечении пневмонии, ARS, ARDS или SARS, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня бесклеточных нуклеосом в качестве индикатора того, что субъект нуждается в медикаментозном лечении пневмонии, ARS, ARDS или SARS.

В предпочтительных вариантах осуществления инфекция представляет собой грипп, поражающий дыхательные пути, или коронавирусную инфекцию, а медицинское осложнение представляет собой ARS, ARDS, SARS или пневмонию.

В других предпочтительных вариантах осуществления инфекция представляет собой сепсис. Таким образом, в одном варианте осуществления представлен способ обнаружения субъекта, нуждающегося в медикаментозном лечении сепсиса или септического шока, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня бесклеточных нуклеосом в качестве индикатора того, что субъект нуждается в медикаментозном лечении сепсиса или септического шока.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения представлен способ мониторинга инфекции у субъекта, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента;

(ii) повторение обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента в биологической жидкости, полученной от субъекта один или несколько раз;

(iii) применение любых изменений уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента для мониторинга прогрессирования инфекции у субъекта.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Нуклеосомы высвобождаются в кровоток при фрагментации хроматина при гибели клеток. Многие инфекции, такие как вирусные инфекции, инициируют гибель клеток с помощью различных механизмов (связывание и проникновение клеток, активация эндосомального TLR3 и экспрессия генов), за счет чего увеличивается количество циркулирующих нуклеосом в крови (Danthi *et al.*, Annu. Rev. Virol. (2016) 3: 533–53). Кроме того, инфекции могут индуцировать нетоз, при этом посттрансляционные модификации гистонов, такие как ацетилирование или гиперцитруллинирование гистонов H3 и H4 (Wang Y *et al.*, J. Cell Biol. (2009) 184(2): 205–213), способствуют деконденсации хроматина, который совместно высвобождается в кровоток в качестве реакции первой линии на инфекцию. Однако внеклеточные нуклеосомы и внеклеточные нейтрофильные ловушки (NET) могут вызывать серьезные осложнения, если их не устранить быстро. Например,

связывание нуклеосом с гломерулярной мембраной связано с повреждением почек при волчанке (Kalaaji *et al.*, Kidney Int. (2007) 71(7): 665-672), в то время как NET, как было показано, усиливают повреждение легких во время вирусной пневмонии (Ashar *et al.*, Am. J. Pathol. (2018) 188(1): 135-148). Действительно, направленная на хозяина токсичность NET ассоциирована с респираторным дистрессом, окклюзией узких дыхательных путей, повреждением эндотелиальных и эпителиальных клеток, воспалительной реакцией и образованием тромбов и другими патологиями (Marcos *et al.*, Nat. Med. (2010) 16: 1018–23; Hoeksema *et al.*, Future Microbiol. (2016) 11: 441–53).

Большинство субъектов, инфицированных вирусом гриппа или коронавирусом, переносят заболевание в легкой форме. Однако некоторые подгруппы населения, в том числе пожилые люди в возрасте старше 60 лет и лица с сопутствующими заболеваниями, такими как диабет, хронические заболевания легких и особенно хронические заболевания сердца, подвержены риску тяжелых последствий, включая ARS, SARS, пневмонию и смерть. Точный механизм, с помощью которого грипп или коронавирусная инфекция приводят к осложнениям, включая пневмонию, не ясен, но считается, что он вызван гипериммунной реакцией на вирусную инфекцию, при которой избыточные NET способствуют острому повреждению легких, ведущему к пневмонии, и, в худших случаях, смерти.

В настоящем изобретении используются повышенные уровни бесклеточных нуклеосом, включая NET, для прогнозирования тяжести заболевания и исхода инфекционного заболевания.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом представлен способ определения риска неблагоприятного исхода у субъекта, страдающего инфекцией, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня обнаруженных бесклеточных нуклеосом для определения вероятности неблагоприятного исхода у указанного. Способ может быть применен так, что субъекту с высокой вероятностью неблагоприятного исхода назначают медицинского вмешательства.

В одном варианте осуществления представлен способ определения риска неблагоприятного исхода у субъекта, страдающего инфекцией, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня материала внеклеточной нейтрофильной ловушки или ее компонента; и

(ii) применение уровня обнаруженного материала внеклеточной ловушки нейтрофилов для определения вероятности неблагоприятного исхода у указанного субъекта.

Нуклеосома является основной единицей структуры хроматина и состоит из белкового комплекса из восьми высококонсервативных коровых гистонов (состоящих из пары гистонов H2A, H2B, H3 и H4). Вокруг этого комплекса обернуто примерно 146 пар оснований ДНК. Другой гистон, H1 или H5, выступает в качестве линкера и участвует в уплотнении хроматина. ДНК оборачивается вокруг последовательных нуклеосом в структуре, часто напоминающей «бусинки на нитке», и это формирует базовую структуру открытого или эухроматина. В компактном или гетерохроматине эта нить закручена и сверхзакручена в закрытую и сложную структуру (Herranz and Esteller, Methods Mol. Biol. (2007) 361: 25-62).

Ссылки на «нуклеосомы» могут относиться к «бесклеточным нуклеосомам», если они обнаружены в образцах биологических жидкостей. Следует понимать, что термин «бесклеточная нуклеосома» во всем данном документе предназначен для включения любого бесклеточного фрагмента хроматина, который включает одну или несколько нуклеосом.

Следует понимать, что бесклеточная нуклеосома может быть обнаружена путем связывания с ее компонентом. Используемый в данном документе термин «ее компонент» относится к части нуклеосомы, *т.е.* необходимость обнаруживать всю нуклеосому отсутствует. Компонент бесклеточных нуклеосом может быть выбран из группы, состоящей из: гистонового белка (*т.е.* гистона H1, H2A, H2B, H3 или H4), посттрансляционной модификации гистона, варианта или изоформы гистона, белка, связанного с нуклеосомой (*т.е.* нуклеосомно-белкового аддукта), фрагмента ДНК, ассоциированного с нуклеосомой, и/или модифицированного нуклеотида, ассоциированного с нуклеосомой. Например, их компонентом может быть гистон (изоформа) H3.1 или гистон H1 или ДНК.

Способы и варианты применения настоящего изобретения могут измерять уровень (бесклеточных) нуклеосом *как таковых*. Ссылки на «нуклеосомы *как таковые*» относятся к общему уровню или концентрации нуклеосом, присутствующих в образце, независимо от каких-либо эпигенетических особенностей, которые нуклеосомы могут включать или не включать. Обнаружение общего уровня нуклеосом обычно включает обнаружение гистонового белка, общего для всех нуклеосом, такого как гистон H4. Следовательно, нуклеосомы *сами по себе* могут быть измерены путем обнаружения корового гистонового белка, такого как гистон H4. Как описано в данном документе, гистоновые белки образуют

структурные единицы, известные как нуклеосомы, которые используются для упаковки ДНК в эукариотических клетках.

Нормальная скорость обновления клеточной популяции у взрослых людей включает создание в результате клеточного деления огромного количества клеток ежедневно и гибель такого же количества клеток, в основном путем апоптоза. В процессе апоптоза хроматин расщепляется на мононуклеосомы и олигонуклеосомы, которые высвобождаются из клеток. Сообщается, что в нормальных условиях уровни циркулирующих нуклеосом, обнаруживаемые у здоровых субъектов, низкие. Повышенные уровни обнаруживаются у субъектов с различными состояниями, включая многие виды рака, аутоиммунные заболевания, воспалительные состояния, инсульт и инфаркт миокарда (Holdenreider & Stieber, Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. (2009) 46(1): 1–24).

Предыдущие методы ELISA нуклеосом применялись в первую очередь в клеточных культурах, как правило, в качестве метода обнаружения апоптоза (Salgame *et al.*, Nucleic Acids Res. (1997) 25(3): 680-681; Holdenrieder *et al.* (2001) *выше*; van Nieuwenhuijze *et al.*, Ann. Rheum. Dis. (2003) 62: 10–14), но также используются для измерения циркулирующих бесклеточных нуклеосом в сыворотке крови и плазме крови (Holdenrieder *et al.* (2001)). Уровни бесклеточных нуклеосом в сыворотке крови и плазме крови, выбрасываемых в кровоток умирающими клетками, измерялись методами ELISA в исследованиях ряда различных видов рака для оценки их использования в качестве потенциального биомаркера.

Бесклеточная нуклеосома может представлять собой мононуклеосомы, олигонуклеосомы, составную частью более крупного фрагмента хроматина или составную часть NET или их смесь.

Мононуклеосомы и олигонуклеосомы могут быть обнаружены с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), и сообщалось о нескольких методах (например, Salgame *et al.* (1997); Holdenrieder *et al.* (2001); van Nieuwenhuijze *et al.* (2003)). В этих анализах обычно используют антитело к гистону (например, антитело к H2B, антитело к H3 или антитело к H1, H2A, H2B, H3 и H4) в качестве захватывающего антитела и антитело к ДНК или комплексное антитело к H2A-H2B-ДНК в качестве детектирующего антитела.

Циркулирующие нуклеосомы не являются гомогенной группой комплексов белок-нуклеиновая кислота. Скорее, они представляют собой гетерогенную группу фрагментов хроматина, возникающих в результате переваривания хроматина при гибели клетки, и включают огромное разнообразие эпигенетических структур, включая определенные изоформы (или варианты) гистонов, посттрансляционные модификации гистонов, нуклеотиды или модифицированные нуклеотиды и белковые аддукты. Специалистам в

данной области техники будет ясно, что повышение уровня нуклеосом будет ассоциировано с повышением содержания некоторых циркулирующих субпопуляций нуклеосом, содержащих определенные эпигенетические сигналы, включая нуклеосомы, содержащие определенные изоформы гистонов (или варианты), содержащие определенные посттрансляционные модификации гистонов, содержащие определенные нуклеотиды или модифицированные нуклеотиды и содержащие определенные белковые аддукты. Анализы этих типов фрагментов хроматина известны в данной области техники (например, см. WO 2005/019826, WO 2013/030579, WO 2013/030578, WO 2013/084002, которые включены в данный документ посредством ссылки).

Ряд белков встречается в NET, которые прямо или косвенно присоединяются к нуклеосомам. Эти белки включают без ограничения миелопероксидазу (MPO), нейтрофильную эластазу (NE), лактотрансферрин, азуроцидин, катепсин G, лейкоцитарную протеиназу 3, лизоцим C, нейтрофильный дефенсин 1, нейтрофильный дефенсин 3, антиген дифференцировки ядер миелоидных клеток, кальций-связывающий белок S100 A8, кальций-связывающий белок S100 A9, кальций-связывающий белок S100 A12, актин β, актин γ, альфа-актин, пластин-2, цитокератин-10, каталазу, альфа-енолазу и транскетолазу (Urban *et al.*, PLOS Pathogens. (2009) 10: e1000639). Любой нуклеосомно-белковый аддукт, встречающийся в NET, является полезным аддуктом для обнаружения повышенных уровней NET в способах по настоящему изобретению. C-реактивный белок (CRP) также может быть присоединен к нуклеосомам в NET, и поэтому аддукт нуклеосома-CRP является полезным аддуктом для обнаружения повышенных уровней NET в способах по настоящему изобретению.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения используемый аддукт представляет собой аддукт MPO-нуклеосомы или аддукт NE-нуклеосомы.

В одном варианте осуществления компонент бесклеточной нуклеосомы содержит эпигенетический признак бесклеточной нуклеосомы.

Биомаркером, используемым в способах по настоящему изобретению, может быть уровень бесклеточных нуклеосом *как таковых* и/или эпигенетический признак бесклеточных нуклеосом. Следует понимать, что термины «эпигенетическая сигнальная структура» и «эпигенетический признак» используются в данном документе взаимозаменяемо. Они относятся к определенным особенностям нуклеосомы, которые могут быть обнаружены. В одном варианте осуществления эпигенетический признак нуклеосомы выбран из группы, состоящей из: посттрансляционной модификации гистонов, изоформ гистонов, модифицированных нуклеотидов и/или белков, связанных с

нуклеосомой в нуклеосомно-белковом аддукте.

В одном варианте осуществления эпигенетический признак нуклеосомы включает один или несколько вариантов или изоформ гистонов. Эпигенетическим признаком бесклеточной нуклеосомы может быть изоформа гистонов, такая как изоформа гистонов коровой нуклеосомы, в частности, изоформа гистона H3. Термины «вариант гистона» и «изоформа гистона» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Структура нуклеосомы также может варьироваться за счет включения альтернативных изоформ или вариантов гистонов, которые представляют собой разные гены или продукты сплайсинга и имеют разные аминокислотные последовательности. В данной области техники известны многие изоформы гистонов. Варианты гистонов можно разделить на несколько семейств, которые подразделяются на отдельные типы. Нуклеотидные последовательности большого количества вариантов гистонов известны и общедоступны, например, в базе данных гистонов Национального института исследования генома человека NHGRI (Mariño-Ramírez *et al*. The Histone Database: an integrated resource for histones and histone fold-containing proteins. *Database* Vol.2011. and http://genome.nhgri.nih.gov/histones/complete.shtml), базе данных GenBank (генетическая последовательность NIH), базе данных нуклеотидных последовательностей EMBL и банке данных ДНК Японии (DDBJ). Например, варианты гистона H2 включают H2A1, H2A2, mH2A1, mH2A2, H2AX и H2AZ. В другом примере изоформы гистонов H3 включают H3.1, H3.2, H3.3 и H3t.

В одном варианте осуществления изоформа гистона представляет собой H3.1.

Структура нуклеосом может варьироваться в зависимости от посттрансляционной модификации (PTM) гистоновых белков. PTM гистоновых белков обычно возникает на хвостах основных гистонов, и общие модификации включают ацетилирование, метилирование или убиквитинирование остатков лизина, а также метилирование или цитруллинирование остатков аргинина и фосфорилирование остатков серина и многие другие. В данной области техники известно множество модификаций гистонов, и их число увеличивается по мере обнаружения новых модификаций (Zhao and Garcia (2015) Cold Spring Harb Perspect Biol, 7: a025064). Следовательно, в одном варианте осуществления эпигенетический признак бесклеточной нуклеосомы может представлять собой посттрансляционную модификацию гистонов (PTM). PTM гистонов может представлять собой PTM гистонов коровой нуклеосомы, например, H3, H2A, H2B или H4, в частности, H3, H2A или H2B. В частности, PTM гистонов представляет собой PTM гистона H3. Примеры таких PTM описаны в WO 2005/019826.

Например, посттрансляционная модификация может включать ацетилирование,

метилирование, которое может представлять собой моно-, ди- или триметилирование, фосфорилирование, рибозилирование, цитруллинирование, убиквитинирование, гидроксилирование, гликозилирование, нитрозилирование, глутаминирование и/или изомеризацию (см. Ausio (2001) Biochem Cell Bio 79: 693). В одном варианте осуществления PTM гистонов выбрана из цитруллинирования или рибозилирования. В дополнительном варианте осуществления PTM гистонов представляет собой цитруллин H3 (H3cit) или цитруллин H4 (H4cit). В еще одном дополнительном варианте осуществления PTM гистонов представляет собой H3cit.

В одном варианте осуществления PTM гистонов представляет собой рибозилирование, также называемое АДФ-рибозилированием. Посттрансляционное АДФ-рибозилирование гистонов нуклеосом, занимающих промоторы маркеров воспалительного ответа в макрофагах, стимулируется воздействием липополисахаридов, что приводит к повышенной транскрипции и может обладать противовирусными свойствами. Более того, все члены семейства коронавирусов содержат высококонсервативный макродомен в неструктурном белке 3 (nsp3), который регулирует посттрансляционное АДФ-рибозилирование путем ферментативного удаления ковалентно присоединенной АДФ-рибозы из белков-мишеней. Штаммы рекомбинантного коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), содержащие мутированные макродомены со сниженной активностью де-АДФ-рибозилирования nsp3, являются менее инфекционными и стимулируют ответ раннего усиленного интерферона (IFN), стимулированного интерфероном гена (ISG) и провоспалительного цитокина. Следовательно, ожидается, что измененные уровни циркулирующих АДФ-рибозилированных нуклеосом, высвобождаемых из макрофагов, будут применимы в способах по настоящему изобретению.

Также может быть обнаружена группа или класс родственных посттрансляционных модификаций гистонов (а не одна модификация). Типичный пример без ограничения может включать иммуноанализ с 2 сайтами, в котором используется одно антитело или другое селективное связывающее вещество, направленное на связывание с нуклеосомами, и одно антитело или другое селективное связывающее вещество, направленное на связывание рассматриваемой группы модификаций гистонов. Примеры таких антител, направленных на связывание с группой модификаций гистонов, могут включать без ограничения в иллюстративных целях, антитела ко всеми видам форм ацетилирования (например, антитело ко всем видам ацетила H4 [H4panAc]), антитела к формам цитруллинирования или антитела к формам убиквитинирования.

В одном варианте осуществления эпигенетический признак нуклеосомы включает

одну или несколько модификаций ДНК. В дополнение к эпигенетической передаче сигналов, опосредованной изоформой нуклеосомного гистона и составом PTM, нуклеосомы также различаются по своему нуклеотидному и модифицированному нуклеотидному составу. Некоторые нуклеосомы могут содержать больше остатков 5-метилцитозина (или остатков 5-гидроксиметилцитозина, или других нуклеотидов, или модифицированных нуклеотидов), чем другие нуклеосомы. В одном варианте осуществления модификация ДНК выбрана из 5-метилцитозина или 5-гидроксиметилцитозина.

В одном варианте осуществления эпигенетический признак нуклеосомы включает один или несколько белково-нуклеосомных аддуктов или комплексов. Еще одним типом циркулирующей субпопуляции нуклеосом являются нуклеосомно-белковые аддукты. Уже много лет известно, что хроматин включает большое количество негистоновых белков, связанных с входящей в его состав ДНК и/или гистонами. Эти ассоциированные с хроматином белки относятся к широкому спектру типов и выполняют множество функций, включая факторы транскрипции, факторы усиления транскрипции, факторы репрессии транскрипции, ферменты, модифицирующие гистоны, белки репарации повреждений ДНК и многие другие. Эти фрагменты хроматина, включая нуклеосомы и другие негистоновые белки хроматина или ДНК и другие негистоновые белки хроматина, описаны в данной области техники.

В одном варианте осуществления белок, присоединенный к нуклеосоме (и который, следовательно, может быть использован в качестве биомаркера), выбран из фактора транскрипции, белка группы с высокой подвижностью или фермента, модифицирующего хроматин. Ссылки на «фактор транскрипции» относятся к белкам, которые связываются с ДНК и регулируют экспрессию генов, стимулируя (т.е. активаторы) или подавляя (т.е. репрессоры) транскрипцию. Факторы транскрипции содержат один или несколько ДНК-связывающих доменов (DBD), которые прикрепляются к определенным последовательностям ДНК, прилегающим к генам, которые они регулируют. Все циркулирующие нуклеосомы и фрагменты нуклеосом, типы или подгруппы, описанные в данном документе, могут быть использованы в настоящем изобретении.

Следует понимать, что в способах и вариантах применения изобретения можно обнаружить более одного эпигенетического признака бесклеточных нуклеосом. В качестве комбинированного биомаркера можно использовать несколько биомаркеров. Таким образом, в одном варианте осуществления применение включает более одного эпигенетического признака бесклеточных нуклеосом в качестве комбинированного биомаркера. Эпигенетические признаки могут быть одного типа (*например*, PTM,

изоформы гистонов, нуклеотиды или белковые аддукты) или различных типов (*например*, PTM в сочетании с изоформой гистонов). Например, может быть обнаружена посттрансляционная модификация гистона и вариант гистона (*т.е.* обнаружено более одного типа эпигенетического признака). В качестве альтернативы или в качестве дополнения обнаруживается более одного типа посттрансляционной модификации гистонов или обнаруживается более одного типа изоформы гистонов. В одном аспекте применение включает посттрансляционную модификацию гистонов и изоформы гистонов в качестве комбинированного биомаркера в образце для диагностики, обнаружения, выбора лечения, прогнозирования или мониторинга инфекции. В одном варианте осуществления комбинированный биомаркер представляет собой H3.1 и H3cit. В альтернативном варианте осуществления комбинированный биомаркер представляет собой H3.1 и H4cit.

Термин «биомаркер» означает отличительный биологический или полученный биологическим путем индикатор процесса, явления или состояния. Биомаркеры можно использовать в способах диагностики, например, клиническом скрининге и оценке прогноза, а также мониторинге результатов терапии, обнаружении пациентов, которые с наибольшей вероятностью ответят на конкретное терапевтическое лечение, скрининг и разработку лекарственных средств. Биомаркеры и их применение ценны для идентификации новых лекарственных средств и для открытия новых мишеней для лекарственного лечения.

Биомаркеры также применимы в качестве сопутствующих диагностических продуктов для отбора пациентов, подходящих для лечения конкретной терапией. Мы продемонстрировали в данном документе, что тесты на уровни циркулирующих нуклеосом или уровни нуклеосом, содержащих определенные эпигенетические сигналы или структуры, являются применимыми сопутствующими продуктами для терапии NET или заболеваний, связанных с нетозом.

Способы по настоящему изобретению связаны с определением пациента с риском неблагоприятного исхода. Неблагоприятные исходы включают смертность и/или острое явление, требующее немедленной медицинской помощи, например, госпитализации (т.е. стационарного лечения) и/или хирургического вмешательства. Для многих пациентов инфекции преодолеваются их собственной иммунной системой без медицинского вмешательства. Однако у ряда пациентов инфекции могут продолжаться или усиливаться, не будучи преодоленными иммунной системой, или собственный иммунный ответ пациента на инфекцию может привести к неблагоприятному исходу. Например, неблагоприятный исход может включать острое коронарное или сердечное явление (такое как инфаркт миокарда и/или инсульт), острую поли- или моноорганную недостаточность

(такую как почечная недостаточность, печеночная недостаточность и/или сердечная недостаточность), начало изнурительного острого состояния и/или острого респираторного заболевания (такого как пневмония, гиповентиляция/брадипноэ, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), тяжелый острый респираторный синдром (SARS), бронхиолит и/или бронхит). Таким образом, в одном варианте осуществления способы, описанные в данном документе, определяют пациента или субъекта с риском развития острого респираторного заболевания. В другом варианте осуществления острое респираторное заболевание представляет собой пневмонию. В другом варианте осуществления острое респираторное состояние представляет собой гиповентиляцию/брадипноэ. В еще одном варианте осуществления острое респираторное заболевание представляет собой острый респираторный дистресс-синдром (ARDS) и/или тяжелый острый респираторный синдром (SARS).

Определение пациенту риска неблагоприятного исхода может предусматривать определение ближайшего или краткосрочного риска или может предусматривать определение среднесрочный риск. Ближайший или краткосрочный риск включает в себя то, что у пациента может развиться неблагоприятный исход в течение 30 дней, например, в течение 2 недель или 14 дней, в течение 1 недели или 7 дней, или в течение 5 дней или менее после появления симптомов или положительного диагноза. Такой ближайшие или краткосрочный риск может также включать в себя то, что у пациента может развиться неблагоприятный исход в течение 30 дней, например, в течение 2 недель или 14 дней, в течение 1 недели или 7 дней, или в течение 5 дней или менее после осуществления способов, описанных в данном документе. Пример краткосрочного риска включает развитие связанных с NET осложнений инфекции COVID, требующих стационарного лечения. Среднесрочный риск включает в себя то, что у пациента может развиться неблагоприятный исход более чем через 30 дней после появления симптомов, положительного диагноза и/или осуществления способов, описанных в данном документе. Пример среднесрочного риска включает развитие так называемого длительного COVID, при котором последствия инфекции COVID могут продолжаться в течение многих месяцев. Таким образом, в одном варианте осуществления способы, описанные в данном документе, назначают пациенту или субъекту с риском развития неблагоприятного исхода в течение 2 недель или 14 дней после появления симптомов или положительного диагноза. В другом варианте осуществления способы, описанные в данном документе, определяют риск развития неблагоприятного исхода в течение 1 недели или 7 дней после появления симптомов или положительного диагноза. В еще одном варианте осуществления способы, описанные в данном документе, определяют риск развития неблагоприятного исхода в

течение 5 дней после появления симптомов или положительного диагноза.

Таким образом, в другом аспекте настоящего изобретения представлен способ обнаружения субъекта с инфекцией, требующей стационарного лечения, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня обнаруженных бесклеточных нуклеосом для определения необходимости госпитализации субъекта для лечения.

Следует понимать, что способы по настоящему изобретению также можно использовать для обнаружения пациентов, которым не требуется стационарное лечение, т.е. с использованием обнаруженного уровня бесклеточных нуклеосом для определения того, следует ли госпитализировать субъекта для лечения.. Этот вариант по настоящему изобретению поможет обнаружить пациентов, которых можно выписать раньше, если они уже были госпитализированы.

Способы и варианты применения, описанные в данном документе, могут быть протестированы на образцах биологических жидкостей, в частности, на образцах крови, сыворотки крови или плазмы крови. Предпочтительно используют образцы плазмы крови. Образцы плазмы крови можно собирать в пробирки для сбора, содержащие один или несколько антикоагулянтов, таких как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), гепарин или цитрат натрия, в частности, EDTA.

Инфекции

Способы по настоящему изобретению находят особое применение при лечении инфекционных вспышек. Инфекции могут быть вызваны различными возбудителями и факторами окружающей среды. В одном варианте осуществления инфекция представляет собой вирусную, бактериальную, грибковую или микробную инфекцию. Бактериальные инфекции могут включать микобактериальные, пневмококковые и гриппозные инфекции, такие как инфекции (например, пневмония), вызванные Streptococcus pneumoniae, Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis, Haemophilus influenzae и Staphylococcus aureus. В дополнительном варианте осуществления инфекция представляет собой вирусную инфекцию. Вирусные инфекции могут включать инфекции, вызванные респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ), вирусом гриппа типа А, вирусом гриппа типа В и коронавирусами (например, COVID-19).

Инфекцию можно определить по ткани, пораженной болезнью. Например, заболевание может поражать сердце, головной мозг, почки, печень, поджелудочную железу, легкие и/или кровь, а инфекция может представлять собой бактериальную,

вирусную, грибковую или микробную инфекцию, которая, как известно, обычно поражает такие ткани или органы. В одном варианте осуществления инфекция представляет собой инфекцию дыхательных путей. В соответствии с этим вариантом осуществления инфекция поражает легкие, верхние и/или нижние дыхательные пути.

Другие ткани, которые могут быть поражены болезнью, включают периферические ткани, такие как конечности, руки и ноги, и инфекция может представлять собой бактериальную инфекцию (например, гангрену). В одном варианте осуществления инфекция и/или заболевание могут одновременно поражать несколько тканей или органов. Например, инфекция может представлять собой бактериальную инфекцию конечности, кисти или стопы, а заболевание может также поражать кровь (например, сепсис). В одном варианте осуществления инфекция представляет собой сепсис. В другом примере заболевание может представлять собой сердечную или коронарную недостаточность, а другие ткани или органы, пораженные заболеванием, могут включать почки и выделительную систему и/или головной мозг (например, инсульт). В еще одном примере заболевание может поражать легкие, или инфекция может представлять собой инфекцию дыхательных путей, а другие пораженные ткани или органы могут включать сердце, сердечно-сосудистую систему и/или головной мозг (например, сердечная недостаточность, инфаркт миокарда и/или инсульт).

В одном варианте осуществления уровни циркулирующих нуклеосом измеряют в образце, взятом у субъекта, страдающего инфекцией, для определения прогноза заболевания. В другом варианте осуществления уровни циркулирующих нуклеосом измеряют в нескольких образцах, взятых через определенные промежутки времени у субъекта, страдающего инфекцией, для наблюдения за течением заболевания и/или для оценки эффективности лечения.

В дополнительном варианте осуществления измеряют уровни циркулирующих нуклеосом в образце, взятом у субъекта, страдающего сепсисом или септическим шоком, в частности, для оценки прогноза заболевания. Дальнейшие измерения на нескольких образцах, взятых через определенные промежутки времени у субъекта, страдающего сепсисом или септическим шоком, могут быть выполнены для мониторинга прогрессирования заболевания и/или для оценки эффективности лечения.

В одном варианте осуществления инфекция дыхательных путей выбрана из: гриппа, пневмонии и тяжелого острого респираторного синдрома (SARS). SARS представляет собой респираторную инфекцию, вызываемую коронавирусом SARS (SARS-CoV), и известны другие родственные коронавирусы (например, COVID-19 (также известный как SARS-CoV-2 и ранее как 2019-nCoV)). Известно, что он вызывает гриппоподобные

симптомы лихорадки, кашель и вялость и может привести к пневмонии (например, прямой вирусной пневмонии или вторичной бактериальной пневмонии).

Появление и быстрое прогрессирование COVID-19 до статуса пандемии создает серьезную нагрузку на международные службы здравоохранения. Прогнозы контагиозности колеблются от 70 до 80% населения страны. Похоже, что, хотя большинство людей будут испытывать легкие симптомы, двузначные проценты инфицированных могут быть тяжело поражены.

Обнаружение COVID-19-позитивных индивидуумов с высоким риском тяжелой реакции или осложнения, включая пневмонию, позволит провести триаж и облегчить распределение напряженных медицинских ресурсов, включая койки для интенсивной терапии и аппараты ИВЛ, до тех пор, пока не будет установлен коллективный иммунитет, защищая сообщества от будущих широкомасштабных вспышек. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления представлен способ обнаружения субъекта, инфицированного гриппом или коронавирусной инфекцией, требующей медицинского лечения, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня обнаруженных бесклеточных нуклеосом для определения необходимости медицинского лечения субъекта.

Способы диагностики и мониторинга

В соответствии с дополнительным аспектом представлен способ мониторинга тяжести инфекции у субъекта, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента;

(ii) повторение обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента в биологической жидкости, полученной от субъекта один или несколько раз;

(iii) применение любых изменений уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента для мониторинга прогрессирования инфекции у субъекта.

В соответствии с дополнительным аспектом представлен способ мониторинга прогрессирования инфекции у субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии инфекции, или предрасположенного к неблагоприятному прогнозу инфекции, который включает стадии:

(i) приведения в контакт образца, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом; и

(ii) сравнение уровня бесклеточных нуклеосом, обнаруженных с более ранним образцом, взятым у указанного субъекта, для мониторинга прогрессирования инфекции.

В соответствии с дополнительным аспектом представлен способ мониторинга развития заболевания у субъекта, страдающего инфекцией, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента;

(ii) повторение стадии (i) один или несколько раз; и

(iii) применение любых изменений уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента для мониторинга прогрессирования инфекции у субъекта.

Если установлено, что субъект не имеет инфекции или имеет легкую инфекцию, то настоящее изобретение все еще можно применять для целей мониторинга прогрессирования заболевания для будущего развития медицинского осложнения. Например, если способ включает образец от субъекта, у которого определена легкая инфекция, то измерения уровня биомаркера можно повторить в другой временной точке, чтобы установить, изменился ли уровень биомаркера.

Обнаружение и/или количественная оценка могут быть выполнены непосредственно на очищенном или обогащенном образце нуклеосом или косвенно на его экстракте или на его разведении. Количественное определение количества биомаркера, присутствующего в образце, может включать определение концентрации биомаркера, присутствующего в образце. Варианты применения и способы обнаружения, мониторинга и диагностики в соответствии с настоящим изобретением, описанные в данном документе, применимы для подтверждения существования заболевания, для мониторинга развития заболевания путем оценки начала и прогрессирования или для оценки улучшения или регресса заболевания. Варианты применения и способы обнаружения, мониторинга и диагностики также применимы в способах оценки клинического скрининга, прогноза, выбора терапии, оценки терапевтической пользы, т.е. для скрининга и разработки лекарственных средств.

В одном варианте осуществления заболевание представляет собой состояние, включающее патологические клинические осложнения высоких уровней NET или нетоза.

Обнаружение или измерение могут включать иммуноанализ, иммунохимический анализ, масс-спектроскопию, хроматографию, иммунопреципитацию хроматина или биосенсорный метод. В частности, обнаружение и/или измерение могут включать метод иммуноанализа с 2 сайтами для фрагментов нуклеосом. Такой метод предпочтителен для

измерения нуклеосом или включенных в нуклеосомы эпигенетических признаков *in situ* с использованием двух средств, направленных против связывания с нуклеосомами, или средства, направленного против связывания с нуклеосомой, в сочетании со связывающим средством для обнаружения, направленным против модификации гистонов, или направленным против варианта гистона, или направленным против модификации ДНК, или направленным против аддуктивного белка. Кроме того, обнаружение и/или измерение могут включать иммуноанализ с 2 сайтами, например, с использованием комбинаций меченого или иммобилизованного: связывающего средства, направленного против модификации нуклеосом, гистонов, направленного против варианта/изоформы гистона, направленного против модификации ДНК или направленного против аддуктивного белка.

Авторы настоящего изобретения использовали иммуноанализ с 2 сайтами для нуклеосом H3.1 с использованием иммобилизованного антитела к гистону H3.1, направленного на связывание с эпитопом вокруг аминокислот 30-33 белка гистона H3.1 для захвата клиппированных и неклиппированных нуклеосом вместе с меченым антителом к нуклеосоме, направленным на связывание с эпитопом, присутствующим в интактных нуклеосомах, но не присутствующим на выделенных (свободных) компонентах гистонов или ДНК нуклеосом. Этот тип эпитопа может называться в данном документе «конформационным нуклеосомным эпитопом», поскольку он требует, чтобы нативная трехмерная конфигурация нуклеосомы-мишени была интактной.

Измерения нуклеосом H3R8Cit, описанные в данном документе, были выполнены с использованием иммунологического анализа 2 сайтов с использованием иммобилизованного антитела, направленного на связывание с нуклеосомами, цитруллинированными по аргинину 8 гистона H3, вместе с таким же меченым антителом к нуклеосоме, направленным на связывание с конформационным нуклеосомным эпитопом.

В одном варианте осуществления способ обнаружения или измерения включает приведение образца биологической жидкости в контакт с твердой фазой, содержащей связывающее средство, которое обнаруживает бесклеточные нуклеосомы или их компонент, и обнаружение связывания с указанным связывающим средством.

В одном варианте осуществления способ обнаружения или измерения включает: (i) приведение образца в контакт с первым связывающим средством, которое связывается с эпигенетическим признаком бесклеточной нуклеосомы; (ii) приведение в контакт образца, связанного первым связывающим средством на стадии (i), со вторым связывающим средством, которое связывается с бесклеточными нуклеосомами; и (iii) обнаружение или количественную оценку связывания второго связывающего средства в образце.

В другом варианте осуществления способ обнаружения или измерения включает: (i)

приведение образца в контакт с первым связывающим средством, которое связывается с бесклеточными нуклеосомами; (ii) приведение в контакт образца, связанного первым связывающим средством на стадии (i), со вторым связывающим средством, которое связывается с эпигенетическим признаком бесклеточной нуклеосомы; и (iii) обнаружение или количественную оценку связывания второго связывающего средства в образце.

Обнаружение или измерение уровня биомаркера(ов) может быть выполнено с использованием одного или нескольких реагентов, таких как подходящее связывающее средство. Например, одно или несколько связывающих средств могут содержать лиганд или связующее вещество, специфичное для требуемого биомаркера, например, нуклеосомы или части их компонентов, эпигенетического признака нуклеосомы, имитатора структуры/формы нуклеосомы или части ее компонентов, необязательно в комбинации с одним или несколькими интерлейкинами.

Специалистам в данной области техники должно быть ясно, что используемые в данном документе термины «антитело», «связующее вещество» или «лиганд» не являются ограничивающими, а предназначены для включения любого связующего вещества, способного связываться с конкретными молекулами или объектами, и что любое подходящее связывающее вещество можно использовать в способе по настоящему изобретению. Также будет ясно, что термин «нуклеосомы» включает мононуклеосомы, олигонуклеосомы, NET и любые фрагменты хроматина белок-ДНК, которые можно анализировать в жидкой среде.

Способы обнаружения биомаркеров известны в данной области техники. Реагенты могут включать один или несколько лигандов или связующих веществ, например, встречающихся в природе или химически синтезированных соединений, способных к специфическому связыванию с требуемой мишенью. Лиганд или связующее вещество может включать пептид, антитело или его фрагмент, или синтетический лиганд, такой как пластиковое антитело, или аптамер, или олигонуклеотид, способный к специфическому связыванию с требуемой мишенью. Антитело может представлять собой моноклональное антитело или его фрагмент. Следует понимать, что если используется фрагмент антитела, то он сохраняет способность связывать биомаркер, так что биомаркер может быть обнаружен (в соответствии с настоящим изобретением). Лиганд/связующее вещество могут быть помечены обнаруживаемым маркером, таким как люминесцентный, флуоресцентный, ферментный или радиоактивный маркер; в качестве альтернативы или в качестве дополнения лиганд по настоящему изобретению может быть помечен аффинной меткой, например, биотиновой, авидиновой, стрептавидиновой или His- (например, гекса-His) меткой. В качестве альтернативы связывание лиганда можно определить с использованием

способа без меток, например способа ForteBio Inc.

Используемый в данном документе термин «обнаружение» или «диагностирование» включает идентификацию, подтверждение и/или характеристику болезненного состояния. Способы обнаружения, мониторинга и диагностики в соответствии с настоящим изобретением применимы для подтверждения существования заболевания, для мониторинга развития заболевания путем оценки начала и прогрессирования или для оценки улучшения или регресса заболевания. Способы обнаружения, мониторинга и диагностики также применимы в способах оценки клинического скрининга, прогноза, выбора терапии, оценки терапевтической пользы, т.е. для скрининга и разработки лекарственных средств.

Способы по настоящему изобретению могут включать нормализацию уровней маркеров. Например, уровень бесклеточных нуклеосом, содержащих конкретный эпигенетический признак, можно нормализовать относительно уровня нуклеосом как таковых (или какого-либо другого типа нуклеосом или параметра) для экспрессии уровня в качестве доли нуклеосом, содержащих этот признак. Например, для выражения уровня цитруллинированных нуклеосом в виде доли цитруллинированных нуклеосом.

В одном варианте осуществления способ, описанный в данном документе, повторяют несколько раз. Преимущество этого варианта осуществления состоит в том, что он позволяет осуществлять мониторинг результатов обнаружения в течение определенного периода времени. Такая компоновка обеспечит преимущество мониторинга или оценки эффективности лечения болезненного состояния. Такие способы мониторинга по настоящему изобретению можно использовать для наблюдения за началом, прогрессированием, стабилизацией, улучшением, рецидивом и/или ремиссией.

В способах мониторинга тестируемые образцы могут отбираться два или более раз. Способ может дополнительно включать сравнение уровня биомаркера(ов), присутствующего в тестируемом образце, с одним или несколькими контрольными образцами и/или с одним или несколькими предыдущими тестовыми образцами, взятыми ранее у того же тестируемого субъекта, например, до начала терапии и/или от того же тестируемого субъекта на более ранней стадии терапии. Способ может включать обнаружение изменения характера или количества биомаркера(ов) в тестируемых образцах, взятых в различных случаях.

Изменение уровня биомаркера в тестируемом образце по сравнению с уровнем в предыдущем тестируемом образце, взятом ранее у того же тестируемого субъекта, может свидетельствовать о положительном эффекте, например, стабилизации или улучшении указанной терапии нарушения или предполагаемого нарушения. Кроме того, после

завершения лечения способ по настоящему изобретению можно периодически повторять для мониторинга рецидива заболевания.

Способы мониторинга эффективности терапии можно применять для мониторинга терапевтической эффективности существующих и новых видов терапии у субъектов-людей и отличных от человека животных (например, в животных моделях). Эти способы мониторинга могут быть включены в скрининг новых лекарственных веществ и комбинаций веществ.

В дополнительном варианте осуществления мониторинг более быстрых изменений вследствие быстродействующих видов терапии может проводиться с более короткими интервалами в часах или днях.

Диагностические или мониторинговые наборы (или панели) предусмотрены для осуществления способов по настоящему изобретению. Такие наборы должны включать один или несколько лигандов для обнаружения и/или количественного определения биомаркера по настоящему изобретению, и/или биосенсор, и/или матрицу, как описано в данном документе, необязательно вместе с инструкциями по применению набора.

Дополнительным аспектом настоящего изобретения является набор для обнаружения наличия инфекции, включающий биосенсор, способный обнаруживать и/или количественно определять один или несколько биомаркеров, как определено в данном документе. Используемый в данном документе термин «биосенсор» означает что-либо, способное обнаруживать присутствие биомаркера. Примеры биосенсоров описаны в данном документе. Биосенсоры могут содержать связующее вещество-лиганд или лиганды, как описано в данном документе, способные к специфическому связыванию с биомаркером. Такие биосенсоры применимы для обнаружения и/или количественного определения биомаркера по настоящему изобретению.

Соответственно, биосенсоры для обнаружения одного или нескольких биомаркеров сочетают биомолекулярное распознавание с соответствующими средствами для преобразования обнаружения присутствия или количественного определения биомаркера в образце в сигнал. Биосенсоры могут быть адаптированы для диагностического тестирования «альтернативного сайта», например, в палате, амбулаторном отделении, при хирургическом вмешательстве, дома, в полевых условиях и на рабочем месте. Биосенсоры для обнаружения одного или нескольких биомаркеров по настоящему изобретению включают акустические датчики, датчики плазмонного резонанса, голографические датчики, датчики биослойной интерферометрии (BLI) и микроинженерные датчики. Импринтированные элементы распознавания, способ тонкопленочных транзисторов, устройства магнитно-акустического резонатора и другие новые акустико-электрические

системы могут использоваться в биосенсорах для обнаружения одного или нескольких биомаркеров.

Биомаркеры для обнаружения наличия заболевания являются важными мишенями для обнаружения новых мишеней и молекул лекарственных средств, которые замедляют или останавливают прогрессирование нарушения. Поскольку уровень биомаркера указывает на нарушение и реакцию на лекарственное средство, биомаркер применим для идентификации новых терапевтических соединений в анализах *in vitro* и/или *in vivo*. Описанные в данном документе биомаркеры можно использовать в способах скрининга соединений, которые модулируют активность биомаркера.

Таким образом, в дополнительном аспекте настоящего изобретения представлено применение связывающего вещества или лиганда, как описано, который может представлять собой пептид, антитело или его фрагмент, или аптамер, или олигонуклеотид, направленный на биомаркер в соответствии с настоящим изобретением; или использование биосенсора, или матрицы, или набора в соответствии с настоящим изобретением для идентификации вещества, способного стимулировать и/или подавлять образование биомаркера.

Иммунологические анализы, описанные в данном документе, включают любой метод, использующий одно или несколько антител или других специфических связывающих веществ, направленных на связывание с биомаркерами, определенными в данном документе. Иммуноанализы включают иммунологические анализы 2 сайтов или иммунометрические анализы с использованием методов обнаружения ферментов (например, ELISA), иммунометрические анализы с флуоресцентной меткой, иммунометрические анализы с временным разрешением, хемилюминесцентные иммунометрические анализы, иммунотурбидиметрические анализы, иммунометрические анализы с мечеными частицами и иммунорадиометрические анализы, а также иммунологические анализы одного сайта, ограниченные реагентами иммунологические анализы, конкурентные методы иммунологического анализа, включая методы иммунологического анализа меченого антигена и меченого антитела с одним антителом с различными типами меток, включая радиоактивные, ферментные, флуоресцентные, флуоресцентные метки с временным разрешением и метки в виде частиц. Все указанные методы иммуноанализа хорошо известны в данной области, см., например, Salgame *et al.* (1997) и van Nieuwenhuijze *et al.* (2003).

Идентификация, обнаружение и/или количественная оценка могут быть выполнены любым способом, подходящим для определения присутствия и/или количества определенного белка в биологическом образце от субъекта или очистки или экстракта

биологического образца или его разбавления. В частности, количественная оценка может быть выполнена путем измерения концентрации мишени в образце или образцах. Биологические образцы, которые можно тестировать в способе по настоящему изобретению, включают те, которые определены выше в данном документе. Образцы могут быть приготовлены, например, при необходимости разбавлены или сконцентрированы, и сохранены обычным образом. Настоящее изобретение находит особое применение в образцах плазмы крови, которые могут быть получены от субъекта.

Идентификацию, детекцию и/или количественную оценку биомаркеров можно проводить путем детекции биомаркера или его фрагмента, например, фрагмент с C-концевым усечением или с N-концевым усечением. Фрагменты предпочтительно имеют длину более 4 аминокислот, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. В частности, отмечено, что пептиды с такой же или родственной последовательностью, что и хвосты гистонов, являются особенно применимыми фрагментами гистоновых белков.

Например, обнаружение и/или количественная оценка могут быть выполнены одним или несколькими методами, выбранными из группы, состоящей из: иммуноанализа, иммунохроматографии, SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), 1-D-гель-анализа, 2-D гель-анализа, масс-спектрометрии (MS), LC с обращенной фазой (RP), проницаемости на основе размера (гель-фильтрации), ионного обмена, аффинности, HPLC, UPLC и других методик на основе LC или LC MS. Подходящие методики LC MS включают ICAT® (Applied Biosystems, Калифорния, США) или iTRAQ® (Applied Biosystems, Калифорния, США). Можно также использовать жидкостную хроматографию (например, жидкостную хроматографию высокого давления (HPLC) или жидкостную хроматографию низкого давления (LPLC)), тонкослойную хроматографию, ЯМР-спектроскопию (ядерный магнитный резонанс).

Методы, включающие обнаружение и/или количественную оценку одного или нескольких биомаркеров по настоящему изобретению, могут быть выполнены на настольных приборах или могут быть включены в одноразовые, диагностические или мониторинговые платформы, которые можно использовать в нелабораторных условиях, например, в кабинете врача или у постели субъекта. Подходящие биосенсоры для осуществления способов по настоящему изобретению включают «кредитные» карты с оптическими или акустическими считывателями. Биосенсоры могут быть выполнены таким образом, чтобы собранные данные передавались в электронном виде врачу для интерпретации, и, таким образом, они могли бы стать основой для электронной медицины. Следовательно, в дополнительном аспекте настоящего изобретения представлено применение метода иммунологического анализа у пациента или в месте оказания

медицинской помощи для измерения биомаркера в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления способ иммунологического анализа у пациента включает прибор для иммунологического анализа в месте оказания медицинской помощи (например, прибор для иммунологического анализа Abbott i-STAT или LightDeck Diagnostics в месте оказания медицинской помощи). В одном варианте осуществления метод иммунологического анализа возле пациента включает анализ на тест-полосках. В предпочтительном варианте осуществления биомаркер представляет собой нуклеосому или нуклеосому, содержащую эпигенетический признак.

Идентификация биомаркеров болезненного состояния позволяет интегрировать диагностические процедуры и терапевтические схемы. Биомаркеры обеспечивают средства для указания терапевтического ответа, отсутствия ответа, неблагоприятного профиля побочных эффектов, степени соблюдения схемы лечения и достижения адекватных уровней лекарственных средств в сыворотке крови. Биомаркеры могут использоваться для предупреждения о неблагоприятном ответе на лекарственное средство. Биомаркеры применимы при разработке персонализированной терапии, поскольку оценка ответа может использоваться для точного подбора дозировки, минимизации количества назначаемых лекарственных средств, сокращения задержки в достижении эффективной терапии и предотвращения побочных реакций на лекарственные средства. Таким образом, путем мониторинга биомаркера по настоящему изобретению уход за субъектом может быть точно адаптирован для соответствия потребностям, определяемым нарушением и фармакологическим профилем субъекта, таким образом, биомаркер можно использовать для подбора оптимальной дозы, прогнозирования положительного терапевтического ответа и определения тех субъектов, которые имеют высокий риск серьезных побочных эффектов.

Тесты на основе биомаркеров обеспечивают первоочередную оценку «новых» субъектов и обеспечивают объективные меры для точной и быстрой диагностики, недостижимой с использованием существующих измерений.

Методы мониторинга биомаркеров, биосенсоры, тесты по месту оказания медицинской помощи, анализы на тест-полосках и наборы также имеют жизненно важное значение в качестве инструментов мониторинга субъектов, позволяющих врачу определить, вызван ли рецидив ухудшением нарушения. Если фармакологическое лечение признано неадекватным, терапию можно возобновить или усилить; при необходимости можно изменить терапию. Поскольку биомаркеры чувствительны к состоянию нарушения, они дают представление о влиянии медикаментозной терапии.

Ссылки на «субъекта» или «пациента» используются в данном документе взаимозаменяемо. Субъектом может быть человек или животное. В одном варианте

осуществления субъектом является человек. В одном варианте осуществления субъект представляет собой (отличное от человека) животное. Панели и способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены *in vitro* или *ex vivo*.

Обнаружение и/или количественную оценку можно сравнить с пороговым уровнем. Пороговые значения могут быть заранее определены путем анализа результатов, полученных от нескольких пациентов и контролей, и определения подходящего значения для классификации субъекта как с заболеванием или без него. Например, для заболеваний, при которых уровень биомаркера выше у пациентов, страдающих заболеванием, тогда, если обнаруженный уровень выше порогового значения, указывается, что пациент страдает заболеванием. В качестве альтернативы для заболеваний, при которых уровень биомаркера ниже у пациентов, страдающих заболеванием, тогда, если обнаруженный уровень ниже порогового значения, указывается, что пациент страдает заболеванием. К преимуществам использования простых пороговых значений относятся простота, с которой клиницисты могут понять суть теста, и отсутствие необходимости в программном обеспечении или других вспомогательных средствах для интерпретации результатов теста. Пороговые уровни можно определить с использованием способов, известных в данной области техники.

Обнаружение и/или количественная оценка также могут быть сравнены с контролем. Специалистам в данной области техники должно быть ясно, что контрольные субъекты могут быть выбраны на множестве оснований, которые могут включать, например, субъектов, о которых известно, что у них отсутствует заболевание, или могут представлять собой субъектов с другим заболеванием (например, для исследования дифференциального диагноза). «Контроль» может включать здорового субъекта, здорового субъекта и/или субъекта без инфекции. Контролем также может быть субъект с инфекцией, без проявления симптомов или со слабо выраженными симптомами, такой как субъект, инфицированный вирусом дыхательных путей, не проявляющий симптомов или проявляющий слабо выраженные симптомы. Легкие симптомы могут включать управляемые симптомы, которые не требуют вмешательства со стороны больницы и/или интенсивного медикаментозного лечения.

В одном варианте осуществления субъект, который имеет положительный результат с помощью способов по настоящему изобретению, может быть инфицирован вирусным заболеванием и дополнительно страдать или продолжает страдать от дополнительных медицинских осложнений. В отличие от этого, контрольный субъект также может быть инфицирован вирусным заболеванием, но не страдает и не продолжает страдать от медицинских осложнений. Сравнение с контролем хорошо известно в области диагностики.

Диапазон значений, обнаруженных в контрольной группе, можно использовать в качестве диапазона нормальных или характерных для здоровых лиц или эталонных значений, с которым можно сравнивать значения, обнаруженные для тестируемых субъектов. Например, если диапазон эталонных значений составляет <10 единиц, то значение теста в 5 единиц будет считаться нормальным или не нуждающимся в лечении, а значение в 11 единиц будет считаться аномальным и указывать на необходимость лечения.

Следовательно, в одном варианте осуществления способ дополнительно включает сравнение уровня бесклеточных нуклеосом или их компонентов в образце биологической жидкости субъекта с одним или несколькими контролями. Например, способ может включать сравнение уровня бесклеточных нуклеосом, присутствующих в образце, полученном от субъекта, с уровнем бесклеточных нуклеосом, присутствующих в образце, полученном от здорового субъекта. Контролем может быть здоровый субъект.

В одном варианте осуществления уровень бесклеточных нуклеосом или их компонентов повышен по сравнению с контролем.

Следует понимать, что необходимость каждый раз измерять контрольные уровни для сравнительных целей отсутствует. Например, для здоровых/не заболевших контролей после установления «нормального диапазона» его можно использовать в качестве эталона для всех последующих тестов. Нормальный диапазон может быть установлен путем получения образцов от нескольких контрольных субъектов без инфекции и тестирования в отношении уровня биомаркера. Результаты (т.е. уровни биомаркеров) для субъектов с подозрением на инфекцию затем можно изучить, чтобы увидеть, находятся ли они в пределах или за пределами соответствующего нормального диапазона. Использование «нормального диапазона» является стандартной практикой для обнаружения заболевания.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает определение по меньшей мере одного клинического параметра пациента. Этот параметр можно использовать при интерпретации результатов. Клинические параметры могут включать в себя любую соответствующую клиническую информацию, например, без ограничения, температуру тела, пол, вес тела, индекс массы тела (BMI), статус курения и пищевые привычки. Следовательно, в одном варианте осуществления клинический параметр выбирают из группы, состоящей из температуры тела, возраста, пола и индекса массы тела (BMI).

В одном варианте осуществления способ по настоящему изобретению осуществляется для обнаружения субъекта с высоким риском развития тяжелой реакции на инфекцию и, следовательно, нуждающегося в медицинском вмешательстве. Такое медицинское вмешательство может включать один или несколько видов терапии,

описанных в данном документе.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения представлено применение связывающего средства при изготовлении набора для применения в способе определения риска неблагоприятного исхода у субъекта, страдающего инфекцией, включающем:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня обнаруженных бесклеточных нуклеосом для определения вероятности неблагоприятного исхода у указанного.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения представлено использование связывающего средства при изготовлении набора для использования в способе обнаружения субъекта, нуждающегося в медикаментозном лечении пневмонии, острого респираторного синдрома (ARS) или тяжелой острой респираторный синдром (SARS), включающем:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня бесклеточных нуклеосом в качестве индикатора того, что субъект нуждается в медикаментозном лечении пневмонии, ARS или SARS.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения представлено использование связывающего средства при изготовлении набора для использования в способе обнаружения субъекта, нуждающегося в медикаментозном лечении сепсиса или септического шока, включающем:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня бесклеточных нуклеосом в качестве индикатора того, что субъект нуждается в медикаментозном лечении сепсиса или септического шока.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения представлен способ обнаружения субъекта, нуждающегося в медикаментозном лечении пневмонии, острого респираторного синдрома (ARS) или тяжелой острой респираторный синдром (SARS), включающем:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня

бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня бесклеточных нуклеосом в качестве индикатора того, что субъект нуждается в медикаментозном лечении пневмонии, ARS или SARS.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения представлен способ обнаружения субъекта, нуждающегося в медикаментозном лечении сепсиса или септического шока, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня бесклеточных нуклеосом в качестве индикатора того, что субъект нуждается в медикаментозном лечении сепсиса или септического шока.

Дополнительные биомаркеры

Уровень бесклеточных нуклеосом может быть обнаружен или измерен в качестве одного из панели измерений. Панель может включать различные эпигенетические признаки нуклеосомы, как описано выше в данном документе (например, изоформа и PTM гистона). Биомаркеры, используемые в панельном тесте для обнаружения тяжелых респираторных инфекций, требующих медицинского вмешательства, включают без ограничения фрагменты цитокинов (в частности, интерлейкины), С-реактивный белок, миелопероксидазу, D-димер, протеазу, активирующую фактор VII (FSAP), фибриноген и продукты распада фибрина/фибриногена. В одном варианте осуществления панель содержит С-реактивный белок. В одном варианте осуществления панель содержит один или несколько цитокинов, таких как один или несколько интерлейкинов.

Интерлейкины (IL) представляют собой группу цитокинов, обычно секретируемых лейкоцитами, которые выступают в качестве сигнальных молекул. Они играют ключевую роль в стимуляции иммунных реакций и воспаления. Впервые они были идентифицированы в 1970-х годах и получили численное обозначение по мере открытия новых типов интерлейкинов. Примеры интерлейкинов включают без ограничения: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14 и IL-15.

В одном варианте осуществления один или несколько интерлейкинов выбраны из группы, состоящей из: интерлейкина-6 (IL-6) и интерлейкина-12 (IL-12).

Интерлейкин может представлять собой IL-6. Интерлейкин-6 (IL-6) представляет собой цитокин с широким спектром биологических функций. Это мощный индуктор лихорадки и реакции острой фазы. Последовательность IL-6 человека известна в данной области техники и описана в UniProt под номером доступа P05231. В одном конкретном варианте осуществления интерлейкин может представлять собой IL-6.

В качестве альтернативы или в качестве дополнения интерлейкин может представлять собой IL-12. Интерлейкин-12 (IL-12) является фактором, стимулирующим Т-клетки, поскольку он стимулирует рост и функцию Т-клеток. Это гетеродимерный цитокин, состоящий из IL-12A и IL-12B. Последовательность IL-12A человека известна в данной области техники и описана под номером доступа UniProt P29459, и последовательность IL-12B человека также известна и описана под номером доступа UniProt P29460. В одном конкретном варианте осуществления интерлейкин может представлять собой IL-12.

В одном варианте осуществления панель содержит бесклеточную нуклеосому или ее эпигенетический признак и интерлейкин. В другом варианте осуществления панель содержит эпигенетический признак бесклеточной нуклеосомы и два интерлейкина. Например, измерение бесклеточных нуклеосом можно комбинировать с более чем одним измерением интерлейкинов, таких как IL-6 и IL-12. В другом варианте осуществления эпигенетический признак бесклеточной нуклеосомы выбран из изоформы гистона, такой как H3.1, и посттрансляционно модифицированного гистона, такого как H3cit. В еще одном варианте осуществления панелью измерений являются H3.1, H3cit, H4cit и IL-6.

В одном варианте осуществления панель содержит С-реактивный белок (CRP). CRP представляет собой пентамерный белок, обнаруживаемый в плазме крови, и уровни CRP (независимо от того, присоединен или не присоединен он к нуклеосомам) увеличиваются в плазме крови в ответ на воспаление, например, при бактериальных, вирусных, грибковых и микробных инфекциях. Уровни CRP увеличиваются после секреции IL-6 макрофагами и Т-клетками, и его физиологическая роль заключается в связывании лизофосфатидилхолина, экспрессируемого на поверхности мертвых или умирающих клеток, для активации системы комплемента посредством C1q. Он также связывается с фосфохолином на поверхности некоторых бактерий и усиливает фагоцитоз. Измерение уровней CRP пригодно для определения прогрессирования заболевания и эффективности лечения, а повышенные уровни CRP были показаны у пациентов с повышенным риском диабета, гипертонии и сердечно-сосудистого заболевания. Повышенные уровни CRP также были обнаружены у пациентов с почечной недостаточностью и воспалительными заболеваниями кишечника (IBD, включая болезнь Крона и язвенный колит) и приблизительно коррелируют с ишемической болезнью сердца, хотя, поскольку повышенный уровень CRP не связан напрямую с заболеванием сердца, он не является специфическим прогностическим маркером. Поскольку CRP повышается во время воспаления, вирусные инфекции, такие как атипичная пневмония или коронавирус (например, COVID-19) также может привести к повышению уровня CRP в плазме крови.

В одном варианте осуществления панель содержит миелопероксидазу (MPO). MPO

экспрессируется в нейтрофильных гранулоцитах и продуцирует гипогалогеновые кислоты для осуществления их антимикробной активности. Она хранится в азурофильных гранулах и высвобождается во внеклеточное пространство при дегрануляции. Было показано, что уровни MPO являются применимым предиктором инфаркта миокарда и сочетаются с измерением CRP для повышения точности прогнозирования риска инфаркта миокарда у пациентов. В одном варианте осуществления панель содержит нейтрофильную эластазу (NE).

Модели могут быть получены с использованием биомаркеров по настоящему изобретению. Способы получения моделей или алгоритмов хорошо известны в данной области техники, и доступны подходящие программные пакеты. Типичные программные инструменты для этой цели включают SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) и «R». Эти программные пакеты обеспечивают линейное и нелинейное моделирование клинических данных.

Специалистам в данной области техники будет ясно, что любая комбинация биомаркеров, раскрытых в данном документе, может быть использована в панелях и алгоритмах для обнаружения или прогнозирования осложнений инфекции, и что дополнительные маркеры могут быть добавлены в панель, включающую эти маркеры.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения представлено применение панельного теста для обнаружения или прогнозирования осложнений инфекции у пациента, при этом панельный тест включает реагенты для обнаружения измерений нуклеосом или их компонентов и одного или нескольких интерлейкинов, в образце, полученном от пациента. В одном варианте осуществления осложнение представляет собой осложнение, ассоциированное с NET. В одном варианте осуществления осложнение представляет собой ARDS, ARS, SARS или эмболию или тромботическое осложнение.

Способы лечения

В соответствии с дополнительным аспектом представлен способ лечения инфекции у субъекта, который включает следующие стадии:

(i) обнаружение или измерение уровня бесклеточных нуклеосом в образце, полученном от субъекта;

(ii) применение уровня, измеренного на стадии (i), в качестве показателя наличия, и/или тяжести, и/или медицинского осложнения указанной инфекции у субъекта; и

(iii) введение средства терапии, если у субъекта на стадии (ii) определена тяжелая инфекция или медицинское осложнение.

В соответствии с дополнительным аспектом представлен способ лечения инфекции

у субъекта, нуждающегося в этом, который включает стадию введения средства терапии (например, терапевтического средства) субъекту, у которого идентифицированы различные уровни бесклеточных нуклеосом в образце, полученном от указанного субъекта, по сравнению с уровнем бесклеточных нуклеосом в образце, полученном от контрольного субъекта. Средство терапии может включать один или несколько подходящих видов лечения состояния, включая без ограничения лекарственные средства (например, противовоспалительные лекарственные средства, препараты для разжижения крови или ингибиторы свертывания крови, терапевтические препараты антител к NET, препараты ДНКазы, препараты ингибиторов нетоза, антибактериальные лекарственные средства или противовирусные лекарственные средства), аферез, поддержку искусственной вентиляции легких, инфузионную поддержку и другие.

В одном варианте осуществления лечение выбирают из одного или нескольких из: лечения антибиотиками (например, пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины, аминогликозиды, макролиды, клиндамицин, сульфаниламиды, триметоприм, метронидазол, тинидазол, хинолоны и/или нитрофурантоин), противомикробных видов лечения (например, этамбутол, изониазид, пиразинамид, рифампицин, аминогликозиды (амикацин, канамицин), полипептиды (капреомицин, виомицин, энвиомицин), фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин), тиоамиды (этионамид, протионамид), циклосерин (клосерин), теризидон, рифабутин, макролиды (кларитромицин), линезолид, тиоацетазон, тиоридазин, аргинин, витамин D и/или R207910), противовирусных препаратов для лечения COVID (например, ремдесивир), противовирусных препаратов для лечения гриппа (например, амантадин, умифеновир, мороксидин, римантадин, умифеновир, занамивир и ингибиторы нейраминидазы, ингибиторы кэп-зависимой эндонуклеазы, адамантаны, перамивир, занамивир, осельтамивир фосфат и балоксавир марбоксил), а также противовирусных видов лечения других вирусных заболеваний, которые могут привести к высокому уровню нетоза, и противогрибкового лечения (например, клотримазол, эконазол, миконазол, тербинафин, флуконазол, кетоконазол и амфотерицин).

В одном варианте осуществления средство лечения представляет собой противовоспалительное лекарственное средство. В данной области техники известно множество стероидных и нестероидных противовоспалительных препаратов. Некоторые примеры стероидных противовоспалительных лекарственных средств включают без ограничения дексаметазон, гидрокортизон, кортизон, бетаметазон, преднизолон, преднизолон, триамцинолон и метилпреднизолон. Некоторые примеры нестероидных противовоспалительных лекарственных средств включают без ограничения аспирин,

целекоксиб, диклофенак, дифлунисал, этодолак, ибупрофен, индометацин, CD24Fc (белок CD24, присоединенный к Fc-области иммуноглобулина G) и EXO-CD24 (CD24-экзосомы).

В одном варианте осуществления лечение представляет собой лечение ДНКазой для расщепления избыточных NET или ингибитором нетоза, таким как антрациклиновое лекарственное средство. В другом варианте осуществления антрациклиновое лекарственное средство выбрано из: эпирубицина, даунорубицина, доксорубицина и идарубицина.

В одном варианте осуществления средство лечения представляет собой терапевтическое антитело, направленное на связывание с NET или частью компонента NET, включая без ограничения терапевтическое антитело, направленное на связывание с нуклеосомой или с любой частью компонента нуклеосомы. Примеры включают терапевтические антитела, направленные на связывание с нуклеосомами, содержащими изоформу гистона H3.1, цитруллинированные гистоны, миелопероксидазу, нейтрофильную эластазу или С-реактивный белок.

В одном варианте осуществления средство лечения представляет собой поглотитель нуклеиновых кислот, который адсорбирует и/или удаляет нуклеиновые кислоты из кровотока или из организма, например поглотитель ДНК полиамидоамин.

В настоящее время никакие виды лечения для ингибирования нетоза не использовались и, насколько известно авторам, не тестировались для использования у людей. Для этого имеется ряд причин. Во-первых, как отмечалось выше, нетоз является важным компонентом иммунной системы. Это будет особенно важно для пациентов, у которых, возможно, еще не выработался ответ антител на инфекционное средство, и у которых процесс нетоза вместе с фагоцитозом может быть основным способом борьбы с инфекцией и предотвращения ее распространения. Более того, в случае терапии ингибиторами нетоза это еще более важно, поскольку вместо удаления продуктов нетоза (которые могут быть замещены) сам иммунный процесс отключается, предотвращая дальнейшее образование NET. Во-вторых, сообщается, что период полувыведения ДНКазы, введенной внутривенно, составляет 3-4 часа, тогда как период полувыведения антрациклинов составляет более 40 часов, и антрациклины сохраняются в кровотоке в течение по меньшей мере нескольких дней. Отключения иммунной системы на несколько дней у пациента с тяжелой инфекцией было бы достаточно для значительного ухудшения заболевания. В-третьих, антрациклины являются цитотоксическими лекарственными средствами, обычно используемыми для лечения рака путем уничтожения раковых клеток. Ясно, что средство, которое отключает один из важных способов действия иммунной системы, а также является долгоживущим и цитотоксическим, не следует вводить больному

субъекту, заболевание которого не связано с нетозом и который не требует такого лечения. Таким образом, лечение пациентов с нормальными или низкими NET лекарственным средством, которое ингибирует нетоз, является нецелесообразным и потенциально опасным. Таким образом, введение такой терапии требует тщательного отбора пациентов с высокими уровнями NET, нуждающихся в лечении с применением способов, описанных в данном документе.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения представлен комбинированный продукт, содержащий лекарственное средство для лечения заболевания, связанного с нетозом, и сопутствующий диагностический тест для обнаружения или измерения бесклеточных нуклеосом. В некоторых вариантах осуществления комбинированный продукт может содержать более одного лекарственного средства (например, ингибитор нетоза и кардиопротекторное средство и/или антибиотик) и/или более одного сопутствующего теста (например, тест на бесклеточные нуклеосомы и тест на цитокиновый фрагмент). В одном варианте осуществления комбинированный продукт содержит лекарственное средство на основе ДНКазы и сопутствующий диагностический тест для обнаружения или измерения бесклеточных нуклеосом.

В одном варианте осуществления комбинированный продукт содержит лекарственное средство, расщепляющее NET, например, ДНКазу, которая расщепляет NET, состоящие из более длинных цепей нуклеосом, на более мелкие фрагменты, содержащие более короткие цепи олигонуклеосом или мононуклеосом, и сопутствующий диагностический тест для обнаружения или измерения бесклеточных нуклеосом.

В одном варианте осуществления комбинированный продукт содержит поглотитель нуклеиновых кислот и сопутствующий диагностический тест для обнаружения или измерения бесклеточных нуклеосом.

В одном варианте осуществления комбинированный продукт содержит терапевтическое лекарственное антитело, направленное на связывание с NET, часть компонента NET, MPO, NE или CRP и сопутствующий диагностический тест для обнаружения или измерения бесклеточных нуклеосом.

В одном варианте осуществления комбинированный продукт включает средство терапии, которое ингибирует или предотвращает образование NET нейтрофильными клетками, и сопутствующий диагностический тест для обнаружения или измерения бесклеточных нуклеосом. Такие лекарственные средства, которые ингибируют или предотвращают образование NET, в настоящее время не используются для лечения заболеваний, связанных с нетозом. В публикации Figueiredo et al., Immunity (2013) 39: 874–884 сообщалось, что антрациклиновые лекарственные средства эффективны при лечении

сепсиса, вызванного у мышей. Летальную дозу для обеспечения сепсиса индуцировали у мышей перевязкой и пункцией слепой кишки, что приводило к гибели 100% мышей в течение 72 часов. Обработка антрациклиновым лекарственным средством эпирубицином приводила к 75% выживаемости и уменьшению воспаления, что измерялось различными циркулирующими воспалительными биомаркерами. Однако механизм действия антрациклинов для достижения этого эффекта определить не удалось, и Figueiredo ничего не сообщал в отношении NET или нетоза. Khan et al., Cancers (2019) 11: 1328 позже исследовали влияние антрациклиновых лекарственных средств in vitro на клетки нейтрофилов в клеточной культуре и сообщили, что они ингибируют нетоз. Khan пришел к выводу, что антрациклины и другие лекарственные средства, хелатирующие ДНК, можно рассматривать как потенциальные терапевтические лекарственные средства для подавления нежелательного нетоза при заболеваниях, связанных с NET. Однако, поскольку основным токсическим побочным эффектом антрациклиновых лекарственных средств является кардиотоксичность, Khan предложил назначать антрациклиновые лекарственные средства в сочетании с дексразоксаном, кардиопротекторным средством, используемым для ограничения побочных эффектов антрациклинов, который не влияет на нетоз или способность антрациклинов к подавлению нетоза.

Антрациклиновые лекарственные средства являются высокоэффективными хемотоксическими средствами для лечения рака. Однако они имеют ряд побочных эффектов, включая алопецию, кожную сыпь, тошноту и рвоту, недомогание, лихорадку, периферическую нейротоксичность, вторичный лейкоз и кардиотоксичность. Миокардиальная токсичность ограничивает дозу, поскольку может привести к потенциально фатальной застойной сердечной недостаточности (CHF) во время терапии или от нескольких месяцев до нескольких лет после терапии. Например, вероятность развития нарушения функции миокарда, основанная на комбинированном индексе признаков, симптомов и снижении фракции выброса левого желудочка, оценивается в 1-2% при общей кумулятивной дозе доксорубицина 300 мг/м^2 в течение повторных циклов лечения, от 3 до 5% при дозе 400 мг/м^2, от 5 до 8% при дозе 450 мг/м^2 и от 6 до 20% при дозе 500 мг/м^2. Риск развития CHF быстро возрастает при повышении общей кумулятивной дозы доксорубицина, превышающей 400 мг/м^2. Типичная доза, используемая для химиотерапии, составляет 60-75 мг/м^2 на цикл лечения.

Доза антрациклинов, которая, по наблюдениям, была применимой при лечении в модели сепсиса у мышей, составляла 0,6 мкг/г (Figueiredo et al.), что, как определили авторы настоящего изобретения, примерно эквивалентно 25 мг/м^2 у мужчины весом 80 кг. Таким образом, однократная внутривенная доза составляет менее 1/10 дозы, вызывающей 1-2%

миокардиальную токсичность. Концентрация антрациклинового лекарственного средства, необходимая для почти полного ингибирования нетоза нейтрофильных клеток *in vitro*, составляла 5 мкМ (Khan et al.), что приблизительно эквивалентно 3 мкг/мл. Исследование фармакокинетических свойств доксорубицина показывает, что однократное болюсное внутривенное введение дозы 25 мг/м^2 обеспечивает концентрацию в сыворотке крови 10 мкг/мл. Кроме того, период полувыведения доксорубицина из кровотока составляет примерно 41 час, а уровень в сыворотке крови остается выше 3 мкг/мл в течение около 4 дней. Таким образом, однократная болюсная доза 25 мг/м^2 ингибирует нетоз на несколько дней и может использоваться для лечения сепсиса или других заболеваний, связанных с нетозом. Уровни разовой болюсной дозы или повторные уровни кумулятивной дозы ниже 25 мг/м^2 также могут быть эффективными.

Сообщалось, что состав на основе наночастиц лекарственного средства антрациклина обеспечивает целенаправленный подход к ингибиторам нетоза, при котором активное лекарственное средство высвобождается только в активированных нейтрофилах и, таким образом, позволяет избежать токсических побочных эффектов, а также поддерживает способность оставшихся нейтрофилов реагировать на дальнейшую инфекцию при нетозе (Zhang *et al.*, Science Advances 2019;5: eaax7964). Таким образом, в одном варианте осуществления представлен комбинированный продукт, содержащий состав на основе наночастиц лекарственного средства антрациклина для лечения заболевания, связанного с нетозом, и сопутствующий диагностический тест для обнаружения или измерения бесклеточных нуклеосом.

Сообщалось о терапии, включающей удаление NET и продуктов расщепления NET из кровотока с помощью плазмафереза, которая обеспечивает лечение нетоза, которое позволяет избежать фармацевтических токсичных побочных эффектов (WO2019053243). Таким образом, в одном варианте осуществления представлен комбинированный продукт, содержащий средство терапии для плазмафереза для лечения заболевания, связанного с нетозом, и сопутствующий диагностический тест для обнаружения или измерения бесклеточных нуклеосом.

Сообщалось о лечении противовоспалительными лекарственными средствами субъектов, страдающих COVID-19, на основе белка CD24. Одним из примеров являются CD24-экзосомы, которые, как сообщается, излечивают 29 из 30 умеренных/тяжелых случаев COVID в течение нескольких дней (Times of Israel 5 Feb 2021, и идентификатор в ClinicalTrials.gov: NCT04747574) и включают доставку CD24 в экзосомах. Другое такое средство лечения, CD24Fc, включает неполиморфные области CD24, присоединенные к области кристаллизуемой области фрагмента (Fc) IgG1 человека (идентификатор в

ClinicalTrials.gov: NCT04317040).Таким образом, в одном варианте осуществления представлен комбинированный продукт, содержащий средство терапии для плазмафереза для лечения заболевания, связанного с нетозом, и сопутствующий диагностический тест для обнаружения или измерения бесклеточных нуклеосом.

NET или заболевания, связанные с нетозом, включают инфекционные заболевания, такие как сепсис, пневмония, COVID и грипп, а также другие заболевания, связанные с патологическим повышением продуцирования NET, включая без ограничения пневмонию, SARS или ARDS любой этиологии, тромботические или микротромботические состояния, многие воспалительные заболевания и связанные с нетозом осложнения других заболеваний, включая ампутацию и тромботические осложнения диабета и тромботические осложнения рака и многих других заболеваний.

Способы могут включать:

(i) измерение уровня бесклеточных нуклеосом (необязательно в сочетании с уровнем одного или нескольких интерлейкинов) в образце, полученном от субъекта;

(ii) обнаружение субъекта как страдающего заболеванием, связанным с нетозом (например, инфекцией), нуждающегося в лечении, на основании более высокого уровня бесклеточных нуклеосом по сравнению с контролем; и

(iii) проведение лечения субъекта.

В предпочтительных вариантах осуществления лечение представляет собой лечение ДНКазой для расщепления избыточных NET, лечение терапевтическими антителами к нуклеосоме или NET, средство лечения на основе афереза или плазмафереза для удаления избыточных NET или ингибитора нетоза, как описано в данном документе.

В одном варианте осуществления представлен способ обнаружения субъекта, страдающего инфекцией, у которого имеется или у которого имеется риск развития медицинского осложнения, требующего лечения, включающий следующие стадии:

(i) измерение уровня бесклеточных нуклеосом (необязательно в сочетании с уровнем одного или нескольких интерлейкинов) в образце, полученном от субъекта;

(ii) обнаружение субъекта как страдающего инфекцией, нуждающегося в лечении, на основании более высокого уровня бесклеточных нуклеосом по сравнению с контролем; и

(iii) проведение лечения субъекта.

В одном варианте осуществления инфекция представляет собой сепсис или септический шок.

В предпочтительном варианте осуществления представлен способ обнаружения субъекта, инфицированного вирусом дыхательных путей, у которого имеется или у

которого имеется риск развития медицинского осложнения, требующего лечения, включающий следующие стадии:

(i) измерение уровня бесклеточных нуклеосом (необязательно в сочетании с уровнем одного или нескольких интерлейкинов) в образце, полученном от субъекта;

(ii) обнаружение субъекта как подверженного риску развития медицинского осложнения на основании более высокого уровня бесклеточных нуклеосом по сравнению с контролем; и

(iii) проведение лечения субъекта.

В предпочтительных вариантах осуществления респираторная инфекция представляет собой грипп или коронавирус, а медицинское осложнение представляет собой пневмонию. Подходящие виды лечения могут включать без ограничения респираторную поддержку с использованием экстракорпоральной оксигенации, респираторную поддержку с использованием аппарата искусственной вентиляции легких, предназначенного для обеспечения механической вентиляции воздуха в легкие и из легких пациента, который физически не может дышать в достаточной степени без посторонней помощи, и/или подачу кислорода и/или противовирусные, антибактериальные или противовоспалительные лекарственные средства.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения представлен способ лечения инфекции, включающий определение пациента, нуждающегося в лечении указанной инфекции, с использованием панельного теста и проведение указанного лечения, при этом панельный тест включает реагенты для обнаружения измерений нуклеосом или их компонентов. Ожидается, что пациент с инфекцией будет иметь более высокий уровень бесклеточных нуклеосом по сравнению с контролем.

Терапевтические антитела

Терапевтические антитела вводят внутривенно для нейтрализации молекул, вызывающих повреждение или заболевание у субъекта. Терапевтические антитела и другие подобные или производные терапевтические связывающие вещества, такие как Fab- и Fv-фрагменты, обычно являются человеческими или гуманизированными по природе их аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей. Терапевтические антитела и способы их разработки и получения хорошо известны в данной области техники. Таким образом, в дополнительном аспекте настоящего изобретения представлено антитело к нуклеосоме для лечения тяжелых гипериммунных реакций, включая пневмонию.

Таким образом, в дополнительном варианте осуществления представлен способ лечения субъекта, инфицированного вирусом дыхательных путей, с медицинским осложнением, включающий следующие стадии:

(i) измерение уровня бесклеточных нуклеосом (необязательно в сочетании с уровнем одного или нескольких интерлейкинов) в образце, полученном от субъекта;

(ii) обнаружение субъекта как имеющего медицинское осложнение на основании более высокого уровня бесклеточных нуклеосом по сравнению с контролем; и

(iii) введение субъекту терапевтического антитела к нуклеосоме.

Профилактика или ингибирование нетоза посредством лечения ингибиторами нетоза снижает уровень NET и нуклеосом в кровотоке и/или тканях субъектов, страдающих от состояний, связанных с неадекватно высокими уровнями NET. Было показано, что это приводит к улучшению клинических исходов у субъектов, страдающих заболеваниями, связанными с нетозом, такими как сепсис или инсульт (Figueiredo et al., Immunity (2013) 39: 874–884 and Zhang *et al.*, Science Advances (2019) 5: eaax7964). Аналогичным образом, удаление NET и нуклеосом из кровотока и/или тканей субъекта, страдающего патологическими состояниями, связанными с нетозом, приводит к улучшению клинических исходов.

В иммуноанализах, описанных в данном документе, для измерения H3.1-нуклеосом, цитруллинированных нуклеосом, MPO и NE, используют моноклональные антитела с высокой авидностью и специфичностью для связывания с нуклеосомами и NET. Эти антитела прочно и специфически связываются с NET, метаболитами NET и нуклеосомами. Таким образом, эти антитела можно использовать в качестве терапевтических антител для связывания с NET *in vivo*, чтобы нейтрализовать NET и облегчить их выведение из организма, например, путем фагоцитоза (Weiskopf and Weissman, Mabs (2015) 7:303–10).

CRP представляет собой белок острой фазы, который, как известно, физически ассоциирован с NET, который может дополнительно вызывать нетоз. Таким образом, антитела к CRP могут нейтрализовать и удалять NET, а также ингибировать индукцию нетоза посредством нейтрализации и клиренса CRP.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения представлен способ лечения заболевания, связанного с нетозом, включающий введение терапевтического антитела, направленного на связывание с нуклеосомой или ее компонентом, ДНК, миелопероксидазой, нейтрофильной эластазой или С-реактивным белком. Терапевтическое антитело способно нейтрализовать или способствовать удалению NET у субъекта, страдающего заболеванием. Способы введения терапевтических антител хорошо известны в данной области техники.

В другом аспекте настоящего изобретения представлено терапевтическое антитело к нуклеосоме, к ДНК, к миелопероксидазе, к нейтрофильной эластазе или к С-реактивному белку для применения в лечении состояния, связанного с избыточным или неадекватным

нетозом (т.е. заболевания, связанного с нетозом).

Антитело к гистону H3.1, антитело к нуклеосоме и антитело к цитруллинированному H3, используемые изобретателями для анализа нуклеосом, описанного в данном документе, были выбраны как высокоактивные и специфичные антитела и поэтому особенно применимы в качестве терапевтических антител.

В частности, антитело к гистону H3.1 может быть высокоспецифичным. Нуклеосомы подвергаются клиппированию, при котором гистоновый хвост физически и необратимо удаляется посредством регулируемого протеолиза или клиппирования. Кроме того, было показано, что расщепление гистонов участвует в формировании NET (см. Papayannopoulos et al. (2010) J. Cell Biol. 191(3): 677–691). Сообщается, что на гистоне H3 клиппирование происходит вокруг положения аминокислоты 21 (Yi and Kim (2018) BMB Reports, 51(5): 211-218). Аминокислотная последовательность гистона H3.1 в положениях 27-36 представляет собой KSAPATGGVK (SEQ ID NO: 1). Аминокислотная последовательность в положениях 29-35 не включает какие-либо обычно посттрансляционно модифицированные аминокислоты (например, лизин, серин или аргинин). Таким образом, антитела, направленные на связывание с этим эпитопом (т.е. в положениях аминокислот 29-35), не подвержены или затронуты в минимальной степени статусом посттрансляционной модификации нуклеосомы и будут связываться со всеми или большинством нуклеосом, содержащих гистон H3.1, независимо от структуры PTM. Таким образом, твердофазное захватывающее антитело, выбранное изобретателями для использования в иммуноанализе, описанном в данном документе, представляло собой антитело к гистону H3.1, направленное на связывание с эпитопом, расположенным в коре гистона рядом с положением аминокислоты 30-33, так что как интактные, так и клиппированные нуклеосомы захватываются антителом независимо от их статуса PTM. Это сводит к максимуму захват нуклеосом H3.1, и эффективность этого подхода очевидна на Фиг. 6. Аминокислотная последовательность гистона H3.1 известна в данной области техники и описана под номером доступа UniProt P68431.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое антитело направлено на связывание с коровым гистоновым эпитопом гистона H3.1 в аминокислотном эпитопе, расположенном выше аминокислотного положения 21. В предпочтительном варианте осуществления терапевтическое антитело к гистону H3.1 направлено на связывание с эпитопом, расположенным внутри кора гистона H3, в положении аминокислоты 29-35 или рядом с ним, в частности, в положении аминокислоты 30-33 или рядом с ним.

Меченое антитело, используемое авторами настоящего изобретения для

иммунологического анализа, представляло собой антитело к нуклеосоме, направленное на связывание с конформационным нуклеосомным эпитопом, присутствующим в интактных нуклеосомах, содержащих кор гистонового октамера в комплексе с ДНК. Антитело не связывается (или связывается слабо) со свободными октамерными комплексами гистонов, свободными гистонами (т.е. без ДНК), свободной ДНК или свободными гистонами. Также антитело может относительно не испытывать действие композиции PTM гистона связываемых нуклеосом.

Следовательно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое антитело направлено на связывание с конформационным нуклеосомным эпитопом, присутствующим в интактных нуклеосомах, содержащих кор гистонового октамера в комплексе с ДНК.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое антитело предназначено для селективного связывания с клиппированными нуклеосомами, например, путем связывания с эпитопом, присутствующим в клиппированных нуклеосомах, в которых удалены один или несколько гистоновых хвостов. В этом варианте осуществления эпитоп мог быть ранее замаскирован в интактных нуклеосомах за счет присутствия полных гистоновых хвостов (таким образом предотвращая связывание антител). Таким образом, эпитоп, связываемый антителом, селективным в отношении клиппированных нуклеосом, может представлять собой эпитоп, который недоступен в интактных (т.е. целых или неклиппированных) нуклеосомах. В одном варианте осуществления клиппированная нуклеосома содержит белок гистона H3, H2A и/или H4, у которого удален гистоновый хвост.

В одном варианте осуществления субъекту можно вводить смесь 2 или более терапевтических антител. Например, без ограничения смесь одного антитела, направленного на связывание с нуклеосомным эпитопом, присутствующим в интактных нуклеосомах, вместе с другим антителом, направленным на связывание с коровым гистоновым эпитопом гистона H3.1.

Антитела, используемые изобретателями для иммунологического анализа, представляют собой мышиные моноклональные антитела. Эти мышиные моноклональные антитела могли бы быть применимыми терапевтическими антителами у мышей. Использование у людей или других животных приведет к антигенному иммунному ответу и образованию антител против мышиного иммуноглобулина (поскольку моноклональные антитела представляют собой чужеродные белки). Для избежания антигенного ответа отличные от человеческих моноклональные антитела могут быть гуманизированы. Гуманизированные антитела представляют собой отличные от человеческих антитела,

белковый состав которых был изменен для того, чтобы быть похожим на состав встречающихся в природе человеческих антител, и хорошо известны в данной области техники. Антитела состоят из вариабельных доменов, включая области, определяющие комплементарность (CDR), которые являются уникальными для антитела и определяют специфичность и авидность связывания эпитопа антитела, а также константные домены, которые являются видоспецифическими. Один из способов гуманизации включает слияние ДНК, кодирующей вариабельные CDR отличного от человеческого антитела, с ДНК, кодирующей константные человеческие домены. Этот способ можно использовать для получения ДНК-вектора, кодирующего в основном человеческое антитело, которое не является антигенным для человека и обладает специфичностью связывания и авидностью исходного отличного от человеческого моноклонального антитела. Гуманизированные антитела могут быть получены в больших масштабах с использованием полученных ДНК-векторов.

Следовательно, в одном варианте осуществления терапевтическое антитело представляет собой гуманизированное антитело.

Следует понимать, что варианты осуществления, описанные в данном документе, могут применяться ко всем аспектам настоящего изобретения, т.е. варианты осуществления, описанные для вариантов применения, могут в равной степени применяться к заявленным способам и так далее.

Далее настоящее изобретение будет проиллюстрировано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

ПРИМЕР 1

Индуцировали образование NET в лейкоцитах в свежих образцах цельной крови здоровых людей путем добавления гепарина, а затем демонстрировали обнаружение материала NET, продуцируемого в плазме крови (Lelliott *et al*, International Immunology (2019) pii: dxz084). Собирали образцы цельной крови у двух здоровых добровольцев, у которых можно было бы ожидать низкие уровни циркулирующего материала NET, в пробирки для сбора плазмы крови с EDTA и в пробирки для сбора плазмы крови с гепарином. Две пробирки для сбора плазмы крови с EDTA незамедлительно центрифугировали для разделения клеточной и плазменной фракций для сведения к минимуму контаминации крупным хроматином (включая материал NET), и плазму крови переносили в криопробирки и замораживали. Две пробирки для сбора плазмы крови с гепарином инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа при осторожном вращении пробирок. Затем пробирки центрифугировали, плазму крови переносили в криопробирки и замораживали.

Образцы анализировали в отношении нуклеосом, содержащих изоформу гистона H3.1 (H3.1-нуклеосомы), используя процедуру ELISA в двух повторностях. Вкратце, 20 мкл образца добавляли в лунку микротитратора, содержащую магнитные частицы, предварительно покрытые антителом к гистону H3.1. Образец инкубировали, магнитные частицы выделяли и промывали. К магнитным частицам добавляли антитело к нуклеосоме, направленное на связывание конформационного нуклеосомного эпитопа, конъюгированного с пероксидазой хрена. Частицы инкубировали, затем выделяли и промывали. Связанное антитело к нуклеосоме измеряли с использованием окрашенной реакции субстрата. Результаты изображены на Фиг. 1 и показывают, что уровень материала NET был высоким в пробирках с гепарином, но низким в пробирках с EDTA. Это ясно показывает, что повышенные уровни циркулирующего материала NET могут быть обнаружены в простом недорогом иммуноанализе.

ПРИМЕР 2

ДНК экстрагировали из двух образцов с гепарином и плазмой крови, описанных в ПРИМЕРЕ 1, и наносили на прибор для капиллярного электрофореза на основе чипа (Agilent Bioanalyzer) для анализа ДНК по размеру фрагмента. Фрагменты ДНК размером примерно 150 п.о., соответствующие мононуклеосомам, имеют время удерживания примерно 60 секунд. Как показано на Фиг. 2, наблюдаемый уровень ДНК, ассоциированной с мононуклеосомами, был низким (как и ожидалось для здоровых добровольцев). Размер фрагмента ДНК, соответствующий материалу NET, имеет более длительное время удерживания, составляющее примерно 110 секунд. Как изображено на Фиг. 2, уровень материала NET был низким в плазме крови с EDTA (как и ожидалось для здоровых добровольцев), но высоким в пробирках с плазмой крови с гепарином, в которых образование NET стимулировали воздействием гепарина. Этот результат подтверждает, что повышенные уровни нуклеосом, наблюдаемые в плазме крови с гепарином в ПРИМЕРЕ 1 выше, были производными NET, а не мононуклеосомами.

ПРИМЕР 3

Образцы плазмы с EDTA собирают у 100 субъектов, все из которых имеют положительный результат на коронавирусную инфекцию, включая 50 контрольных субъектов с легкими симптомами и 50 тестируемых субъектов с респираторными осложнениями, нуждающихся в искусственной вентиляции легких. Циркулирующий материал NET измеряют с использованием метода иммуноанализа нуклеосом, как описано в ПРИМЕРЕ 1. Обнаружено, что 50 контрольных субъектов имеют низкие уровни нуклеосом NET, и эти уровни используют для установления контрольного диапазона. Было обнаружено, что у 50 тестируемых субъектов имеются более высокие уровни нуклеосом

NET, и эти высокие уровни используют в качестве индикатора того, что, помимо вирусной инфекции, у субъектов имеются респираторные осложнения, которые требуют лечения.

ПРИМЕР 4

Эксперимент, проведенный в ПРИМЕРЕ 3, повторяют, но в иммунологическом анализе измеряют цитруллинированные нуклеосомы. Было обнаружено, что 50 контрольных субъектов имеют низкие уровни цитруллинированных нуклеосом, и эти уровни используются для установления контрольного диапазона. Было обнаружено, что у 50 тестируемых субъектов имеются более высокие уровни цитруллинированных нуклеосом, и эти высокие уровни используют в качестве индикатора того, что, помимо вирусной инфекции, у субъектов имеются респираторные осложнения, которые требуют лечения.

ПРИМЕР 5

Эксперимент, проведенный в ПРИМЕРЕ 3, повторяют, но проводимый иммуноанализ измеряет уровни аддукта миелопероксидазы-нуклеосомы. Было обнаружено, что 50 контрольных субъектов имеют низкие уровни нуклеосом с миелопероксидазой, и эти уровни используются для установления контрольного диапазона. Было обнаружено, что у 50 тестируемых субъектов имеются более высокие уровни нуклеосом с миелопероксидазой, и эти высокие уровни используют в качестве индикатора того, что, помимо вирусной инфекции, у субъектов имеются респираторные осложнения, которые требуют лечения.

ПРИМЕР 6

Эксперимент, проведенный в ПРИМЕРЕ 3, повторяют, но проводимый иммуноанализ измеряет уровни аддукта нейтрофильной эластазы-нуклеосомы. Было обнаружено, что 50 контрольных субъектов имеют низкие уровни нуклеосом с аддукта нейтрофильной эластазой, и эти уровни используются для установления контрольного диапазона. Было обнаружено, что у 50 тестируемых субъектов имеются более высокие уровни нуклеосом аддукта нейтрофильной эластазой, и эти высокие уровни используют в качестве индикатора того, что, помимо вирусной инфекции, у субъектов имеются респираторные осложнения, которые требуют лечения.

ПРИМЕР 7

Эксперимент, проведенный в ПРИМЕРЕ 5, повторяют, но, кроме того, уровни CRP и IL6 также измеряют в образцах плазмы крови с EDTA или в образцах сыворотки крови от тех же субъектов. Алгоритм разработан с использованием логистического регрессионного анализа результатов, чтобы свести к максимуму клиническую чувствительность и специфичность для обнаружения тестируемых субъектов.

ПРИМЕР 8

Образцы плазмы с EDTA брали у 50 здоровых людей в 2019 году до вспышки COVID-19 и у 50 субъектов, госпитализированных в больницу с симптомами подозрения на инфекцию COVID-19. Из 50 субъектов, госпитализированных с симптомами инфекции COVID-19, у 34 был получен положительный результат в отношении инфекции COVID-19 с помощью теста полимеразной цепной реакции (ПЦР), а у 16 – отрицательный результат в отношении инфекции COVID-19 с помощью ПЦР-теста.

В число пациентов с симптомами включали как пациентов с тяжелой формой заболевания, так и с более легкой формой заболевания. 40 субъектов госпитализировали, в том числе 5 человек госпитализировали в ICU, из которых 2 субъекта получали искусственную вентиляцию легких в течение 9 и 10 дней соответственно. Госпитализированные субъекты с отрицательным результатом ПЦР на COVID-19, тем не менее, лечили от симптомов респираторной инфекции.

Уровни H3.1-нуклеосом измеряли в образцах плазмы крови, и результаты изображены на Фиг. 3. Все пациенты с положительным результатом ПЦР на COVID-19 имели повышенный уровень H3.1-нуклеосом в плазме крови, и на этом основании 100% пациентов с положительными результатами ПЦР на COVID-19 отличались от нормальных контролей по специфичности 94% (3 ложноположительных результата среди 50 контрольных субъектов) и AUC 98,7%.

Пациентов с положительным результатом ПЦР на COVID-19 можно разделить на 2 группы на основе их уровней H3.1-нуклеосомы. В первой группе, состоящей из 15 из 34 субъектов, уровень H3.1-нуклеосомы был ниже 600 нг/мл. Во второй группе, состоящей из 19 из 34 субъектов, уровни H3.1-нуклеосом превышали верхний предел диапазона анализа (>700 нг/мл).

Аналогичный паттерн наблюдался у 16пациентов с симптомами COVID-19, но с отрицательным результатом ПЦР, у 6 из которых уровень H3.1-нуклеосомы был ниже 600 нг/мл, а у 10 уровень H3.1-нуклеосомы составлял > 700 нг/мл.

ПРИМЕР 9

Для определения того, являются ли уровни циркулирующих H3.1-нуклеосом предикторами тяжести заболевания COVID-19, образцы плазмы крови с EDTA собирали у 14 субъектов, у которых диагностировали инфекция COVID-19 с помощью положительного результата ПЦР-теста на вирус COVID-19. Из них 5 образцов брали у субъектов, посещавших амбулаторный прием в больнице или при поступлении в отделение неотложной помощи больницы (ER), 3 образца брали у пациентов, госпитализированных в обычные отделения (т.е. не в отделении интенсивной терапии) и 6 образцов брали у

пациентов с очень тяжелым заболеванием, которых переводили в отделение интенсивной терапии (ICU) третичного больничного центра для высокого уровня респираторной и другой клинической поддержки, включая искусственную вентиляцию легких и экстракорпоральную мембранную оксигенацию (в которой пациентов канюлируют и функцию легких пациента заменяют перекачиванием крови через искусственный оксигенатор). Смертность этих субъектов составляла 4 смерти из 6.

Уровни циркулирующих H3.1-нуклеосом измеряли в образцах плазмы крови, и результаты изображены на Фиг. 4. Наблюдалось явное увеличение уровней между субъектами, протестированными в амбулаторных условиях/ER, и лицами, госпитализированными с инфекцией COVID-19 в обычные отделения. Площадь под кривой (AUC) для этого разделения составляла 100%. Также наблюдалось явное увеличение уровней у субъектов, госпитализированными по поводу инфекции COVID-19 в обычных палатах, по сравнению с теми, которых госпитализировали в ICU. AUC для этого разделения также составляла 100%. Более того, у 4 умерших пациентов обнаруживали 4 наиболее высоких уровня циркулирующих H3.1-нуклеосом. AUC для прогнозирования смертности также составляла 100%.

Результаты показывают, что уровни циркулирующих H3.1-нуклеосом позволяют прогнозировать тяжесть заболевания и смертность и могут использоваться для прогностических целей. Таким образом, способы по настоящему изобретению можно применять для прогнозирования уровня лечения, необходимого пациенту или субъекту на различных стадиях клинического процесса, в том числе при появлении респираторной инфекции, или на более поздних стадиях для определения уровня клинической поддержки и/или характера необходимого лечения.

Точно так же результаты показывают, что уровни циркулирующих H3.1-нуклеосом можно использовать для мониторинга пациентов путем серийного отбора образцов для определения того, повышаются или снижаются уровни, чтобы иметь информацию для клинических решений о будущем лечении и схемах клинической поддержки. Например, снижение уровня может указывать на решение о том, что интенсивная респираторная поддержка больше не является необходимой и/или используемое лечение является эффективным.

И наоборот, повышение уровня может служить основанием для принятия решения о необходимости интенсивной респираторной поддержки и/или о том, что используемое в настоящее время лечение неэффективно и что следует рассмотреть дополнительные или альтернативные виды лечения. Таким образом, способы по настоящему изобретению могут быть применены для отбора пациентов, нуждающихся в лечении состояния, связанного с

нетозом, включая, например, без ограничения лекарственное средство на основе ингибитора нетоза, лечение с удалением NET с помощью афереза или плазмафереза или противовоспалительное лечение, такое как лечение CD24 (например, EXO-CD24 или CD24Fc). Таким образом, способы по настоящему изобретению можно использовать в качестве сопутствующих диагностических продуктов для лекарственных средств и видов лечения заболеваний, связанных с нетозом.

Аналогичным образом, это также указывает на то, что способы по настоящему изобретению могут быть применимы для использования для оценки эффективности исследуемых лекарственных средств для лечения респираторных заболеваний. В одном варианте осуществления уровни циркулирующих H3.1-нуклеосом можно использовать в качестве суррогатной конечной точки в испытании лекарственного средства либо отдельно, либо в сочетании с другими параметрами.

ПРИМЕР 10

Для определения того, являются ли способы по настоящему изобретению эффективными для других фрагментов нуклеосом, тех же субъектов, описанных в ПРИМЕРЕ 9, также тестировали в отношении уровней циркулирующих нуклеосом, содержащих гистоновую модификацию цитруллинирования остатка аргинина в положении 8 гистона H3 (H3R8Cit-нуклеосома). Этот фрагмент нуклеосомы был выбран, поскольку известно, что хроматин NET цитруллинирован. Результаты изображены на Фиг. 5 и подтверждают, что способы по настоящему изобретению эффективны с использованием измерений цитруллинированных нуклеосом и, в более общем плане, с использованием измерений любого циркулирующего нуклеосомного фрагмента или фрагмента NET, включая MPO, NE или другие фрагменты компонента NET.

Результаты показывают, что уровни циркулирующих H3R8Cit-нуклеосом позволяют прогнозировать тяжесть заболевания и смертность и могут использоваться для прогностических целей. Аналогично, уровни H3R8Cit-нуклеосом можно использовать для прогнозирования уровня лечения, необходимого пациенту или субъекту на различных стадиях клинического процесса, и для мониторинга пациентов путем серийного отбора образцов, как описано выше в ПРИМЕРЕ 9 для уровней H3.1-нуклеосом.

ПРИМЕР 11

Образец крови берут у субъекта, страдающего заболеванием, связанным с нетозом, и анализируют на наличие нуклеосом, как описано в данном документе, в качестве индикатора избыточного продуцирования или сверхпродуцирования NET субъектом. Если измеренный уровень NET ниже порогового значения, пациенту не назначают терапию, ингибирующую нетоз, такую как терапию антрациклином. Если измеренный уровень NET

выше порогового значения, пациенту назначают терапию, ингибирующую нетоз, такую как терапию антрациклином. Дополнительные образцы крови берут через соответствующие интервалы (например, каждые 4 часа или ежедневно) для мониторинга снижения уровней NET в кровотоке субъекта для определения эффективности лечения. В применяемых таким образом способах по настоящему изобретению представлен комбинированный продукт, включающий терапию ингибитором нетоза и сопутствующую диагностику для отбора пациентов и мониторинга пациентов с патологическими уровнями NET, нуждающихся в терапии нетоза (например, противовирусное или антибактериальное лекарственное средство, противовоспалительное лекарственное средство, лекарственное средство для разжижения крови или ингибитор свертывания крови, лекарственное средство на основе ингибитора нетоза, лекарственное средство на основе ДНКазы, лекарственное средство на основе терапевтического антитела к нуклеосоме, лекарственное средство на основе терапевтического антитела к MPO и лекарственное средство на основе терапевтического антитела к NE или лечение на основе афереза или плазмафереза для удаления NET из кровотока).

ПРИМЕР 12

Сепсис вызывали у 16 свиней путем заражения бактериямиEscherichia coli (*E. coli*), вводимыми путем внутривенной инфузции в течение 3 часов (0-3 часа на Фиг. 6 и 7). Свиней с сепсисом лечили методом плазмаферезас удалением NET из кровотока, как описано в WO2019053243. Вкратце, цельную кровь удаляли из тела свиньи через трубку в устройство для плазмафереза, цельную кровь разделяли на фракцию клеток и фракцию плазмы крови, плазму крови пропускали через картридж для плазмафереза, содержащий связующее вещество для NET, с удалением NET из плазмы крови, затем плазма крови снова соединяли с клетками крови и возвращали в тело свиньи. Лечение плазмаферезом проводили в течение 5 часов (2-7 часов на Фиг. 6 и 7). Картриджи для плазмафереза, использованные для 9 свиней, содержали связующее вещество для NET (обработанные свиньи), а картриджи, использованные для других 7 свиней, не содержали связующего вещества (контрольные свиньи).

Ежечасно отбирали восемь образцов плазмы крови во временные точки через 0-7 часов после начала инфекции у каждой свиньи. Циркулирующие нуклеосомы измеряли, чтобы установить, был ли способ по настоящему изобретению (i) эффективным в качестве средства контроля за течением инфекции и (ii) эффективным в качестве средства контроля за эффективностью лечения.

Кроме того, образцы плазмы крови собирали из устройства для плазмафереза как перед картриджем (для отбора образцов плазмы крови, поступающей в картридж со

связующим веществом для NET), так и после картриджа (для отбора образцов плазмы крови, выходящих из картриджа со связующим веществом для NET), чтобы убедиться, что степень деплеции плазмы крови связующим веществами для NET в картридже можно контролировать способами по настоящему изобретению. Ежечасно отбирали пять образцов выше и пять ниже во временные точки через 3-7 часов после начала заражения (3-7 часов на Фиг. 6 и 7).

Образцы плазмы крови анализировали на наличие нуклеосом, содержащих уровни изоформы гистона H3.1 (H3.1-нуклеосома). Измерения для количественного анализа проводили с помощью иммунологического анализа с использованием автоматизированного прибора для иммунологического анализа. Вкратце, калибрант или образец (50 мкл) инкубировали с антителом к нуклеосоме, меченым эфиром акридиния (50 мкл), и буфером для анализа (100 мкл) в течение 1800 секунд при 37 °C. Добавляли магнитные гранулы, покрытые антителом к гистону H3.1 (20 мкл), и смесь инкубировали еще 900 секунд. Затем магнитные гранулы выделяли, промывали 3 раза и магнитно-связанный эфир акридиния определяли по выходу люминесценции в течение 7000 миллисекунд.

Средние результаты уровней циркулирующих H3.1-нуклеосом у контрольных свиней и обработанных свиней изображены на Фиг. 6a. У контрольных свиней (инфицированных, чтобы вызвать сепсис, но не обработанных) развился сепсис в течение следующих часов, и это отражалось в наблюдаемом повышении уровней циркулирующих H3.1-нуклеосом. Повышение средних уровней H3.1-нуклеосом было отчетливым через 1 час (после начала инфекции) и ускорялось через 3 часа, что согласуется с динамикой процесса нетоза. Уровни H3.1-нуклеосом продолжали возрастать и достигали 361 нг/мл через 7 часов. Сходное начальное повышение средних уровней циркулирующих H3.1-нуклеосом наблюдали у обработанных свиней через 0-2 часа. Начало лечения плазмаферезом через 2 часа приводило к замедлению роста уровней нуклеосом, а средний уровень, наблюдаемый через 7 часов, составлял 150 нг/мл. Это значительно ниже среднего уровня, наблюдаемого у контрольных свиней, что демонстрирует эффективность метода плазмафереза и показывает, что уровень H3.1 нуклеосом является эффективным средством контроля и лечения динамики и степени сепсиса, а также эффективным для мониторинга для процесса нетоза *in vivo*.

Средние результаты для уровней H3.1-нуклеосом в плазме крови, измеренных в образцах, взятых из устройства для плазмафереза перед картриджем во время работы, изображены на Фиг. 6b. Эти результаты аналогичны наблюдаемым для средних уровней циркулирующих H3.1-нуклеосом, измеренных на Фиг. 6a.

Средние результаты для уровней H3.1-нуклеосом в плазме крови, измеренных в

образцах, взятых из устройства для плазмафереза за картриджем во время работы, изображены на Фиг. 6c. Для контрольных свиней результаты на Фиг. 6c аналогичны результатам на Фиг. 6b (и 6a), показывая, что прохождение плазмы крови через картридж, не содержащий связующего вещества для NET, не оказало существенного влияния на наблюдаемый уровень H3.1-нуклеосом. Это согласуется с ожидаемым результатом, заключающимся в том, что на уровень NET в плазме крови не оказывал существенного влияния прохождение через картридж, не содержащий связующего вещества для NET. Для обработанных свиней все результаты на Фиг. 6c являются низкими. Это согласуется с ожидаемым результатом, заключающимся в том, что прохождение плазмы крови через картридж, содержащий связующее вещество для NET, приводило к удалению большинства или всех NET из плазмы крови. Кроме того, результаты показывают, что связующее вещество для NET внутри картриджа не было насыщено NET через 7 часов и продолжало связывать все или большую часть NET, присутствующих в плазме крови, поступающей в устройство. Таким образом, измерения уровня H3.1-нуклеосом применимы для определения того, когда связывающий материал внутри картриджа становился насыщенным и, следовательно, больше не мог использоваться в качестве инструмента для удаления NET и должен быть замещенным новым картриджем.

Таким образом, объединенные результаты Фиг. 6b и 6c показывают, что измерения уровня H3.1-нуклеосом применимы в качестве средств мониторинга и руководства для лечения нетоза и сепсиса.

Результаты по уровням циркулирующих нуклеосом H3.1, измеренные в образцах, взятых у всех 16 свиней, изображены по отдельности на Фиг. 7a. Средний уровень H3.1-нуклеосом, наблюдаемый у контрольных свиней через 7 часов, составлял 361 нг/мл, и уровень был выше 120 нг/мл у всех контрольных свиней (диапазон 123-743 нг/мл). В отличие от этого, средний уровень H3.1-нуклеосом, наблюдаемый у обработанных свиней через 7 часов, составлял 150 нг/мл, и уровень был ниже 120 нг/мл у большинства (7 из 9) обработанных свиней (диапазон 27-111 нг/мл). Полученные результаты демонстрируют эффективность метода лечения плазмаферезом. Результаты также показывают, что уровень H3.1 нуклеосом является эффективным средством мониторинга и лечения динамики и степени сепсиса, а также эффективным средством мониторинга и лечения избыточного нетоза *in vivo*. Более того, результаты на Фиг. 7a показывают, что измерения уровней циркулирующих H3.1-нуклеосом можно использовать для обнаружения индивидуумов с повышенным уровнем NET в качестве подходящих кандидатов для лечения для снижения уровней NET или нетоза.

7 контрольных свиней имели повышенный уровень нуклеосом, а также повышенные

показатели клинического стресса и нуждались в более интенсивной медицинской поддержке, чем 7 обработанных свиней с более низким уровнем нуклеосом. Более того, 2 обработанные свиньи, у которых наблюдали уровни H3.1-нуклеосом выше 120 нг/мл, также имели повышенные показатели клинического стресса и нуждались в более интенсивной медицинской поддержке. Таким образом, способ по настоящему изобретению является успешным способом мониторинга эффективности лечения нетоза.

Результаты для уровней H3.1-нуклеосом в плазме крови, измеренных в образцах, взятых из устройства для плазмафереза перед картриджем во время работы, показаны индивидуально для всех 16 свиней на Фиг. 7b. Как описано выше для Фиг. 6, результаты, показанные на Фиг. 7b, аналогичны результатам на Фиг. 7a. Средний уровень H3.1-нуклеосом, наблюдаемый у контрольных свиней через 7 часов, составлял 368 нг/мл (диапазон 121-629 нг/мл). В отличие от этого, уровень H3.1-нуклеосомы, наблюдаемый у обработанных свиней через 7 часов, был ниже, со средним результатом 143 нг/мл (для всех 9 обработанных свиней). Для 7 отвечающих на обработку свиней диапазон результатов через 7 часов составлял 34-127 нг/мл.

Результаты для уровней H3.1-нуклеосом в плазме крови, измеренных в образцах, взятых из устройства для плазмафереза за картриджем во время работы, показаны индивидуально для всех 16 свиней на Фиг. 7c. Средний уровень H3.1-нуклеосом, измеренный у контрольных свиней через 7 часов, составлял 378 нг/мл (диапазон 147-617 нг/мл). В отличие от этого, средний уровень H3.1-нуклеосом, наблюдаемый в плазме крови после картриджа через 7 часов у обработанных свиней, составлял 2,4 нг/мл (диапазон 0,7-6,5 нг/мл) и был ниже 7 нг/мл во все временные точки для всех 9 обработанных свиней.

Объединенные результаты Фиг. 7b и 7c показывают, что измерения уровня H3.1-нуклеосом применимы в качестве средств мониторинга и руководства для лечения нетоза и сепсиса.

В совокупности результаты, изображенные на Фиг. 7, показывают, что схема лечения плазмаферезом была успешной в удалении NET из кровотока у всех 9 обработанных свиней, и что 7 из 9 свиней хорошо отвечали на эту обработку, в то время как 2 не отвечали. Эти результаты по нуклеосомам крайне высоко коррелировали с клиническими наблюдениями за свиньями.

Более того, 7 свиней, отвечавших на обработку, можно явно отличать от свиней, не отвечавших на обработку, и необработанных свиней, на основе наблюдаемых результатов по нуклеосомам.

ПРИМЕР 13

Образцы плазмы крови получали от 20 субъектов-человек с диагнозом сепсис и 10

здоровых субъектов-людей. Образцы плазмы крови анализировали в отношении содержания нуклеосом, содержащих изоформу гистона H3.1 (H3.1-нуклеосома), с использованием автоматического прибора для иммуноанализа, как описано в ПРИМЕРЕ 12. В образцах при сепсисе наблюдали повышенные уровни по сравнению со здоровыми субъектами, что, вероятно, связано с влиянием нетоза на различные стадии этого заболевания (Фиг. 8).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ мониторинга прогрессирования заболевания у субъекта, страдающего инфекцией, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента;

(ii) повторение стадии (i) один или несколько раз; и

(iii) применение любых изменений уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента для мониторинга прогрессирования инфекции у субъекта.

2. Способ определения риска неблагоприятного исхода у субъекта, страдающего инфекцией, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня обнаруженных бесклеточных нуклеосом для определения вероятности неблагоприятного исхода у указанного субъекта,

при этом субъекту с высокой вероятностью неблагоприятного исхода назначают проведение медицинского вмешательства.

3. Способ по п. 1 или п. 2, причем инфекция представляет собой вирусную, бактериальную, грибковую или микробную инфекцию.

4. Способ по любому из пп. 1-3, причем инфекция представляет собой инфекцию дыхательных путей.

5. Способ по п. 4, причем инфекция дыхательных путей выбрана из: гриппа, пневмонии и тяжелого острого респираторного синдрома (SARS).

6. Способ по п. 1 или п. 2, причем субъект страдает сепсисом или септическим шоком.

7. Способ по любому из пп. 1-6, причем образец биологической жидкости представляет собой образец крови, сыворотки крови или плазмы крови.

8. Способ по любому из пп. 1-7, причем бесклеточная нуклеосома представляет собой часть внеклеточной нейтрофильной ловушки или получена из нее.

9. Способ по любому из пп. 1-8, причем компонент бесклеточной нуклеосомы содержит эпигенетический признак бесклеточной нуклеосомы.

10. Способ по п. 9, причем эпигенетический признак представляет собой изоформу гистона, такую как изоформа гистона коровой нуклеосомы, в частности, изоформа гистона H3.

11. Способ по п. 10, причем изоформа гистона представляет собой H3.1.

12. Способ по п. 9, причем эпигенетический признак представляет собой посттрансляционную модификацию гистона (PTM), такую как PTM гистона коровой нуклеосомы, в частности, PTM гистона H3 или H4.

13. Способ по п. 12, причем PTM гистона выбрана из цитруллинирования или рибозилирования.

14. Способ по любому из пп. 1-13, причем уровень бесклеточных нуклеосом или их компонентов определяют или измеряют с помощью иммуноанализа, иммунохимического анализа, масс-спектроскопии, хроматографии, иммунопреципитации хроматина или биосенсорного метода.

15. Способ по любому из пп. 1-14, причем способ обнаружения или измерения включает приведение образца биологической жидкости в контакт с твердой фазой, содержащей связывающее средство, которое обнаруживает бесклеточные нуклеосомы или их компонент, и обнаружение связывания с указанным связывающим средством.

16. Способ по любому из пп. 1-15, причем способ обнаружения или измерения включает: (i) приведение образца в контакт с первым связывающим средством, которое связывается с эпигенетическим признаком бесклеточной нуклеосомы; (ii) приведение в контакт образца, связанного первым связывающим средством на стадии (i), со вторым связывающим средством, которое связывается с бесклеточными нуклеосомами; и (iii) обнаружение или количественную оценку связывания второго связывающего средства в

образце.

17. Способ по любому из пп. 1-16, причем субъектом является человек или животное.

18. Способ по любому из пп. 1-17, дополнительно включающий сравнение уровня бесклеточных нуклеосом или их компонентов в образце биологической жидкости субъекта с одним или несколькими контролями.

19. Способ по п. 18, причем контролем является здоровый субъект.

20. Способ по п. 18, причем контролем является субъект с инфекцией без проявления симптомов или со слабо выраженными симптомами.

21. Способ по любому из пп. 1-20, причем уровень бесклеточных нуклеосом или их компонентов повышен по сравнению с контролем.

22. Способ по любому из пп. 1-21, причем уровень бесклеточных нуклеосом определяют или измеряют в качестве одного из параметров панели измерений.

23. Способ по п. 22, причем панель содержит один или несколько интерлейкинов.

24. Способ по п. 23, причем один или несколько интерлейкинов выбраны из группы, состоящей из IL-6 и IL-12.

25. Способ по любому из пп. 22-24, причем панель содержит С-реактивный белок (CRP), миелопероксидазу (MPO), D-димер и/или протеазу, активирующую фактор VII (FSAP).

26. Способ по любому из пп. 22-25, причем панель содержит MPO.

27. Способ обнаружения субъекта, нуждающегося в лечении пневмонии, острого респираторного синдрома (ARS), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS) или тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня бесклеточных нуклеосом в качестве индикатора того, что субъект нуждается в медикаментозном лечении пневмонии, ARS, ARDS или SARS.

28. Способ обнаружения субъекта, нуждающегося в медикаментозном лечении сепсиса или септического шока, включающий:

(i) приведение в контакт образца биологической жидкости, полученного от субъекта, со связывающим средством для обнаружения или измерения уровня бесклеточных нуклеосом или их компонента; и

(ii) применение уровня бесклеточных нуклеосом в качестве индикатора того, что субъект нуждается в медикаментозном лечении сепсиса или септического шока.

29. Способ лечения заболевания, связанного с нетозом, включающий введение терапевтического антитела, направленного на связывание с нуклеосомой или ее компонентом, миелопероксидазой, нейтрофильной эластазой или С-реактивным белком.

30. Способ по п. 29, причем заболевание, связанное с нетозом, включает высокие уровни внеклеточных нейтрофильных ловушек.

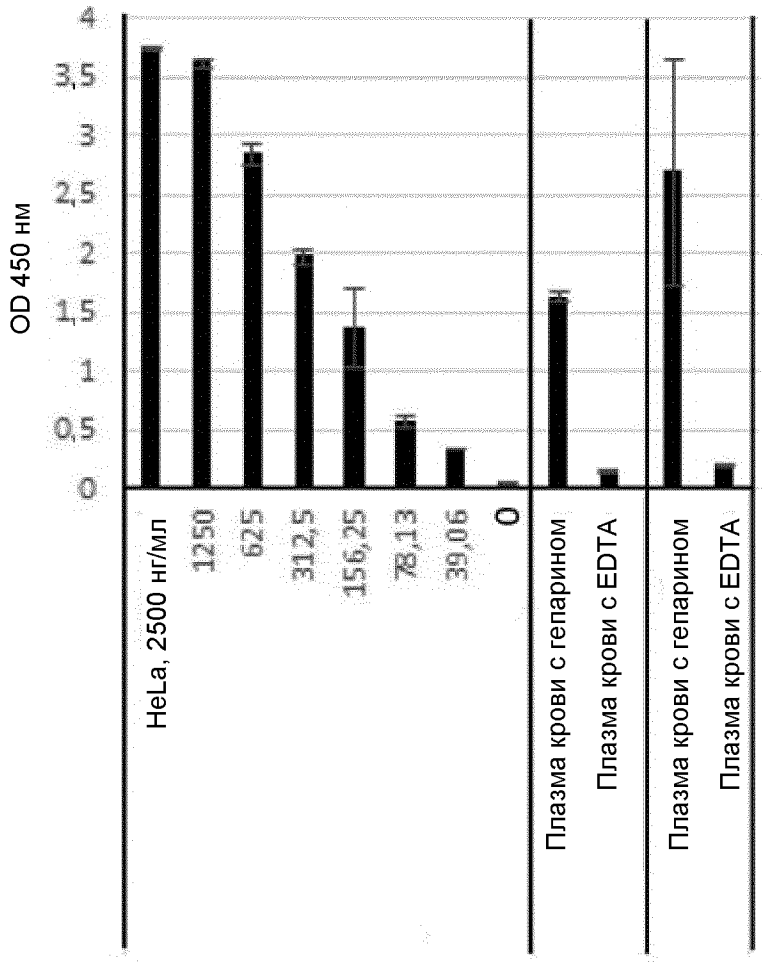
31. Способ по п. 29 или п. 30, причем заболевание, связанное с нетозом, представляет собой вирусную или бактериальную инфекцию..

32. Способ по любому из пп. 29-31, причем терапевтическое антитело направлено на связывание с эпитопом, присутствующим в интактных нуклеосомах.

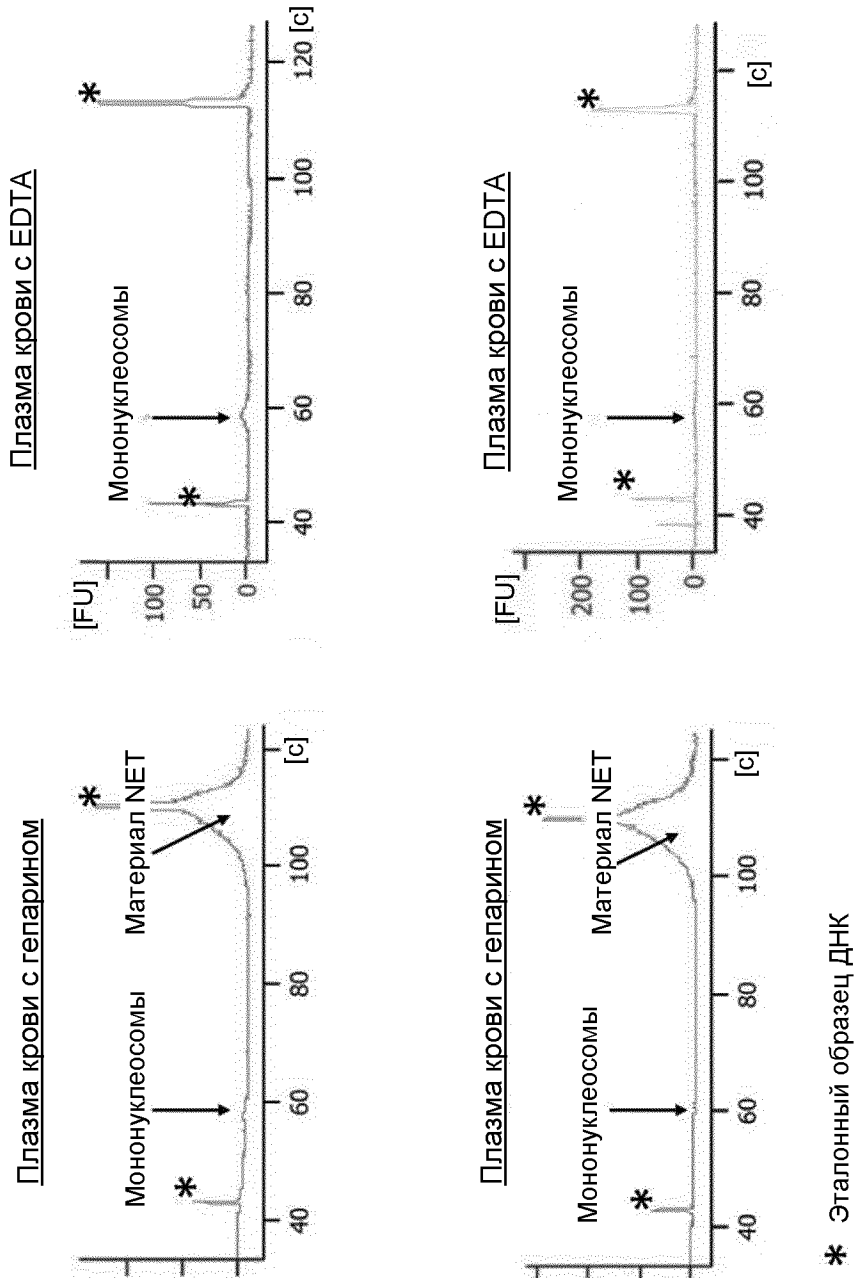
33. Способ по любому из пп. 29-31, причем терапевтическое антитело направлено на связывание с эпитопом, присутствующим в клиппированной нуклеосоме.

34. Способ по любому из пп. 29-33, причем терапевтическое антитело направлено на связывание с компонентом нуклеосомы, который представляет собой гистон H3.1 или цитруллинированный гистон.

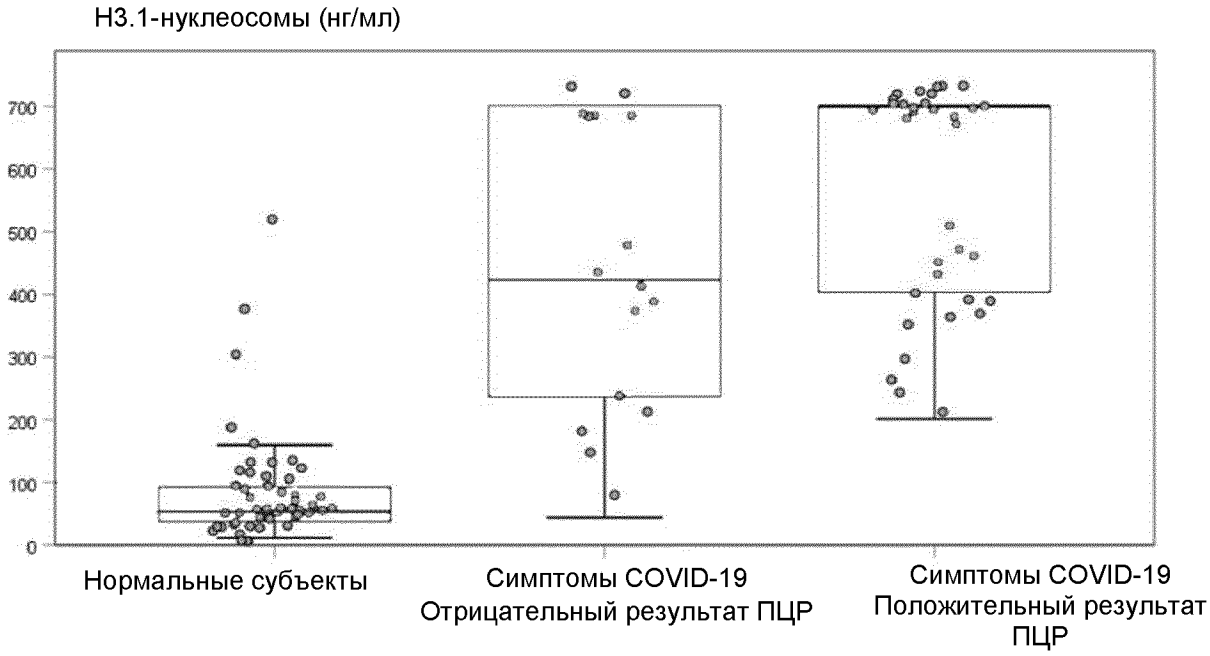
35. Способ по любому из пп. 29-34, причем терапевтическое антитело направлено на связывание с эпитопом гистона H3.1, расположенным в аминокислотном положении 30-33 в аминокислотной последовательности гистона H3.1


OD 450 нм
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
HeLa, 2500 нг/мл
1250
625
312,5
156,25
78,13
39,06
0
Плазма крови с гепарином
Плазма крови с EDTA
Плазма крови с гепарином
Плазма крови с EDTA
Пациент 1
Пациент 2

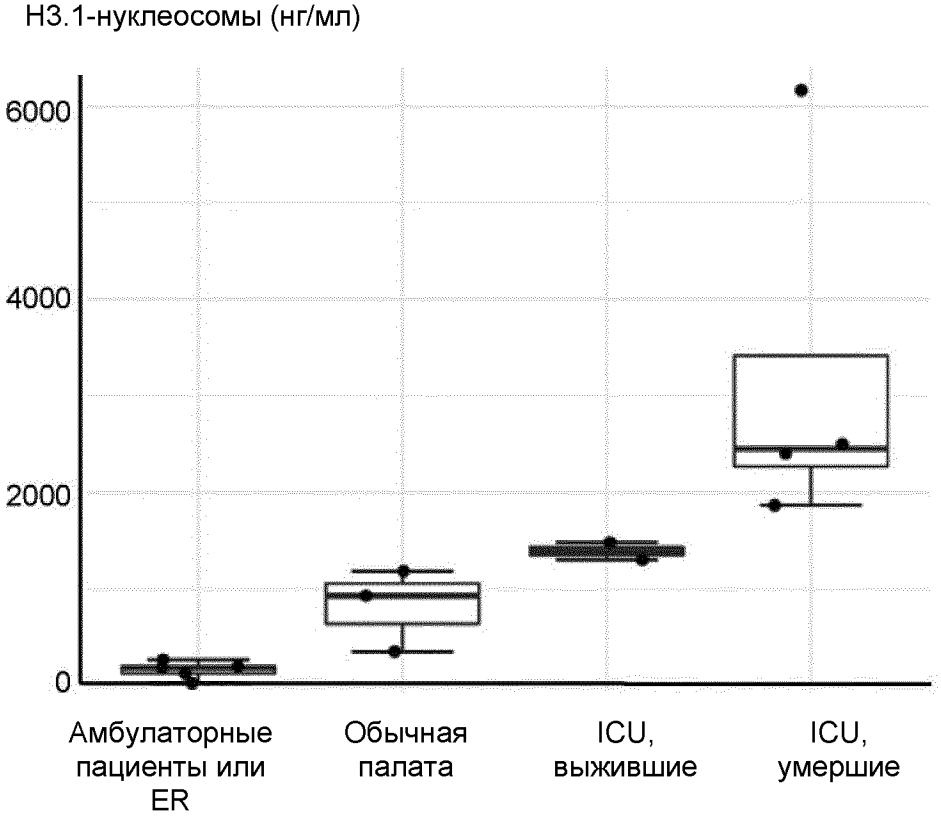
ФИГ. 1


Плазма крови с EDTA
Мононуклеосомы
[FU]
[c]
Плазма крови с гепарином
Материал NET
Субъект 1
Субъект 2
* Эталонный образец ДНК

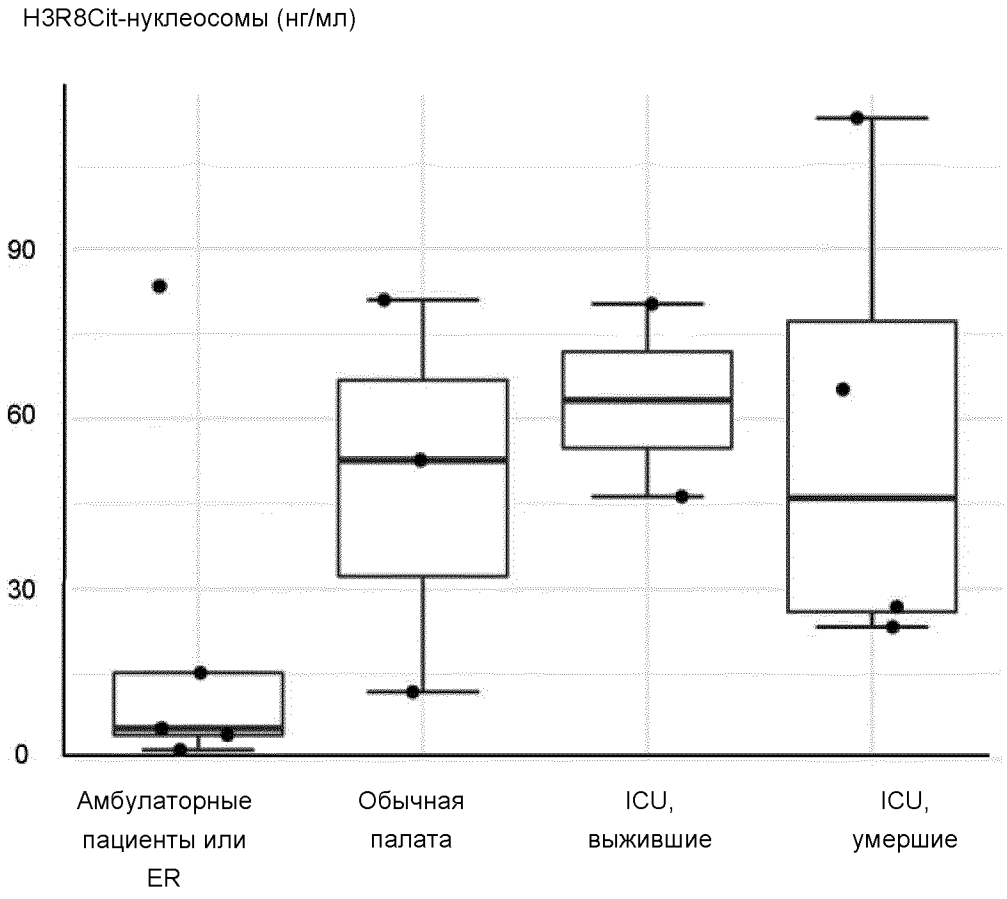
ФИГ. 2


H3.1-нуклеосомы (нг/мл)
700
600
500
400
300
200
100
0
Нормальные субъекты
Симптомы COVID-19
Отрицательный результат ПЦР
Симптомы COVID-19
Положительный результат
ПЦР

ФИГ. 3

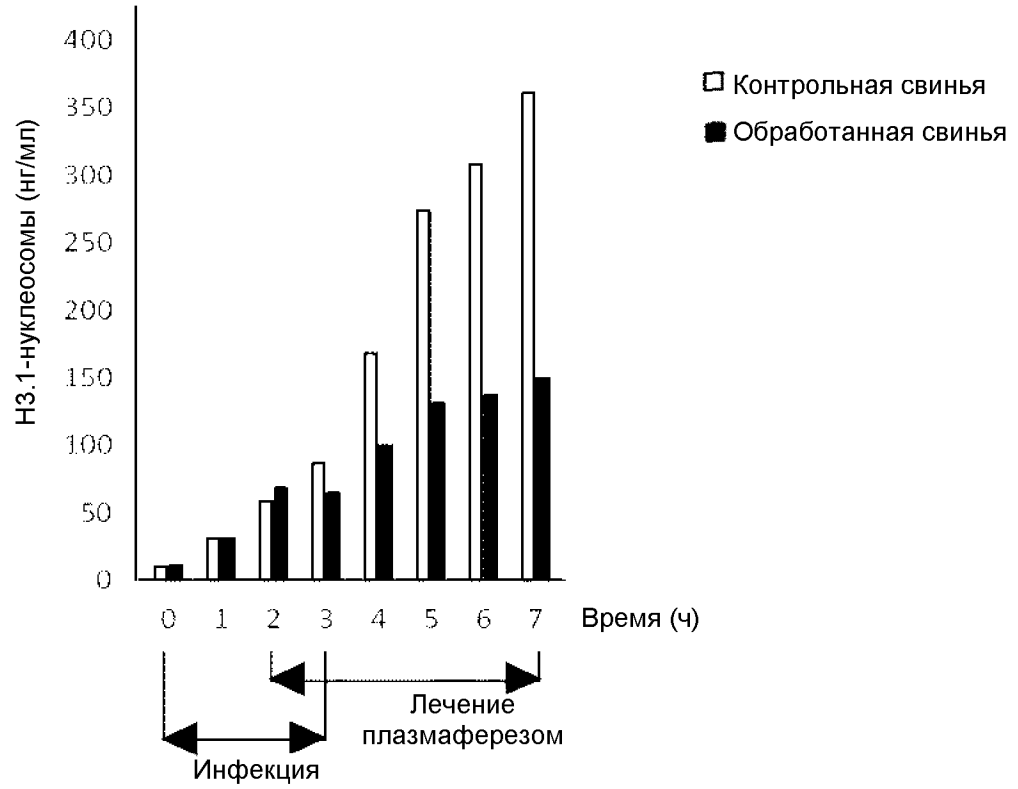

H3.1-нуклеосомы (нг/мл)
6000
4000
2000
0
Амбулаторные пациенты или ER
Обычная палата
ICU, выжившие
ICU, умершие

ФИГ. 4

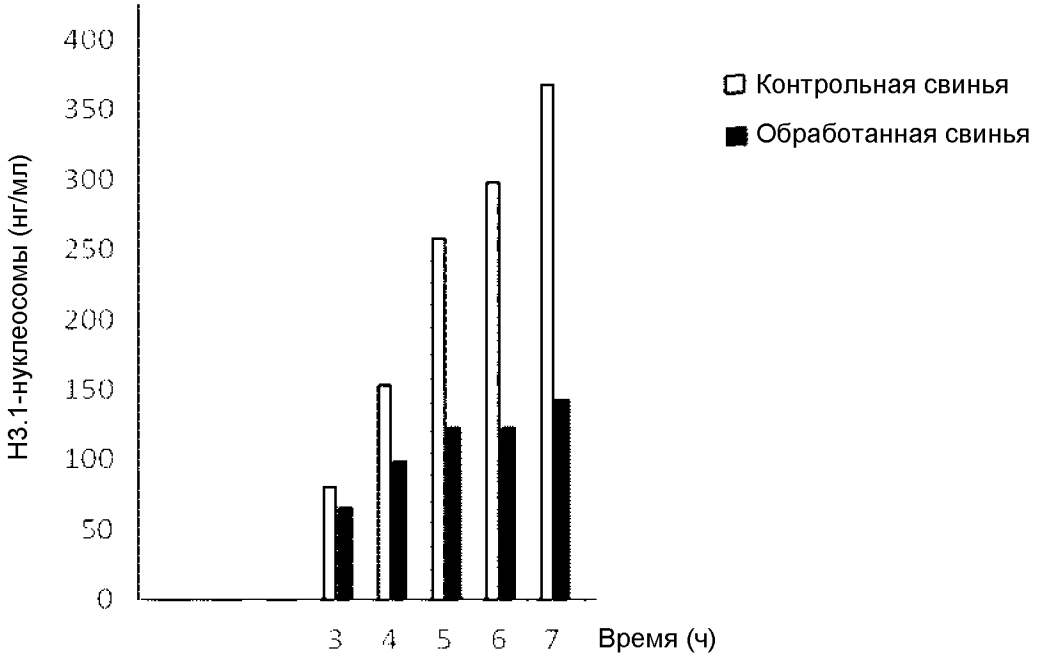

H3R8Cit-нуклеосомы (нг/мл)
90
60
30
0
Амбулаторные пациенты или ER
Обычная палата
ICU, выжившие
ICU, умершие

ФИГ. 5

(a) Образец плазмы крови, взятой у свиньи

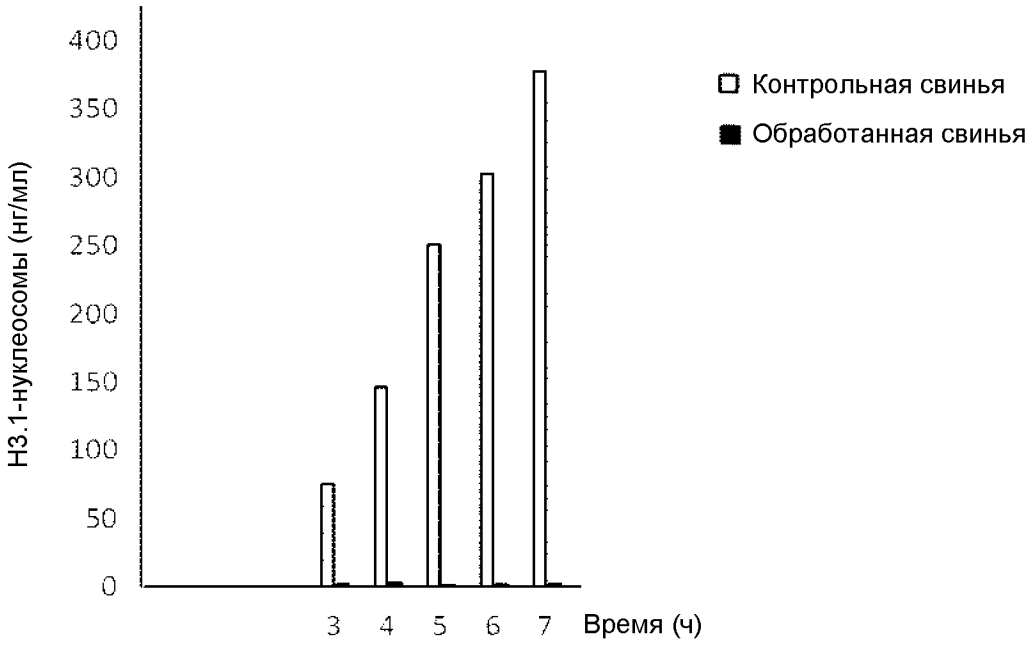


(b) Плазма крови, входящая в картридж



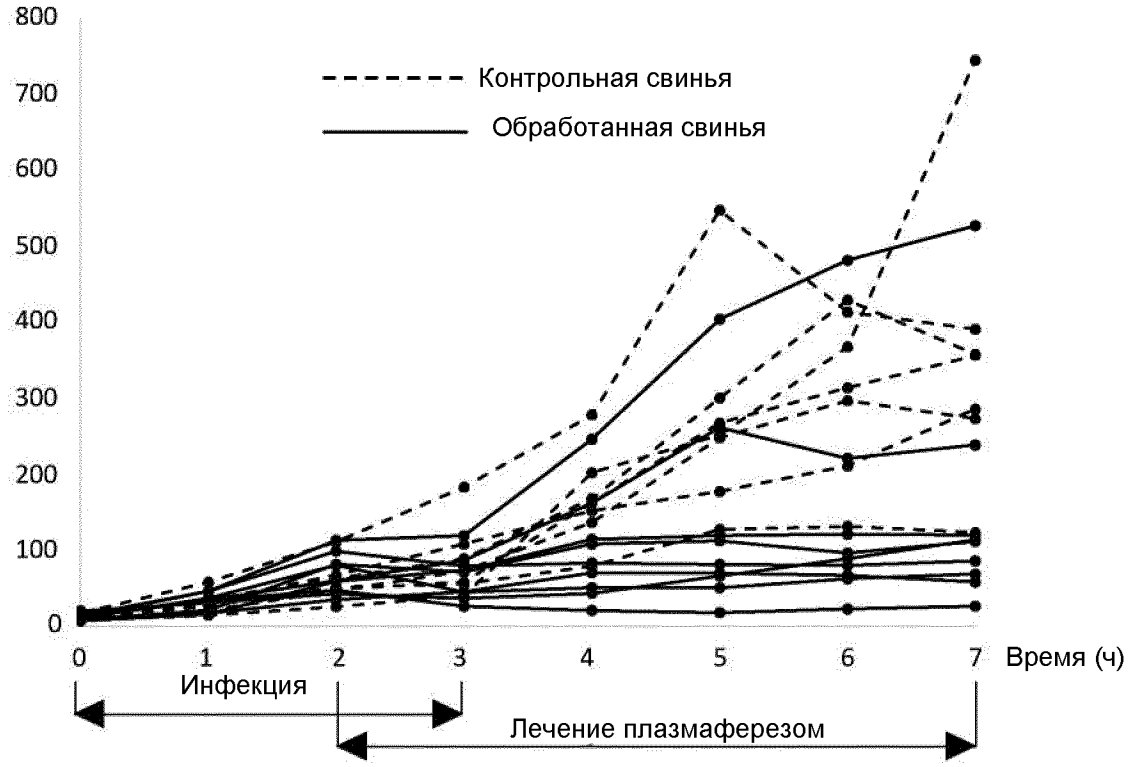
ФИГ. 6

(c) Плазма крови, выходящая из картриджа

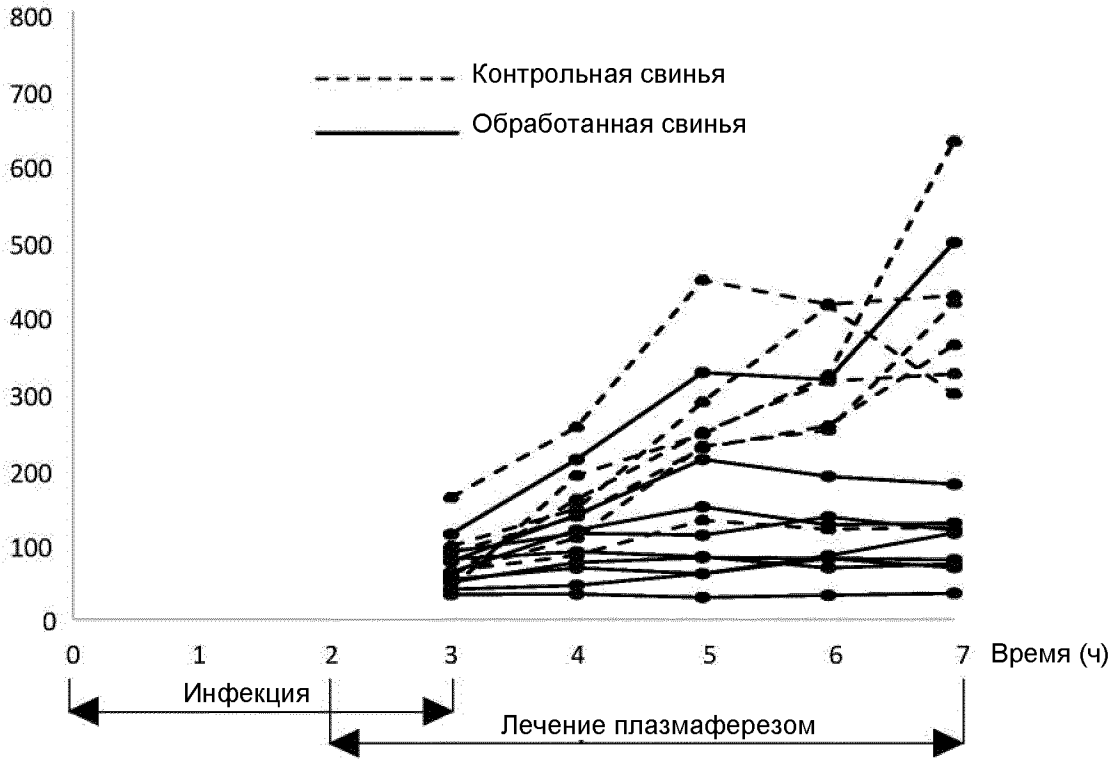


ФИГ. 6 (продолжение)

(a) Уровень H3.1-нуклеосом в образцах, взятых у свиньи (нг/мл)

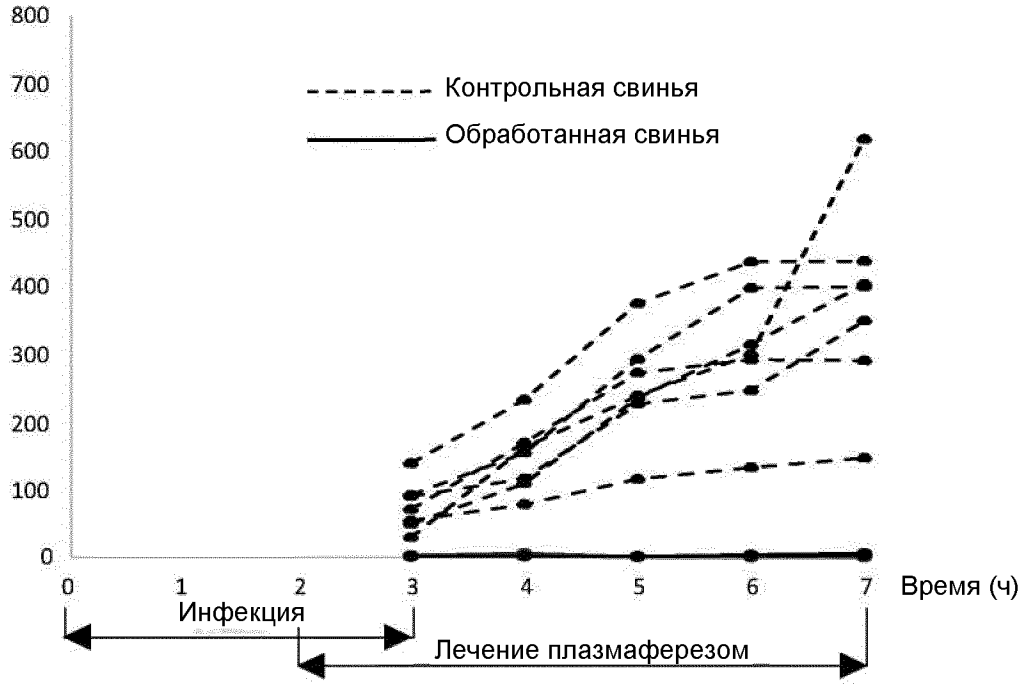


(b) Уровень H3.1-нуклеосомы в плазме крови, входящей в картридж (нг/мл)



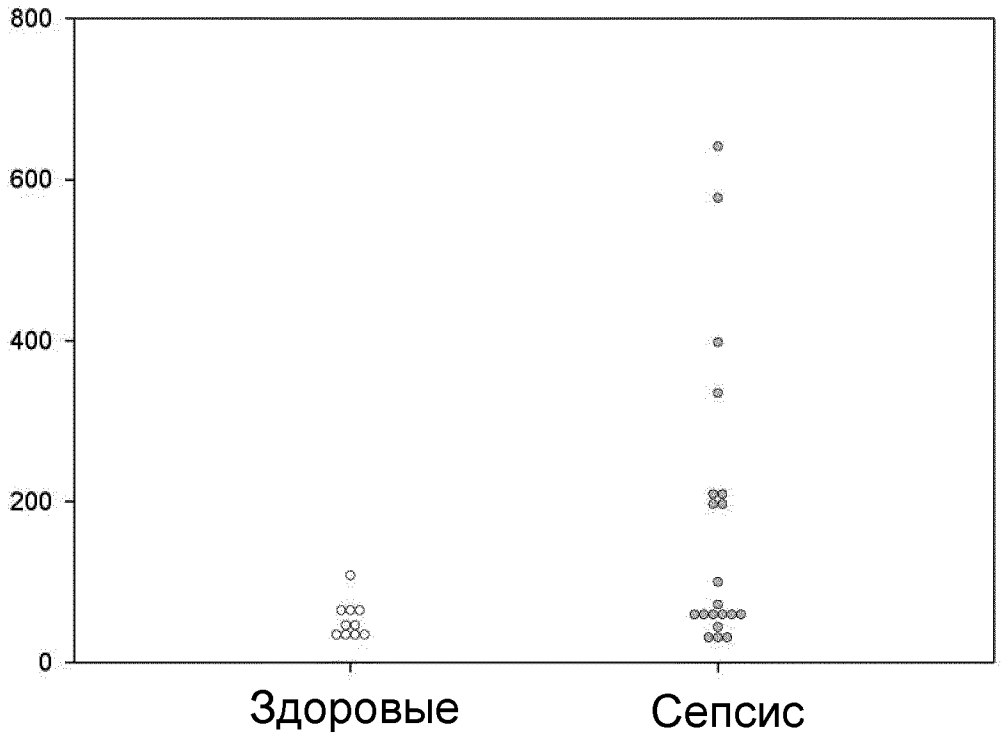
ФИГ. 7

(c) Уровень H3.1-нуклеосомы в плазме крови, выходящей из картриджа (нг/мл)



ФИГ. 7 (продолжение)

H3.1-нуклеосомы (нг/мл)



ФИГ. 8