



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110785662 A

(43)申请公布日 2020.02.11

(21)申请号 201880042330.3

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22)申请日 2018.04.26

代理人 张莉 黄革生

(30)优先权数据

731324 2017.04.26 NZ

736448 2017.10.16 NZ

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

C07K 14/195(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/NZ2018/050057 2018.04.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/199775 EN 2018.11.01

(71)申请人 奥克兰联合服务有限公司

地址 新西兰奥克兰

(72)发明人 N·J·莫兰 P·G·扬

T·普罗夫特

权利要求书8页 说明书42页

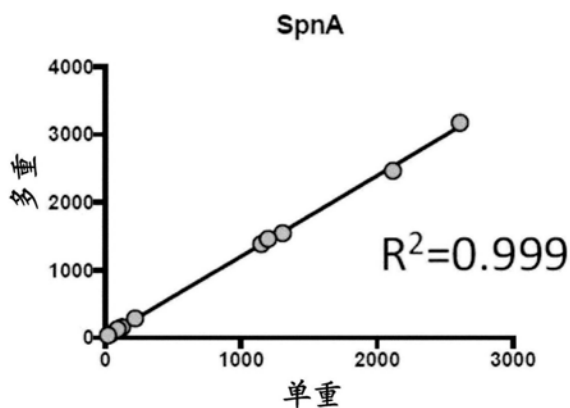
序列表8页 附图21页

(54)发明名称

分析和治疗方法和组合物及其用途

(57)摘要

本发明一般涉及用于在有需要的受试者中治疗、检测和辅助诊断化脓性链球菌感染、风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎(PSGN)的组合物和方法,以及用于评估发展为风湿热或PSGN的倾向的组合物和方法。本发明还提供重组多肽,包括重组化脓性链球菌SpnA多肽,和包含该多肽的组合物用于本发明方法中的用途。



1. 一种治疗患有风湿热或PSGN的患者的方法,该方法包括以下步骤:

i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌特异的一种或多种抗体;和

ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

iii) 评估受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

iv) 其中存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的检测量高于阈值,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌;

v) 其中存在风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,结合不存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的检测量低于阈值,指示受试者先前暴露于化脓性链球菌;和

vi) 如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用用于近期发作的风湿热或急性PSGN的治疗;如果受试者先前暴露于化脓性链球菌,则施用用于已经建立的或随后的化脓性链球菌感染的治疗,或施用用于风湿热或PSGN的治疗。

2. 一种使用对化脓性链球菌有效的抗生素治疗患有风湿热或PSGN的患者的方法,该方法包括以下步骤:

i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌特异的一种或多种抗体;

ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原和一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌DNaseB的抗原和/或一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SLO的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述的一个或多个群组的化脓性链球菌抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

iii) 检测复合物,其中

a. 存在化脓性链球菌SpnA特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA特异性复合物的检测量高于阈值,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌;和

b. 存在化脓性链球菌DNaseB特异性复合物和/或存在化脓性链球菌SLO特异性复合物,以及不存在化脓性链球菌SpnA特异性复合物或化脓性链球菌SpnA特异性复合物的检测量低于阈值,指示受试者先前暴露于化脓性链球菌,

iv) 如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素;如果受试者先前暴露于化脓性链球菌,则施用对已经建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的抗生素。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中用于近期发作的风湿热或急性PSGN的治疗、或用于近期的化脓性链球菌感染的治疗,是根据治疗方案施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素,所述治疗方案包括在急性治疗期内施用负荷剂量的所述抗生素。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述急性治疗期为约5天至约20天,例如,约8天至约15天,或约10天至约12天。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的方法,其中所述抗生素是比西林。

6. 一种用于检测受试者近期暴露于化脓性链球菌的方法,该方法包括:

i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的抗体;

ii) 使生物样品与两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述的两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原中的每个抗原群组能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成两个或两个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

iii) 检测复合物,其中高于阈值的一种或多种复合物的检测增加,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌。

7. 一种用于在受试者中检测或诊断风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎 (PSGN),包括急性链球菌感染后肾小球肾炎 (APSGN)、或在受试者中发生风湿热或PSGN的增加可能性的方法,该方法包括:

i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体;

ii) 使生物样品与两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述的两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原中的每个抗原群组能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成两个或两个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

iii) 检测复合物,其中高于阈值的一种或多种复合物的检测增加,指示发生风湿热或APSGN的可能性增加,或指示受试者近期暴露于化脓性链球菌作为受试者中存在风湿热或PSGN的一项指标;

iv) 评估风湿热或PSGN的一项或多项诊断指标;和

v) 其中高于阈值的一种或多种复合物的检测增加,结合风湿热或APSGN的一项或多项其他诊断指标,指示受试者中的风湿热或APSGN。

8. 一种用于检测受试者中存在化脓性链球菌感染的方法,该方法包括:

i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体;

ii) 使生物样品与两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述的两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原中的每一个抗原群组结合生物样品中的抗原特异性抗体以形成两个或两个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

iii) 检测复合物,其中一种或多种复合物的检测增加指示受试者中存在化脓性链球菌或受试者近期暴露于化脓性链球菌。

9. 一种用于检测生物样品中的化脓性链球菌抗原特异性抗体的方法,其中所述化脓性链球菌抗原特异性抗体特异性结合化脓性链球菌抗原,所述方法包括:

i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体;

ii) 使生物样品与两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原接触,其中如果生物样品

中存在抗原特异性抗体,则所述的两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原中的每一个抗原群组结合生物样品中的抗原特异性抗体以形成两个或两个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

iii) 检测复合物,其中一种或多种复合物的检测增加表明生物样品含有对化脓性链球菌抗原特异的抗体。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中一种或多种复合物的检测增加是相对于针对每个测试群组建立的参考抗原水平的增加。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体是一种或多种血清抗体。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述一种或多种血清抗体是一种或多种IgG抗体。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述一种或多种血清抗体是一种或多种IgA抗体或一种或多种IgM抗体。

14. 根据权利要求1或权利要求7所述的方法,其中一项或多项诊断指标是存在或不存在与风湿热或PSGN相关的一种或多种临床症状。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述一种或多种临床症状选自迁徙性多关节炎、心脏炎、血尿,边缘性红斑、皮下结节、西登哈姆氏舞蹈病或脓皮病。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中一种或多种化脓性链球菌抗原是来自以下蛋白之一的抗原:

- i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA),
- ii) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB), 或
- iii) 链球菌溶血素-O (SLO)。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法,其中一种或多种化脓性链球菌抗原选自:

- i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA), 或
- ii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段, 或
- iii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SpnA抗原性片段, 或
- iv) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB), 或
- v) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段, 或
- vi) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的DNaseB抗原性片段, 或
- vii) 链球菌溶血素-O (SLO), 或
- viii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段, 或
- ix) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SLO抗原性片段, 或
- x) 上述i) 至ix) 中两个或更多个的任意组合。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中使生物样品与以下每个化脓性链球菌抗原的群

组接触：

- i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA) , 或
- ii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段, 或
- iii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SpnA抗原性片段,
- 和
- iv) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB) , 或
- v) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段, 或
- vi) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的DNaseB抗原性片段,
- 和
- vii) 链球菌溶血素-O (SLO) , 或
- viii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段, 或
- ix) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SLO抗原性片段。

19. 根据权利要求17所述的方法, 其中使生物样品与以下每个化脓性链球菌抗原的群组接触:

- i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA) ,
- ii) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB) , 和
- iii) 链球菌溶血素-O (SLO) 。

20. 根据权利要求17所述的方法, 其中使生物样品与以下每个化脓性链球菌抗原的群组接触:

- i) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段;
- ii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段; 和
- iii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述的两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原存在于组合物中。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中化脓性链球菌抗原中的一种或多种用可检测的标记物标记, 和/或与微粒、珠或可检测试剂偶联。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述化脓性链球菌抗原群组中的一个或一个以上与珠或微粒共价结合。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中每个化脓性链球菌抗原群组与珠或微粒共价结合, 任选地其中每个不同的珠或微粒群彼此可区分。

25. 根据权利要求22至24中任一项所述的方法, 其中所述珠是聚苯乙烯珠、磁珠、羧化珠、官能化珠, 或其中微粒是聚苯乙烯微粒、磁微粒、羧化微粒或官能化微粒。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法, 其中检测抗原: 抗体复合物包括将复合物暴露于带有可检测标记物的特异性结合伴侣, 以及如果生物样品中存在抗原特异性抗

体,则检测来自标记物的信号。

27.根据权利要求26所述的方法,其中所述特异性结合伴侣包括抗体或其片段。

28.根据权利要求27所述的方法,其中所述特异性结合伴侣是抗IgG抗体、抗IgG-PE或其片段。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的方法,其中使用流式仪器、基于板的免疫测定、电泳和/或免疫印迹、免疫色谱条、电子生物传感器、共振生物传感器或微流体装置或传感器,检测抗原:抗体复合物。

30.根据权利要求1至29中任一项所述的方法,其中所述检测是通过ELISA或luminex测定法进行,或根据权利要求24所述的方法,其中所述免疫测定法是ELISA或luminex测定法。

31.根据权利要求30所述的方法,其中使用可检测地标记的第二抗体,检测一种或多种复合物或一种或多种抗原特异性抗体的存在。

32.根据权利要求31所述的方法,其中所述可检测地标记的第二抗体是抗IgG-PE。

33.根据权利要求1至32中任一项所述的方法,其中所述化脓性链球菌抗原被可检测地标记。

34.根据权利要求33所述的方法,其中所述可检测标记是荧光团。

35.根据权利要求1至34中任一项所述的方法,其中所述生物样品获自哺乳动物物种。

36.根据权利要求35所述的方法,其中所述生物样品是体液样品。

37.根据权利要求35或权利要求36所述的方法,其中所述受试者是人受试者。

38.分离的、纯化的或重组的SpnA多肽,其中所述SpnA多肽相对于野生型SpnA:

i) N-末端截短;

ii) C-末端截短;或

iii) N-末端截短和C-末端截短。

39.根据权利要求38所述的分离的、纯化的或重组的SpnA多肽,其中所述SpnA多肽

i) 是免疫原性的,或

ii) 与野生型SpnA具有免疫交叉反应性,或

iii) 被可检测地标记,或

iv) 与野生型SpnA相比,在室温储存时具有增强的稳定性,或

v) 包含来自SEQ ID No.8的10或更多个连续的氨基酸,或

vi) 上述i)至v)中的两个或更多个的任何组合。

40.根据权利要求38或权利要求39所述的分离的、纯化的或重组的SpnA多肽,其中所述多肽具有增强的热稳定性、增强的免疫原性稳定性、或增强的热稳定性和增强的免疫原性稳定性。

41.一种组合物,其包含权利要求38至40中任一项所述的分离的、纯化的或重组的SpnA多肽。

42.包含可检测地标记的SpnA的组合物。

43.一种试剂盒,用于检测或诊断受试者中风湿热或PSGN、用于检测受试者中化脓性链球菌感染的存在、或用于检测生物样品中化脓性链球菌抗原特异性抗体的存在,所述试剂盒包含组合物,所述组合物包含至少一种选自以下的化脓性链球菌抗原:

i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA),或

- ii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段,或
 - iii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SpnA抗原性片段,或
 - iv) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB), 或
 - v) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段,或
 - vi) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的DNaseB抗原性片段,或
 - vii) 链球菌溶血素-0 (SLO), 或
 - viii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段,或
 - ix) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SLO抗原性片段,
- 任选地包含参照抗体对照的至少一种组合物,其中抗体对照包含对试剂盒中存在的化脓性链球菌抗原之一特异的抗体,
- 任选地一种或多种试剂,其用于构成有助于所述一种或多种抗原与生物样品接触的介质,
- 任选地一种或多种试剂,其使得能够检测所述一种或多种抗原与生物样品中存在的一种或多种化脓性链球菌抗原特异性抗体之间形成的复合物,
- 和使用说明书。

44. 根据权利要求43所述的试剂盒,其中所述化脓性链球菌抗原中的至少一种与珠或微粒共价结合。

45. 根据权利要求43或权利要求44所述的试剂盒,其中所述组合物包含以下的群组:

- i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA), 或
- ii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段,或
- iii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列的至少10个连续的氨基酸组成的SpnA抗原性片段。

46. 根据权利要求45所述的试剂盒,其中所述组合物包含以下每个化脓性链球菌抗原的群组:

- i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA), 或
 - ii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段,或
 - iii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列的至少10个连续的氨基酸组成的SpnA抗原性片段,
- 和
- iv) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB); 或
 - v) 包含、基本上由或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段,或
 - vi) 包含、基本上由或由SEQ ID No.5的氨基酸序列中的至少10个连续的氨基酸组成的DNaseB抗原性片段,
- 和
- vii) 链球菌溶血素-0 (SLO), 或

viii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段,或

ix) 包含、基本上由或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SLO抗原性片段。

47. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括在步骤ii)之前提供根据权利要求43至46中任一项所述的试剂盒。

48. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或试剂盒,其中一种或多种化脓性链球菌抗原选自抗链球菌溶血素(ASO)、抗透明质酸酶(AHase)、抗链激酶(ASKase)、抗烟酰胺腺嘌呤二核苷酸酶(anti-NAD)。

49. 一种用于检测受试者近期暴露于化脓性链球菌的方法,该方法包括:

i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌SpnA特异的一种或多种抗体;

ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

iii) 检测复合物,其中高于阈值的一种或多种复合物的检测增加,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌。

50. 一种用于在受试者中检测或诊断风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎(PSGN),包括急性链球菌感染后肾小球肾炎(APSGN)、或在受试者中发生风湿热或PSGN的增加可能性的方法,该方法包括:

i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌SpnA特异的一种或多种抗体;

ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

iii) 检测复合物,其中高于阈值的一种或多种复合物的检测增加,指示发生风湿热或APSGN的可能性增加,或指示受试者近期暴露于化脓性链球菌作为受试者中存在风湿热或PSGN的一项指标;

iv) 评估受试者的风湿热或PSGN的一项或多项诊断指标;和

v) 其中高于阈值的一种或多种复合物的检测增加,结合风湿热或APSGN的一项或多项其他诊断指标,指示受试者中的风湿热或APSGN。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中一项或多项诊断指标是存在或不存在与风湿热或PSGN相关的一种或多种临床症状。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述一种或多种临床症状选自迁徙性多关节炎、心脏炎、血尿、边缘性红斑、皮下结节、西登哈姆氏舞蹈病或脓皮病。

53. 一种用于检测受试者中存在化脓性链球菌感染的方法,所述方法包括:

i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌SpnA特

异的一种或多种抗体；

ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触，其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体，则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物；和

iii) 检测复合物，其中一种或多种复合物的检测增加表明受试者中存在化脓性链球菌或受试者近期暴露于化脓性链球菌。

54. 一种用于检测生物样品中的化脓性链球菌抗原特异性抗体的方法，其中所述化脓性链球菌抗原特异性抗体特异性结合化脓性链球菌SpnA，所述方法包括：

i) 提供来自受试者的生物样品，所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌SpnA特异的一种或多种抗体；

ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原接触，其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体，则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物；和

iii) 检测复合物，其中一种或多种复合物的检测增加表明生物样品含有对化脓性链球菌抗原特异的抗体。

分析和治疗方法和组合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明一般涉及用于治疗、检测和辅助诊断化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 感染、风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎 (PSGN) 的组合物和方法, 以及用于评估发展为风湿热或PSGN的倾向的组合物和方法。

背景技术

[0002] A组链球菌 (GAS, 化脓性链球菌) 引起或与多种严重程度不同的疾病相关——从轻度皮肤感染和咽炎到严重的侵袭性疾病和感染后免疫后遗症, 如风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎 (PSGN)。急性风湿热和相关的风湿性心脏病是发展中国家获得性心脏病的主要原因。

[0003] 链球菌血清学对于诊断感染后免疫后遗症是至关重要的, 因为这些后遗症发生在GAS感染后数周, 而那时对病原菌进行诊断培养通常是不可能的。通常, 当前的临床实践包括测量两种抗原的抗体滴度: 链球菌溶血素-O (SLO) 和脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB)。血清学检查分别称为抗链球菌溶血素-O (ASO) 和抗脱氧核糖核酸酶-B (ADB)。ASO滴度通常使用浊度或比浊测定法测量, 并且通常以国际单位每毫升 (IU/mL) 报告值。ADB检查的标准化程度较低, 因为与ASO不同, 对于DNaseB没有参照血清。通常使用酶抑制测定法测量ADB滴度, 其中使用有色染料检测血清对DNaseB活性的抑制作用。

[0004] 令人困惑的是, 已经报道了ASO和ADB抗体应答的免疫动力学的显著变异性, 大多数患GAS咽炎的儿童在感染后持续一年以上呈现ASO和ADB滴度升高 (与感染前水平相比) [1]。因此, 存在假阳性诊断的实质性风险。

[0005] 仍然需要更有效的方法来鉴定患有或近期患有GAS感染的受试者、以及鉴定具有发生风湿热或PSGN倾向的受试者、以及更有效地检测和诊断风湿热或PSGN。

[0006] 本发明的目的是解决上述问题, 或提供方法和组合物用于检测和辅助诊断风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎、或用于评估发生风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎的倾向, 和/或至少为公众提供有用的选择。

[0007] 本说明书中引用的所有参照文献, 包括任何专利或专利申请, 均通过引用并入本文。不承认任何参照文献构成现有技术。参照文献的讨论陈述了其作者的主张, 而申请人保留质疑所引用文献的准确性和相关性的权利。应当清楚地理解, 尽管本文引用了许多现有技术出版物, 但是这种引用并不意味着承认这些文献中的任何在新西兰或任何其他国家中构成了本领域公知常识的一部分。

发明内容

[0008] 根据本发明的一个或多个方面, 实现了这些和其他目的。

[0009] 因此, 一方面, 本发明涉及一种用于检测受试者的化脓性链球菌近期暴露的方法, 该方法包括:

[0010] 提供来自受试者的生物样品, 所述生物样品能够或怀疑含有对一种或多种化脓性

链球菌抗原特异的抗体；

[0011] 使生物样品与两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原接触，其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体，则所述两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原中的每个群组均能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成两个或两个以上群组的抗原：抗原特异性抗体复合物；和

[0012] 检测复合物，其中一种或多种复合物的检测值增加到阈值以上指示该受试者近期暴露于化脓性链球菌。

[0013] 在另一方面，本发明涉及一种用于在受试者中检测或诊断风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎 (PSGN) (包括急性链球菌感染后肾小球肾炎 (APSGN))、或在受试者中检测或诊断发生风湿热或PSGN的增加可能性的方法，该方法包括：

[0014] i) 提供来自受试者的生物样品，所述生物样品能够或怀疑含有对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体；

[0015] ii) 使生物样品与两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原接触，其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体，则所述两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原中的每一个抗原群组都能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成两个或两个以上群组的抗原：抗原特异性抗体复合物；和

[0016] iii) 检测复合物，其中一种或多种复合物的检测值增加到阈值以上，指示发生风湿热或APSGN的可能性增加，或指示受试者近期暴露于化脓性链球菌作为受试者中存在风湿热或PSGN的一个指标；

[0017] iv) 评估风湿热或PSGN的一项或多项诊断指标；和

[0018] v) 其中一种或多种复合物的检测值增加到阈值以上，结合风湿热或APSGN的一项或多项其他诊断指标，指示受试者中的风湿热或PSGN。

[0019] 在另一方面，本发明涉及一种用于检测受试者中存在化脓性链球菌感染的方法，该方法包括：

[0020] i) 提供来自受试者的生物样品，所述生物样品能够或怀疑含有对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体；

[0021] ii) 使生物样品与两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原接触，其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体，则两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原中的每一个抗原群组都结合生物样品中的抗原特异性抗体以形成两个或两个以上群组的抗原：抗原特异性抗体复合物；和

[0022] iii) 检测复合物，其中一种或多种复合物的检测值增加表明受试者中存在化脓性链球菌或受试者近期暴露于化脓性链球菌。

[0023] 在另一方面，本发明涉及一种用于检测生物样品中化脓性链球菌抗原特异性抗体的方法，其中所述化脓性链球菌抗原特异性抗体特异性结合化脓性链球菌抗原，所述方法包括：

[0024] i) 提供来自受试者的生物样品，所述生物样品能够或怀疑含有对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体；

[0025] ii) 使生物样品与两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原接触，其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体，则所述两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原中的每一个

抗原群组均结合生物样品中的抗原特异性抗体以形成两个或两个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0026] iii) 检测复合物,其中一种或多种复合物检测值的增加表明生物样品含有对化脓性链球菌抗原特异的抗体。

[0027] 在各种实施方案中,一种或多种复合物检测值的增加是检测到一种或多种复合物的存在。

[0028] 因此,在一个实施方案中,用于检测或诊断受试者中风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎 (PSGN) (包括急性链球菌感染后肾小球肾炎 (APSGN))、或在受试者中发生风湿热或 PSGN 的增加可能性的方法包括:

[0029] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体;

[0030] ii) 使生物样品与两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原中的每一个抗原群组都能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成两个或两个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0031] iii) 检测复合物,其中一种或多种抗原:抗原特异性抗体复合物的存在指示发生风湿热或APSGN的可能性增加,或指示受试者近期暴露于化脓性链球菌作为受试者中存在风湿热或PSGN的一项指标;

[0032] iv) 评估风湿热或PSGN的一项或多项诊断指标;

[0033] v) 其中存在一种或多种抗原:抗原特异性抗体复合物,结合风湿热或APSGN的一项或多项其他诊断指标,指示受试者中的风湿热或PSGN。

[0034] 在另一个实施方案中,用于检测受试者中存在化脓性链球菌感染的方法包括:

[0035] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体;

[0036] ii) 使生物样品与两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原中的每一个抗原群组都结合生物样品中的抗原特异性抗体以形成两个或两个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0037] iii) 检测复合物,其中存在一种或多种抗原:抗原特异性抗体复合物表明受试者中存在化脓性链球菌或受试者近期暴露于化脓性链球菌。

[0038] 在另一个实施方案中,用于检测生物样品中化脓性链球菌抗原特异性抗体的方法,其中所述化脓性链球菌抗原特异性抗体特异性结合化脓性链球菌抗原,所述方法包括:

[0039] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体;

[0040] ii) 使生物样品与两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原中的每一个抗原群组都结合生物样品中的抗原特异性抗体以形成两个或两个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0041] iii) 检测复合物,其中存在一种或多种抗原:抗原特异性抗体复合物表明该生物

样品含有对化脓性链球菌抗原特异的抗体。

[0042] 一方面,本发明涉及一种治疗患有风湿热或PSGN的患者的方法,该方法包括以下步骤:

[0043] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌特异的一种或多种抗体;和

[0044] ii) 使生物样品与一个或多个群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或多个群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或多个群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0045] iii) 评估受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0046] iv) 其中存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的量的检测值高于阈值,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌;

[0047] v) 其中存在风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,结合不存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的量的检测值低于阈值,指示受试者先前暴露过化脓性链球菌;和

[0048] vi) 如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用用于近期发作的风湿热或急性PSGN的疗法;如果受试者先前暴露于化脓性链球菌,则施用用于已建立的 (established) 或随后的化脓性链球菌感染的疗法,或施用用于风湿热或PSGN的疗法。

[0049] 一方面,本发明涉及一种用对化脓性链球菌有效的抗生素治疗患有风湿热或PSGN的患者的方法,该方法包括以下步骤:

[0050] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌特异的一种或多种抗体;和

[0051] ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0052] iii) 评估受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0053] iv) 其中存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的量的检测值高于阈值,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌;

[0054] v) 其中存在风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,结合不存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的量的检测值低于阈值,指示受试者先前暴露于化脓性链球菌;和

[0055] vi) 如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用对急性或当前 (current infection) 化脓性链球菌感染有效的抗生素;如果受试者更早 (先前) 暴露于化脓性链球菌,则施用对已建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0056] 在一个方面,本发明涉及一种使用对化脓性链球菌有效的抗生素治疗患有风湿热或PSGN的患者的方法,该方法包括以下步骤:

[0057] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌特异的一种或多种抗体;

[0058] ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原和一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌DNaseB的抗原和/或一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SLO的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或多个群组的化脓性链球菌抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0059] iii) 检测复合物,其中

[0060] a. 存在化脓性链球菌SpnA特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA特异性复合物的量的检测值高于阈值,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌;和

[0061] b. 存在化脓性链球菌DNaseB特异性复合物和/或存在化脓性链球菌SLO特异性复合物,和不存在化脓性链球菌SpnA特异性复合物或化脓性链球菌SpnA特异性复合物的检测量低于阈值,则指示受试者先前暴露于化脓性链球菌,

[0062] iv) 如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素;如果受试者先前暴露于化脓性链球菌,则施用对已建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0063] 一方面,本发明涉及治疗患有风湿热或PSGN的患者的方法,该方法包括以下步骤:

[0064] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌特异的一种或多种抗体;

[0065] ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原和一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌DNaseB的抗原和/或一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SLO的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述的一个或多个群组的化脓性链球菌抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0066] iii) 检测复合物,其中

[0067] a. 存在化脓性链球菌SpnA特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA特异性复合物的检测量高于阈值,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌;和

[0068] b. 存在化脓性链球菌DNaseB特异性复合物和/或存在化脓性链球菌SLO特异性复合物,和不存在化脓性链球菌SpnA特异性复合物或化脓性链球菌SpnA特异性复合物的检测量低于阈值,则指示受试者先前暴露于化脓性链球菌,

[0069] iv) 如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用用于近期发作的风湿热或急性PSGN的疗法;如果受试者先前暴露于化脓性链球菌,则施用用于风湿热或PSGN的疗法。

[0070] 在另一方面,本发明涉及在有此需要的受试者中治疗风湿热或PSGN的方法,该方法包括以下步骤:

[0071] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌特异的一种或多种抗体;和

[0072] ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述的一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;

[0073] iii) 评估受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0074] iv) 其中存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的检测量高于阈值,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌;

[0075] v) 其中存在风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,结合不存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物,或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的检测量低于阈值,指示受试者先前暴露于化脓性链球菌;和

[0076] vi) 如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用用于近期发作的风湿热或急性PSGN的疗法;如果受试者先前暴露于化脓性链球菌,则施用用于风湿热或PSGN的疗法。

[0077] 在另一方面,本发明涉及一种在有此需要的受试者中治疗风湿热或PSGN的方法,该方法包括以下步骤:

[0078] i) 确定来自受试者的生物样品中一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体的存在、不存在或量;和

[0079] ii) 任选地,评估受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0080] iii) 如果样品包含高于阈值的量的一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体,则预测该受试者患有近期发作的风湿热或急性PSGN;和

[0081] iv) 向该受试者施用治疗有效量的对近期化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0082] 在一个实施方案中,治疗有此需要的受试者中的风湿热或PSGN的方法包括以下步骤:

[0083] i) 确定来自受试者的生物样品中一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体的存在、不存在或量;和

[0084] ii) 评估受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0085] iii) 如果样品包含高于阈值的量的一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体,并且受试者具有风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,则预测该受试者患有近期发作的风湿热或急性PSGN;和

[0086] iv) 向该受试者施用治疗有效量的对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0087] 在另一方面,本发明涉及一种在有此需要的受试者中治疗风湿热或PSGN的方法,该方法包括以下步骤:

[0088] i) 确定来自受试者的生物样品中一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体的存在、不存在或量;和

[0089] ii) 评估受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0090] iii) 如果样品包含低于阈值的量的一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体,并且受试者具有风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,则预测该受试者患有风湿热或PSGN;和

[0091] iv) 向受试者施用治疗有效量的对已建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0092] 在各种实施方案中,通过使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触来确定一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体的存在、不存在或量,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0093] 在各种实施方案中,一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体的高于阈值的量是与受试者的化脓性链球菌近期暴露相关的、或指示受试者近期暴露于化脓性链球菌的抗体滴度。

[0094] 在各种实施方案中,一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体的低于阈值的量是与受试者的化脓性链球菌先前暴露相关的、或指示受试者先前暴露于化脓性链球菌的抗体滴度。

[0095] 在各种实施方案中,阈值是SpnA特异性抗体的量,其将在住院20天内的风湿热或PSGN患者群体中观察到的抗体滴度范围或平均抗体滴度范围,与在住院20天后的风湿热或PSGN患者群体中观察到的抗体滴度范围或平均抗体滴度范围,分开。

[0096] 在一个实施方案中,参考水平、参考阈值或阈值是正常值的上限 (ULN),其是匹配的健康人群的第80个百分位数。

[0097] 一方面,本发明涉及一种使用对化脓性链球菌有效的抗生素治疗患者的方法,其中所述患者正患有或已暴露于化脓性链球菌感染,该方法包括以下步骤:

[0098] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌特异的一种或多种抗体;和

[0099] ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0100] iii) 评估受试者中存在化脓性链球菌或受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0101] iv) 其中存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的检测量高于阈值,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌;

[0102] v) 其中存在一种或多种风湿热或PSGN的其他诊断指标,结合不存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的检测量低于阈值,指示受试者先前暴露于化脓性链球菌;和

[0103] vi) 如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素;如果受试者先前暴露于化脓性链球菌,则施用对已建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0104] 在一个实施方案中,用对化脓性链球菌有效的抗生素治疗患者的方法包括以下步骤:

[0105] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌特异的一种或多种抗体;和

[0106] ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原和一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌DNaseB的抗原和/或一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SLO的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0107] iii) 检测复合物,其中

[0108] a. 化脓性链球菌SpnA特异性复合物的存在,或化脓性链球菌SpnA特异性复合物的检测量高于阈值,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌,和

[0109] b. 存在化脓性链球菌DNaseB特异性复合物和/或化脓性链球菌SLO特异性复合物,且不存在化脓性链球菌SpnA特异性复合物或化脓性链球菌SpnA特异性复合物的检测量低于阈值,指示受试者先前暴露于化脓性链球菌,

[0110] iv) 如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素;如果受试者先前暴露于化脓性链球菌,则施用对已建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0111] 在各种实施方案中,用于近期发作的风湿热或急性PSGN的治疗、或用于急性或当前的化脓性链球菌感染的治疗是,施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素,例如根据治疗方案施用。例如,对急性化脓性链球菌感染有效的剂量方案、或对治疗近期发作的风湿热或急性PSGN有效的剂量方案,包括一种或多种抗生素的10天疗程,如比西林(bicillin)的10天疗程。其他合适的治疗方案对于阅读了本公开的本领域技术人员将是已知的,包括本文公开的某些代表性实例。

[0112] 在各种实施方案中,用于风湿热或PSGN的治疗、或用于已经建立的或随后的化脓性链球菌感染的治疗,是施用对已经建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的抗生素,例如根据治疗方案如预防性治疗方案的施用。例如,对已经建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的剂量方案、或有效治疗风湿热或PSGN的剂量方案,包括每月施用一种或多种抗生素,如每月施用比西林。其他合适的治疗方案对于阅读了本公开的本领域技术人员将是已知的,包括本文公开的某些代表性实例。

[0113] 在一个实例中,用于风湿热或PSGN的治疗、或用于已经建立的或随后的化脓性链球菌感染的治疗,包括卧床休息和/或住院治疗。

[0114] 在一个实例中,施用用于近期发作的风湿热或急性PSGN的治疗包括向受试者施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0115] 在一个实例中,施用用于风湿热或PSGN的治疗包括向受试者施用对已经建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0116] 在一实例中,施用用于风湿热或PSGN的治疗包括使受试者住院和/或医嘱或使受试者卧床休息。

[0117] 一方面,本发明涉及一种预测患有风湿热或PSGN的患者对抗生素治疗的反应性的方法,该方法包括以下步骤:

[0118] i) 确定来自受试者的生物样品中一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体的存在、不存在或量;和

[0119] ii) 评估受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0120] iii) 如果样品包含低于阈值的量的一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体,并且受试者具有风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,则预测该受试者可能对抗生素治疗有反应;和

[0121] iv) 向受试者施用治疗有效量的对已经建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0122] 一方面,本发明涉及一种预测患有风湿热或PSGN的患者对抗生素治疗的反应性的

方法,该方法包括以下步骤:

[0123] i) 确定来自受试者的生物样品中一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体的存在、不存在或量;和

[0124] ii) 任选地评估受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0125] iii) 如果样品包含高于阈值的量的一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体,和任选地如果受试者具有风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,则预测该受试者可能对有效治疗近期发作的风湿热或急性PSGN的抗生素治疗有反应;和

[0126] iv) 向受试者施用治疗有效量的对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0127] 在另一方面,本发明涉及确定用于患有风湿热或PSGN的患者的治疗方案的方法,该方法包括以下步骤:

[0128] i) 确定来自受试者的生物样品中一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体的存在、不存在或量;和

[0129] ii) 评估受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0130] iii) 如果样品包含低于阈值的量的一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体,并且受试者具有风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,则确定该受试者应进行适于治疗风湿热或PSGN的治疗方案;和

[0131] iv) 根据适于治疗风湿热或PSGN的治疗方案来治疗受试者。

[0132] 在一个实施方案中,风湿热或PSGN的治疗是慢性风湿性心脏病的治疗。

[0133] 在一个实施方案中,风湿热或PSGN的治疗包括,向受试者施用治疗有效量的对已经建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的抗生素,例如预防有效量的此类抗生素。

[0134] 在一个实施方案中,适合治疗风湿热或PSGN的治疗方案是每月施用抗生素,如每月施用比西林(苄星青霉素,Benzathine Benzylpenicillin)。

[0135] 在另一方面,本发明涉及确定患有风湿热或PSGN的患者的治疗方案的方法,该方法包括以下步骤:

[0136] i) 确定来自受试者的生物样品中一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体的存在、不存在或量;和

[0137] ii) 任选地评估受试者中风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0138] iii) 如果样品包含高于阈值的量的一种或多种化脓性链球菌SpnA特异性抗体,并且任选地受试者具有风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,则确定受试者应进行适于治疗近期发作的风湿热或急性PSGN的治疗方案;和

[0139] iv) 任选地根据治疗方案向受试者施用治疗有效量的对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0140] 在一个实施方案中,如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则以对急性化脓性链球菌感染有效的剂量率,施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素。

[0141] 在一个实施方案中,如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素,其中施用的剂量率大于向患有已经建立的或随后的化脓性链球菌感染或风湿热或PSGN的受试者施用的剂量率。

[0142] 在一个实施方案中,如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素,并与一种或多种其他治疗剂组合,如抗炎剂例如阿司匹林

(aspirin)、糖皮质激素如强的松(prednisone)、安定药(neuroleptic agents)如氟哌啶醇(haloperidol)、正性肌力药(positive inotropic agent)如地高辛(digoxin),或与一种或多种其他疗法组合,如长期住院、卧床等。

[0143] 在一个实施方案中,在暴露过但非近期暴露过化脓性链球菌的患者中,施用对慢性化脓性链球菌感染有效的抗生素之后,由于施用抗生素带来的不良抗生素反应或后遗症的风险,低于如果施用的抗生素是向患有急性化脓性链球菌感染或近期发作的风湿热或急性PSGN的受试者施用的抗生素时的风险。

[0144] 在一个实施方案中,在暴露过但非近期暴露过化脓性链球菌的患者中,以对建立的或慢性化脓性链球菌感染有效的量施用对化脓性链球菌感染有效的抗生素之后,由于施用抗生素带来的不良抗生素反应或后遗症的风险,低于如果以治疗急性化脓性链球菌感染或近期发作的风湿热或急性PSGN有效的量施用所述抗生素时的风险。

[0145] 在一个实施方案中,如果受试者近期暴露于化脓性链球菌,则施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素包括肠胃外施用该抗生素。

[0146] 在各种实施方案中,对化脓性链球菌有效的抗生素选自青霉素、阿莫西林(Amoxicillin)、奥沙西林(Oxacillin)、红霉素(Erythromycin)、阿奇霉素(Azithromycin)、克拉霉素(Clarithromycin)、头孢菌素(Cephalothin)、头孢西丁(Cefoxitin)、头孢克肟(Cefixime)、头孢呋辛(Cefuroxime)、头孢噻肟(Cefotaxime)、头孢曲松(Ceftriaxone)、万古霉素(Vancomycin)、克林霉素(Clindamycin)、利福平(Rifampicin)、环丙沙星(Ciprofloxacin)、四环素(Tetracycline)、复方新诺明(Cotrimoxazole)和氯霉素(Chloramphenicol)。

[0147] 在各种实施方案中,对化脓性链球菌有效的抗生素选自 β -内酰胺类,如青霉素、阿莫西林(Amoxillin,Amoxicillin)、头孢克肟(Cefixime)、头孢泊肟(Cefpodoxime)、头孢噻肟(Cefotaxime)、头孢曲松(Ceftriaxone)、奥沙西林(Oxacillin);大环内酯类,如红霉素(Erythromycin)、螺旋霉素(Spiramycin)、阿奇霉素(Azithromycin);林可胺类(Lincosamines),如克林霉素(Clindamycin);链阳霉素类(Streptogramins),如普那霉素(Pristinamycin);酮内酯类(Ketolide),如泰利霉素(Telithromycin);Phenicol类,如氯霉素(Chloramphenicol);糖肽类(Glycopeptides),如替考拉宁(Teicoplanin)、万古霉素(Vancomycin);氟喹诺酮类(Fluoroquinolones),如左氧氟沙星(Levofloxacin);和四环素类(Tetracyclines),如四环素。

[0148] 在一个实施方案中,对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素是青霉素,例如,青霉素G,包括青霉素G普鲁卡因(例如,Crysticillin)和苄星青霉素G(例如,Bicillin、Bicillin L-A),青霉素VK(例如,Beepen-VK、Betapen-VK、Robicillin VK、Veetids),红霉素,例如E-Mycin、Ery-Tab、Erythrocin,或磺胺嘧啶(Sulfadiazine),例如Microsulfon。

[0149] 在一个实施方案中,如果患者近期暴露于化脓性链球菌,则施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素包括肠胃外施用青霉素G、红霉素或磺胺嘧啶,例如静脉内或肌内施用青霉素G、红霉素、或磺胺嘧啶。在另一个实施方案中,口服施用代替肠胃外施用。

[0150] 在各种实施方案中,根据剂量方案施用对急性化脓性链球菌感染有效的抗生素。在各种实例中,剂量方案包括施用所述抗生素的负荷剂量(loading dose),例如在急性治疗期。

[0151] 在某些实施方案中,急性治疗期为约5天至约20天,例如,约8天至约15天,或约10天至约12天,包括约10天。

[0152] 在一个实例中,对急性化脓性链球菌感染有效的剂量方案或治疗近期发作的风湿热或急性PSGN有效的剂量方案,包括一种或多种抗生素的10天疗程,如比西林的10天疗程。例如,某些示例性的对急性化脓性链球菌感染有效的剂量方案、或对近期发作的风湿热或急性PSGN有效的剂量方案,包括

[0153] i. 苄星青霉素(比西林):对于成人和30kg以上的儿童,约900mg作为单剂量,通常通过深部IM施用;对于30kg以下的儿童,约450-675mg作为单剂量,或对于20kg以下的患者,600,000IU作为单剂量IM,对于20kg以上的患者,1.2x 10⁶IU作为单剂量IM;全部通常为10天。

[0154] ii. 苯氧甲基青霉素:从125-250mg,每天两次,如果IM不可能,则口服,通常为10天;或10mg/kg多至500mg,每天两次,为期10天;

[0155] iii. 红霉素:10mg/kg至最大500mg,每天两次,为期10天;

[0156] iv. 红霉素琥珀酸乙酯:40mg/kg/天,分2-4次服用,儿童最大剂量为1g/天。

[0157] 在多个实施方案中,根据剂量方案施用对已经建立的或慢性的化脓性链球菌感染有效的抗生素。例如,某些示例性的对已经建立的或随后的化脓性链球菌感染有效的剂量方案、或治疗风湿热或PSGN(包括慢性风湿性心脏病)有效的剂量方案,包括

[0158] i. 苄星青霉素:对于成人和30kg以上的儿童,通常每4周约900mg,通常通过深部IM施用,对于30kg以下的儿童,每4周约450-675mg,对于20kg以下的患者每4周肌肉内600,000IU,对于20kg以上的患者,每4周1.2x 10⁶IU肌内施用;

[0159] ii. 苯氧甲基青霉素:125-250mg每天两次,如果IM不可能,则口服,通常为10天;

[0160] iii. 红霉素:250mg,每天两次;

[0161] iv. 红霉素琥珀酸乙酯:400mg,每天两次。

[0162] 在另一方面,本发明涉及一种用于检测受试者近期暴露于化脓性链球菌的方法,该方法包括:

[0163] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌特异的一种或多种抗体;

[0164] ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在SpnA抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的SpnA抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的SpnA抗原:SpnA抗原特异性抗体复合物;和

[0165] iii) 检测存在或不存在复合物,

[0166] iv) 任选地评估受试者存在化脓性链球菌感染或风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0167] v) 其中存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的量高于阈值,指示受试者近期暴露于化脓性链球菌;

[0168] vi) 其中存在风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,结合不存在化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物或化脓性链球菌SpnA抗原特异性复合物的量低于阈值,指示受试者先前暴露于化脓性链球菌。

[0169] 在另一方面,本发明涉及一种用于在受试者中检测或诊断风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎 (PSGN),包括急性链球菌感染后肾小球肾炎 (APSGN)、或在受试者中检测或诊断发生风湿热或PSGN的增加可能性的方法,该方法包括:

[0170] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌特异的一种或多种抗体;

[0171] ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的SpnA抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的SpnA抗原:SpnA抗原特异性抗体复合物;和

[0172] iii) 检测存在或不存在复合物;

[0173] iv) 评估受试者风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标;

[0174] v) 其中存在风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,结合存在化脓性链球菌SpnA特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA特异性复合物的检测量高于阈值,则指示发生风湿热或APSGN的可能性增加,或指示受试者近期暴露于化脓性链球菌作为受试者中存在风湿热或PSGN的一项指标;

[0175] vi) 其中存在风湿热或PSGN的一项或多项其他诊断指标,结合不存在化脓性链球菌SpnA特异性复合物、或化脓性链球菌SpnA特异性复合物的量低于阈值,指示受试者中的风湿热或PSGN,或指示受试者先前暴露于化脓性链球菌作为受试者中存在风湿热或PSGN的一项指标,如随后化脓性链球菌感染的风险或来自随后化脓性链球菌感染的风险增加。

[0176] 在一个实施方案中,一项或多项其他诊断指标是,存在或不存在对SpnA以外的一种或多种化脓性链球菌抗原特异的抗体。例如,一项或多项其他诊断指标是,存在或不存在化脓性链球菌DNaseB特异的抗体,或化脓性链球菌SLO特异的抗体。

[0177] 本文公开的任何实施方案可以涉及本文阐述的任何方面。为了避免任何混淆,从本文公开的内容显而易见的是,本文公开的任何方面,例如本文所述的任何方法,将可以在某些实施方案中采用一种或多种化脓性链球菌核酸酶A (SpnA) 多肽,如一种或多种截短的SpnA多肽,或一种或多种SpnA片段,如本文所述。例如,在各个实施方案中,来自化脓性链球菌SpnA的一种或多种抗原或一个或多个抗原群组作为一种或多种SpnA多肽存在,如作为一种或多种截短的SpnA多肽或一种或多种SpnA片段存在,如本文所述。

[0178] 类似地,当在本文公开的任何方面中使用时,例如在本文所述的任何方法中使用时,一种或多种化脓性链球菌DNaseB抗原或多肽将在某些实施方案中是一种或多种DNaseB多肽,如一种或多种DnaseB抗原片段,如本文所公开。例如,在各种实施方案中,来自化脓性链球菌DNaseB的一种或多种抗原或一个或多个抗原群组作为一种或多种DNaseB多肽存在,例如作为一种或多种DNaseB片段存在,如本文所述。

[0179] 类似地,当在本文公开的任何方面中使用时,例如在本文所述的任何方法中使用时,一种或多种化脓性链球菌SLO抗原或SLO多肽将在某些实施方案中是一种或多种DNaseB多肽,如一种或多种SLO抗原片段,如本文所公开。例如,在各种实施方案中,来自化脓性链球菌SLO的一种或多种抗原或一个或多个抗原群组作为一种或多种SLO多肽存在,如作为一种或多种SLO片段存在,如本文所述。

[0180] 在一个实施方案中,存在两个或两个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物表

明受试者中存在化脓性链球菌,或表明受试者近期暴露于化脓性链球菌,或表明生物样品含有对两种或多种化脓性链球菌抗原特异的抗体。

[0181] 在一个实施方案中,一种或多种复合物检测的增加是相对于针对每个测试群所建立的抗原的参考水平的增加。

[0182] 在一个实施方案中,一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体是一种或多种血清抗体。

[0183] 在一个实施方案中,一种或多种血清抗体是一种或多种IgG抗体。

[0184] 在一个实施方案中,一种或多种血清抗体是一种或多种IgA抗体或一种或多种IgM抗体。

[0185] 在一个实施方案中,一项或多项其他诊断指标是存在或不存在与风湿热或PSGN相关的一种或多种临床症状。

[0186] 在一个实施方案中,一种或多种临床症状选自迁徙性关节炎(migratory polyarthrititis)、心脏炎(carditis)、血尿(hematuria)、边缘性红斑(erythema marginatum)、皮下结节(subcutaneous nodules)、西登哈姆氏舞蹈病(Sydenham's Chorea)或脓皮病(pyoderma)。

[0187] 在一个实施方案中,一种或多种化脓性链球菌抗原是来自以下蛋白质之一的抗原:

[0188] i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA),

[0189] ii) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB),或

[0190] iii) 链球菌溶血素-O (SLO)。

[0191] 在一个实施方案中,一种或多种化脓性链球菌抗原选自:

[0192] i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA),或

[0193] ii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段,或

[0194] iii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SpnA抗原性片段,或

[0195] iv) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB),或

[0196] v) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段,或

[0197] vi) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的DNaseB抗原性片段,或

[0198] vii) 链球菌溶血素-O (SLO),或

[0199] viii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段,或

[0200] ix) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SLO抗原性片段,或

[0201] x) 上述i)至ix)中两个或更多个的任意组合。

[0202] 在一个实施方案中,使生物样品与以下化脓性链球菌抗原的每个群组接触:

[0203] i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA),或

[0204] ii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段,或

[0205] iii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组

成的SpnA抗原性片段,

[0206] 和

[0207] iv) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB), 或

[0208] v) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段, 或

[0209] vi) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的DNaseB抗原性片段,

[0210] 和

[0211] vii) 链球菌溶血素-0 (SLO), 或

[0212] viii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段, 或

[0213] ix) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SLO抗原性片段。

[0214] 在一个实施方案中, 使生物样品与以下化脓性链球菌抗原的每个群组接触:

[0215] i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA),

[0216] ii) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB), 和

[0217] iii) 链球菌溶血素-0 (SLO)。

[0218] 在一个实施方案中, 使生物样品与以下化脓性链球菌抗原的每个群组接触:

[0219] i) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段;

[0220] ii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段; 和

[0221] iii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段。

[0222] 在一个实施方案中, 两个或两个以上群组的化脓性链球菌抗原存在于组合物中。

[0223] 在一个实施方案中, 一种或多种化脓性链球菌抗原用可检测的标记物标记, 和/或与微粒、珠或可检测的试剂偶联。

[0224] 在一实施方案中, 一个或一个以上群组的化脓性链球菌抗原与珠或微粒共价结合。

[0225] 在一个实施方案中, 每个群组的化脓性链球菌抗原都与珠或微粒共价结合, 任选地, 其中不同群组的珠或微粒均彼此可区分。

[0226] 在一个实施方案中, 珠是聚苯乙烯珠、磁珠、羧化珠、官能化珠, 或其中微粒是聚苯乙烯微粒、磁微粒、羧化微粒或官能化微粒。在各种实例中, 珠适用于多重测定法, 如包含两个或更多个群组的珠或微粒的那些测定法, 其中每个群组与不同的抗原缀合。在多个实例中, 珠或微粒适用于免疫测定法, 如CBA、luminex测定法等。

[0227] 在一个实施方案中, 检测抗原: 抗体复合物包括, 将复合物暴露于带有可检测标记物的特异性结合伴侣, 以及如果生物样品中存在抗原特异性抗体, 则检测来自标记物的信号。

[0228] 在一个实施方案中, 特异性结合伴侣包含抗体或其片段。

[0229] 在一个实施方案中, 特异性结合伴侣是抗IgG抗体、抗IgG-PE或其片段。

[0230] 在一个实施方案中, 使用流式仪器、免疫测定法检测抗原: 抗体复合物, 所述免疫测定法如基于板的免疫测定法、电泳和/或免疫印迹、免疫色谱条、电子生物传感器、共振生

物传感器或微流体装置或传感器。

[0231] 在一个实施方案中,免疫测定法,如基于板的免疫测定法,是ELISA或luminex测定法。

[0232] 在一个实施方案中,在luminex测定法中检测抗原:抗体复合物,例如在本文示例的luminex测定法。

[0233] 在一实施方案中,使用可检测地标记的第二抗体检测一种或多种复合物或一种或多种抗原特异性抗体的存在。

[0234] 在一个实施方案中,可检测地标记的第二抗体是抗IgG-PE。

[0235] 在一实施方案中,化脓性链球菌抗原被可检测地标记。

[0236] 在一实施方案中,可检测标记物是荧光团。

[0237] 在一实施方案中,生物样品获自哺乳动物物种。

[0238] 在一实施方案中,生物样品是体液样品。

[0239] 在一个实施方案中,受试者是人受试者。

[0240] 在另一方面,本发明涉及分离的、纯化的或重组的SpnA多肽,其中所述SpnA多肽相对于野生型SpnA:

[0241] i) N-末端截短;

[0242] ii) C-末端截短;或

[0243] iii) N-末端截短和C-末端截短。

[0244] 在一个实施方案中,SpnA多肽

[0245] i) 是免疫原性的,或

[0246] ii) 与野生型SpnA具有免疫交叉反应性,或

[0247] iii) 被可检测地标记,或

[0248] iv) 与野生型SpnA相比,在室温储存时具有增强的稳定性,或

[0249] v) 包含来自SEQ ID No.8的10或更多个连续的氨基酸,或

[0250] vi) 上述i)至v)中的两个或更多个的任何组合。

[0251] 在一个实施方案中,与野生型SpnA相比,SpnA多肽具有提高的平均Tagg,其中Tagg是50%蛋白质聚集时的温度,例如通过SDS-PAGE分析测定的。例如,SpnA多肽的平均Tagg为至少约50°C,如通过SDS-PAGE分析测定的平均Tagg至少约50°C。

[0252] 在一个实施方案中,与野生型SpnA多肽相比,SpnA多肽在约35°C至约60°C的温度下具有更高的热稳定性程度。

[0253] 在一个实施方案中,多肽具有增强的热稳定性、增强的免疫原性稳定性、或增强的热稳定性和增强的免疫原性稳定性。

[0254] 再次,为了避免疑问,本领域技术人员将理解,本文公开的任何方面,例如本文描述的任何方法,将在某些实施方案中采用一种或多种截短的化脓性链球菌核酸酶A (SpnA) 多肽,如上述一种或多种截短的SpnA多肽,包括本文所述的一种或多种SpnA片段。例如,在多种实施方案中,来自化脓性链球菌SpnA的一种或多种抗原或一个或多个抗原群组作为一种或多种截短的SpnA多肽存在,如作为一种或多种N-末端截短的SpnA多肽、或一种或多种C-末端截短的SpnA多肽、或一种或多种SpnA片段存在,如本文所述。

[0255] 在另一方面,本发明涉及包含如本文所述的分离的、纯化的或重组的SpnA多肽的

组合物。

[0256] 在另一方面,本发明涉及一种组合物,其包含可检测地标记的SpnA多肽,例如本文中所述的重组SpnA多肽。

[0257] 在一个实施方案中,可检测地标记的SpnA为截短的SpnA多肽,如本文所述的一种或多种N-末端截短的SpnA多肽、或一种或多种C-末端截短的SpnA多肽、或一种或多种SpnA片段。

[0258] 在另一方面,本发明涉及包含或已经结合了一种或多种化脓性链球菌抗原或一个或多个化脓性链球菌抗原群组,例如本文所述的一种或多种化脓性链球菌核酸酶A (SpnA)多肽,的珠或微粒。

[0259] 在另一方面,本发明涉及包含本文所述的一个或多个珠或微粒的组合物。

[0260] 在再一方面,本发明涉及试剂盒,所述试剂盒用于检测或诊断受试者中风湿热或PSGN,用于检测受试者中化脓性链球菌感染的存在,或用于检测生物样品中化脓性链球菌抗原特异性抗体的存在,所述试剂盒包含组合物,所述组合物包含至少一种选自以下的化脓性链球菌抗原:

[0261] i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA), 或

[0262] ii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段, 或

[0263] iii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.8的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SpnA抗原性片段, 或

[0264] iv) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB), 或

[0265] v) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段, 或

[0266] vi) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.5的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的DNaseB抗原性片段, 或

[0267] vii) 链球菌溶血素-0 (SLO), 或

[0268] viii) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段, 或

[0269] ix) 包含、基本上由、或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SLO抗原性片段,

[0270] 任选地包含参照抗体对照的至少一种组合物,其中抗体对照包含对试剂盒中存在的化脓性链球菌抗原之一特异的抗体,

[0271] 任选地一种或多种试剂,所述试剂用于构成有助于所述一种或多种抗原与生物样品接触的介质,

[0272] 任选地一种或多种试剂,所述试剂能够检测所述一种或多种抗原与生物样品中存在的一种或多种化脓性链球菌抗原特异性抗体之间形成的复合物,

[0273] 和使用说明书。

[0274] 在一个实施方案中,化脓性链球菌抗原中的至少一种与珠或微粒共价结合。

[0275] 在一个实施方案中,组合物包含以下的群组:

[0276] i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA), 或

[0277] ii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段, 或

[0278] iii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列中的至少10个连续的氨基酸

组成的SpnA抗原性片段。

[0279] 在一个实施方案中,组合物包含以下化脓性链球菌抗原的每个群组:

[0280] i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA),或

[0281] ii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段,或

[0282] iii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列的至少10个连续氨基酸组成的SpnA抗原性片段,

[0283] 和

[0284] iv) 脱氧核糖核酸酶-B (DNaseB);或

[0285] v) 包含、基本上由或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段,或

[0286] vi) 包含、基本上由或由SEQ ID No.5的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的DNaseB抗原性片段,

[0287] 和

[0288] vii) 链球菌溶血素-O (SLO),或

[0289] viii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段,或

[0290] ix) 包含、基本上由或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SLO抗原性片段。

[0291] 在本文提供的方法的各种实施方案中,该方法进一步包括在步骤ii)之前提供本文所述的试剂盒。

[0292] 在本文提供的方法或试剂盒的各种实施方案中,一种或多种化脓性链球菌抗原选自抗链球菌溶血素 (ASO)、抗透明质酸酶 (AHase)、抗链激酶 (ASKase)、抗烟酰胺腺嘌呤二核苷酸酶 (anti-NAD)。

[0293] 在一个实施方案中,方法包括组合物或试剂盒的应用,所述组合物或试剂盒包含两个或更多个群组的珠或微粒,其中每个群组的珠或微粒分别包含不同的化脓性链球菌抗原,并且其中至少一个珠或微粒群组包含以下化脓性链球菌抗原之一的群组:

[0294] i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA),或

[0295] ii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段,或

[0296] iii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SpnA抗原性片段,

[0297] 并且其中珠或微粒适合用于流式仪器、免疫测定如基于板的免疫测定、电泳和/或免疫印迹、免疫色谱条、电子生物传感器、共振生物传感器、或微流体装置或传感器,包括例如ELISA、Luminex或CBA测定。

[0298] 在多个实施方案中,所述应用是在本文所述的任何方法中的应用。例如,所述应用是包括但不限于以下之任一的应用:在受试者中检测化脓性链球菌近期暴露的方法,在受试者中检测或诊断风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎 (PSGN) (包括急性链球菌感染后肾小球肾炎 (APSGN)) 的方法,在受试者中检测或诊断发生风湿热或PSGN的增加可能性的方法,在受试者中检测化脓性链球菌感染存在的方法,在生物样品中检测化脓性链球菌抗原特异性抗体的方法,治疗风湿热或PSGN患者的方法,使用对化脓性链球菌有效的抗生素治疗风湿热或PSGN患者的方法,使用对化脓性链球菌有效的抗生素治疗患者的方法,其中所述患

者正患有或已暴露过化脓性链球菌感染,预测风湿热或PSGN患者对抗生素治疗的反应性的方法,确定用于风湿热或PSGN患者的治疗方案的方法,或在受试者中检测化脓性链球菌的近期暴露的方法。

[0299] 任选地,所述两个或更多个珠或微粒群组中的一个或多个包含以下化脓性链球菌抗原之一的群组:

[0300] i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA), 或

[0301] ii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段, 或

[0302] iii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SpnA抗原性片段, 或

[0303] iv) 脱氧核糖核酸酶B (DNaseB), 或

[0304] v) 包含、基本上由或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段, 或

[0305] vi) 包含、基本上由或由SEQ ID No.5的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的DNaseB抗原性片段, 或

[0306] vii) 链球菌溶血素-0 (SLO), 或

[0307] viii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段, 或

[0308] ix) 包含、基本上由或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SLO抗原性片段。

[0309] 在另一方面,本发明涉及:分离的、纯化的或重组的SpnA多肽,包含或已经结合了一种或多种化脓性链球菌抗原或一个或多个群组的化脓性链球菌抗原(例如,一种或多种化脓性链球菌核酸酶A (SpnA) 多肽)的珠或微粒,包含本文所述分离的、纯化的或重组的SpnA多肽的组合物,包含可检测标记的SpnA的组合物,包含本文所述的一个或多个珠或微粒的组合物,用于在受试者中检测或诊断风湿热或PSGN的试剂盒,用于在受试者中检测化脓性链球菌感染存在的试剂盒,或用于在生物样品中检测化脓性链球菌抗原特异性抗体的试剂盒,用于以下任一项的试剂盒:在受试者中检测化脓性链球菌的近期暴露;在受试者中检测或诊断风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎 (PSGN) (包括急性链球菌感染后肾小球肾炎 (APSGN));在受试者中检测或诊断发生风湿热或PSGN的增加可能性;在受试者中检测化脓性链球菌感染存在;在生物样品中检测化脓性链球菌抗原特异性抗体;治疗风湿热或PSGN患者;使用对化脓性链球菌有效的抗生素治疗风湿热或PSGN患者;使用对化脓性链球菌有效的抗生素治疗患者,其中所述患者正患有或已暴露过化脓性链球菌感染;预测风湿热或PSGN患者对抗生素治疗的反应性;确定用于风湿热或PSGN患者的治疗方案;或在受试者中检测化脓性链球菌的近期暴露。

[0310] 在多个实施方案中,所述多肽、珠或微粒、组合物或试剂盒是或包含选自以下的化脓性链球菌抗原的至少之一:

[0311] i) 化脓性链球菌核酸酶A (SpnA), 或

[0312] ii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成的SpnA抗原性片段, 或

[0313] iii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.8的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SpnA抗原性片段, 或

[0314] iv) 脱氧核糖核酸酶B (DNaseB), 或

- [0315] v) 包含、基本上由或由SEQ ID No.5的氨基酸序列组成的DNaseB抗原性片段,或
- [0316] vi) 包含、基本上由或由SEQ ID No.5的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的DNaseB抗原性片段,或
- [0317] vii) 链球菌溶血素-0 (SLO), 或
- [0318] viii) 包含、基本上由或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列组成的SLO抗原性片段,或
- [0319] ix) 包含、基本上由或由SEQ ID No.1或SEQ ID No.2的氨基酸序列中的至少10个连续氨基酸组成的SLO抗原性片段。
- [0320] 在多个实施方案中,受试者或患者是具有高于阈值的量或滴度的抗化脓性链球菌SpnA抗体的受试者,其中高于所述阈值的所述抗体的量或抗体滴度指示对化脓性链球菌的近期暴露。例如,阈值是正常值的上限(ULN),即匹配的健康群体的第80个百分位数。
- [0321] 在其他实施方案中,受试者或患者是具有低于阈值的量或滴度的抗化脓性链球菌SpnA抗体的受试者,其中低于所述阈值的所述抗体的量或抗体滴度指示对化脓性链球菌的先前暴露。例如,阈值是正常值的上限(ULN),即匹配的健康群体的第80个百分位数。
- [0322] 在另一方面,本发明涉及一种用于检测受试者近期暴露于化脓性链球菌的方法,该方法包括:
- [0323] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌SpnA特异的一种或多种抗体;
- [0324] ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和
- [0325] iii) 检测复合物,其中一种或多种复合物的检测值增加到阈值以上指示受试者近期暴露于化脓性链球菌。
- [0326] 在另一方面,本发明涉及一种用于在受试者中检测或诊断风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎(PSGN),包括急性链球菌感染后肾小球肾炎(APSGN)、或在受试者中发生风湿热或PSGN的增加可能性的方法,该方法包括:
- [0327] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌SpnA特异的一种或多种抗体;
- [0328] ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和
- [0329] iii) 检测复合物,其中一种或多种复合物的检测值增加到阈值以上指示发生风湿热或APSGN的可能性增加,或指示受试者近期暴露于化脓性链球菌作为受试者中存在风湿热或PSGN的一项指标;
- [0330] iv) 评估受试者的风湿热或PSGN的一项或多项诊断指标;
- [0331] v) 其中一种或多种复合物的检测增加到高于阈值,结合风湿热或APSGN的一项或多项其他诊断指标,指示受试者中的风湿热或APSGN。

[0332] 在一个实施方案中,一项或多项诊断指标是存在或不存在与风湿热或PSGN相关的一种或多种临床症状。

[0333] 在一个实施方案中,一种或多种临床症状选自迁徙性多关节炎、心脏炎、血尿、边缘性红斑、皮下结节、西登哈姆氏舞蹈病或脓皮病。

[0334] 在另一方面,本发明涉及一种用于检测受试者中存在化脓性链球菌感染的方法,该方法包括:

[0335] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌SpnA特异的一种或多种抗体;

[0336] ii) 使生物样品与一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0337] iii) 检测复合物,其中一种或多种复合物的检测增加表明受试者中存在化脓性链球菌或受试者近期暴露于化脓性链球菌。

[0338] 在另一方面,本发明涉及一种用于检测生物样品中的化脓性链球菌抗原特异性抗体的方法,其中所述化脓性链球菌抗原特异性抗体特异性结合化脓性链球菌SpnA,所述方法包括:

[0339] i) 提供来自受试者的生物样品,所述生物样品能够或怀疑含有对化脓性链球菌SpnA特异的一种或多种抗体;

[0340] ii) 使生物样品与所述一个或一个以上群组的来自化脓性链球菌SpnA的抗原接触,其中如果生物样品中存在抗原特异性抗体,则所述一个或一个以上群组的化脓性链球菌SpnA抗原能够结合生物样品中存在的抗原特异性抗体以形成一个或一个以上群组的抗原:抗原特异性抗体复合物;和

[0341] iii) 检测复合物,其中一种或多种复合物的检测增加表明生物样品含有对化脓性链球菌抗原特异的抗体。

[0342] 在一实施方案中,链球菌感染后肾小球肾炎是急性链球菌感染后肾小球肾炎(APSGN)。

[0343] 在各种实施方式中,一种或多种复合物的检测增加是一种或多种复合物的检测增加到高于阈值。

[0344] 在一个实施方案中,针对特定群体确定参考水平、参考阈值或阈值(在本文中可互换使用,也称为截止值)。在一个示例中,在给定国家中的近期发作的风湿热(ARF),例如,在NZ中的ARF,使用一组健康且匹配良好的志愿者来确定阈值。然后将由此建立的截止值(或参考水平)应用于NZ中的所有ARF。将理解的是,参考阈值在国家、族裔群体和人群之间可以不同,并且因此在某些实施方案中,不同国家或群体各自确定其自己的参考阈值。在一个实施方案中,参考水平、参考阈值或阈值是正常值的上限(ULN),即,匹配的健康群体的第80个百分位数。

[0345] 在一个实施方案中,用于检测化脓性链球菌抗原的参考阈值是,从住院20天以内的风湿热或PSGN患者群获得的样品中观察到的该抗体的平均滴度。例如,用于本文描述的方法中的化脓性链球菌抗原参考阈值是,使用本文描述的方法在如下风湿热或PSGN患者的

群体获得的样品中观察到的平均抗原特异性抗体的滴度,其中所述群体的患者在人口学上与住院20天以内的该受试者相当。

[0346] 在一个实施方案中,用于检测抗SpnA抗体:SpnA复合物的参考阈值,例如用于确定近期暴露于化脓性链球菌的SpnA参考阈值,是在住院20天以内的风湿热或PSGN患者群中获得的样品中观察到的平均抗SpnA抗体滴度。例如,用于确定近期暴露于化脓性链球菌的SpnA参考阈值是,使用本文描述的方法在如下风湿热或PSGN患者的群体获得的样品中观察到的平均抗SpnA抗体滴度,其中所述群体的患者在人口学上与住院20天以内的该受试者相当。

[0347] 通过以下描述,本发明的其他目的、方面、特征和优点将变得显而易见。然而,应该理解,详细说明和具体示例虽然指示了本发明的优选实施方案,但是仅通过举例说明的方式给出,在本发明的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员而言从其详细描述中将是显而易见的。

附图说明

[0348] 通过以下描述,参照附图,本发明的其他方面将变得显而易见,该描述仅以示例的方式给出,其中:

[0349] 图1给出了散点图,其显示在10个血清样品中,通过针对SLO(图1A)、DNaseB(图1B)和SpnA(图1C)的细胞术微珠阵列法(cytometric bead array)的单重(singleplex)和多重(multiplex)中值荧光值(MFI)之间的相关性。进行线性回归分析,并确定 R^2 如下:SLO=0.999;DNaseB B=0.998;和SpnA=0.998;

[0350] 图2显示了针对三种A组链球菌抗原的纯化IgG的ELISA结果。所述抗体使用亲和色谱法从IVIG纯化,得到对SLO(A)、DNaseB(B)和SpnA(C)具有特异性的IgG。误差棒代表标准偏差;

[0351] 图3给出了散点图,显示通过针对SLO(图A)、DNaseB(图B)和SpnA(图C)的细胞术微珠阵列法测定的血清抗体浓度。显示了每种抗原的ULN值(虚线)。进行了Kruskal-Wallis单向方差分析以确定p值;

[0352] 图4给出了散点图,显示对于SLO(A)、DNaseB(B),市售检测与细胞术微珠阵列法之间的相关性。进行线性回归分析,并确定 R^2 为SLO=0.968和DNaseB B=0.934;

[0353] 图5给出了在FCAP Array软件上拟合五参数逻辑公式的细胞术微珠阵列法的SLO、DNase B和SpnA的标准曲线。将SLO(500ng/ml)、DNase B(500ng/ml)和SpnA(1500ng/ml)特异的纯化IgG稀释两倍,并与抗原偶联的珠孵育;

[0354] 图6描绘了包含氨基酸34-571的重组SLO片段的氨基酸序列(图6A),而去毒SLO类似物的氨基酸序列显示在图6B中。取代的氨基酸突出显示并带有下列划线;

[0355] 图7描述了包含氨基酸43-271的重组DNaseB片段的氨基酸序列;

[0356] 图8给出了包含氨基酸28-854的重组SpnA片段的氨基酸序列;

[0357] 图9给出了三个散点图,比较了单重luminex测定(每个抗原独立地)与多重luminex测定,在多重luminex测定中三种抗原珠等份混合并在单个测定中与测试血清孵育。图9A给出了在单重luminex测定和多重luminex测定中SLO的MFI之间的相关性;图9B给出了在单重luminex测定和多重luminex测定中DNaseB的MFI之间的相关性;图9C给出了在

单重luminex测定和多重luminex测定中SpnA的MFI之间的相关性。如本文实施例二中的描述；

[0358] 图10给出了两个散点图,针对SLO(图10A)和DNaseB(图10B),显示了市售检测与luminex测定法之间的相关性。进行线性回归分析,并且将 R^2 确定为 $SLO=0.933$ 和 $DNaseB\ B=0.942$;

[0359] 图11给出了三幅图,显示通过luminex测定法确定的从患者收集的血清中存在的IgG抗体的水平,其中根据住院天数分开血清。与住院>20天收集的血清相比,住院<20天收集的血清中抗SLO抗体浓度没有观察到显著差异(图11,左图),这两组之间的抗DNaseB抗体浓度也没有观察到显著差异(图11,中间图)。相反,如本文实施例二所述,与住院<20天收集的血清相比,在住院>20天收集的血清中观察到抗SpnA抗体浓度的显著降低(图11,右图)。

[0360] 图12给出了三幅图,显示了通过luminex测定法测定的从患者收集的血清中存在的IgG抗体的水平,其中根据住院天数分开血清。与住院>20天收集的血清相比,在住院<20天收集的血清中没有观察到抗SLO抗体浓度的显著差异(图12,左图),这两组之间的抗DNaseB抗体浓度也没有观察到显著差异(图12,中间图)。相反,如本文实施例三所述,与住院<20天收集的血清相比,在住院>20天收集的血清中观察到抗SpnA抗体浓度的显著降低(图12,右图)。

[0361] 图13给出了两幅图,显示了天然SpnA和本文公开的截短SpnA多肽的热稳定性的分析,如实施例四所述。图13A是储存在最适条件下(0天)和室温5天(5天)的全长SpnA多肽的SDS-PAGE分析的色谱图。图13B是储存在最适条件下(0天)和室温5天(5天)的截短SpnA多肽的SDS-PAGE分析的色谱图。

[0362] 图14给出了一个色谱图和两个图,显示了天然SpnA和本文公开的截短SpnA多肽的热稳定性的分析,如实施例五所述。图14A是储存在各个温度的折叠蛋白的百分比的SDS-PAGE分析色谱图。图14B显示在每个温度下各蛋白质的Tagg(50%蛋白质聚集时的温度)。图14C是每种多肽的平均Tagg值的图,描述了针对截短构建体测定的 $51.0\pm 0.6^{\circ}\text{C}$ 的较高平均Tagg,显著高于针对天然SpnA多肽测定的平均Tagg($47.5\pm 0.9^{\circ}\text{C}$)。

[0363] 发明详述

[0364] 本发明一般涉及用于检测生物样品中GAS特异性抗体存在的方法和组合物。此类抗体的检测可用于鉴定感染后免疫后遗症风险增加的受试者,以及用于鉴定可从特定治疗中受益的受试者,以及本领域技术人员在阅读以下公开内容后将变得显而易见的其他用途。

[0365] 除非上下文清楚地另外要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“包括”、“包含”等应理解为包含性含义,而不是排他性或穷举性含义,也就是说,“包括但不限于”的含义。

[0366] 在某些实施方案中,本发明涉及一种用于辅助诊断风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎(PSGN)或评估受试者中发生风湿热或PSGN倾向的方法,该方法包括在来自受试者的生物样品中确定对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体的存在或量,其中相对于对照中所述抗体的水平,生物样品中所述抗体的水平升高指示风湿热或PSGN或指示发生风湿热或PSGN的倾向增加。

[0367] 在其他实施方案中,本发明涉及确定受试者中风湿热或PSGN的治疗功效的方法,该方法包括在治疗之前或治疗过程中从受试者获得的一个或多个生物样品中确定对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体的存在或量,其中随着时间在获自受试者的样品中对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体水平的降低指示该治疗是有效的。

[0368] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种选择用于风湿热或PSGN治疗的受试者的方法,该方法包括:(a) 确定从受试者获得的生物样品中对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体的存在或量;(b) 比较生物样品中所述抗体的水平与对照中所述抗体的水平;和(c) 当生物样品中所述抗体的水平高于对照中所述抗体的水平时,选择受试者用于治疗。

[0369] 本发明部分地依赖于抗体对抗原成分的亲和力——抗体特异性识别并结合抗原或表位的能力,以及对这种特异性识别和结合的确定的。换句话说,本发明部分地依赖于对抗体识别并结合特定表位时形成的复合物的检测和鉴定。

[0370] 术语“亲和力”是指单个表位与结合分子的互补决定区(CDR)的结合强度的量度,在本发明的上下文中结合分子通常是免疫球蛋白分子。术语“亲和性”是指一群免疫球蛋白与抗原(一个或多个)之间的复合物的整体稳定性,即免疫球蛋白混合物与抗原的功能性结合强度。本领域技术人员将理解,亲和性不仅与群体中的各免疫球蛋白分子与特定表位的亲和力有关,而且与这些免疫球蛋白和抗原的效价有关。例如,二价单克隆抗体与具有高度重复的表位结构的抗原(例如聚合物)之间的相互作用将是一种高亲和性。抗体对抗原的亲和力或亲和性可以使用本领域众所周知的任何合适的方法通过实验确定,包括本文所述的某些方法。用于测量抗体对抗原的亲和力的一般技术包括ELISA、RIA和表面等离子共振。如果在不同条件下(例如盐浓度、pH、缓冲液、温度)测量,则特定抗体:抗原相互作用的测量亲和力可能不同。因此,特别是当需要比较数据时,通常用抗体和抗原的标准化溶液、标准化缓冲液和标准化的测定条件,测量亲和力和其他抗原结合参数(例如KD, IC₅₀)。

[0371] 在本文中可互换使用的“特异性结合”或“特异性识别”通常是指,结合分子例如抗体通过其抗原结合结构域与表位结合,并且结合需要抗原结合结构域和表位之间的某种互补性。因此,与抗体结合随机的无关表位相比,该抗体更容易地通过其抗原结合结构域与某表位结合时,称该抗体“特异性结合”该表位。这样的抗体在本文中可以为所述表位或表位类别“特异的”抗体。本文中使用术语“特异性”来定性某种抗体与某种表位结合的相对亲和力。例如,可以认为抗体“A”对给定的表位具有比抗体“B”更高的特异性,或者说抗体“A”对表位“x”比其对相关表位“y”具有更高的结合特异性。

[0372] 如本文所用,对“确定”的提及包括估计、定量、计算或以其他方式推导存在于特定样品中的参照物质(例如,抗体、抗原或生物标志物)的量。这可以通过测量终点指标来实现,该终点指标可以是例如可检测产物的出现、任何可检测的变化(例如底物水平的变化)、或产物出现或底物消失的速率的任何变化,或测量与抗原、生物标志物、复合物或其他试剂结合的抗体的量,如本文所述。

[0373] 当存在时,术语抗体与抗原的“免疫结合特征”或其他结合特征,以各种语法表述形式,是指抗体的特异性、亲和力、交叉反应性和其他结合特征。

[0374] 如本文所用,术语“免疫原性稳定性”、“免疫稳定性”和语法等同物涵盖一种或多

种免疫原性或免疫特征的维持,如维持产生给定的(包括特异的)免疫应答的能力,如被抗体结合或识别的能力、或引起细胞介导的免疫应答的能力。例如,当在特定抗原、多肽或其他试剂方面使用时,免疫原性稳定性或免疫稳定性包括例如,抗体特异性识别的维持,例如抗原、多肽或其他试剂被特异性抗体结合的能力。应当理解,免疫稳定性也可以指抗体的稳定性,如维持识别和结合表位的能力。

[0375] 如本文所用,术语“优先结合”涵盖这样的结合,例如抗体与一个表位的该结合比与另一表位(如相关的、相似的、同源的或类似的表位)的结合更容易发生。因此,“优先结合”给定表位的抗体将更可能结合该表位而不是结合另一表位,即使是在这种抗体可能与另一表位表现出某些交叉反应的情况下。

[0376] 例如,如果抗体以小于对第二表位的抗体 K_D 的解离常数(K_D)结合第一表位,则可以认为抗体优先结合第一表位。在一个实施方案中,如果抗体以比对第二表位的抗体 K_D 小至少一个数量级的亲和力结合第一表位,则可以认为抗体优先结合第一抗原。在另一个实施方案中,如果抗体以比对第二表位的抗体 K_D 小至少两个数量级的亲和力结合第一表位,则可以认为抗体优先结合第一表位。

[0377] 在另一个例子中,如果抗体以小于对第二表位的抗体 k_{on} 的结合速率常数($on\ rate, (k_{on})$)结合第一表位,则可以认为抗体优先结合第一表位。在一个实施方案中,如果抗体以比对第二表位的抗体 k_{on} 大至少一个数量级的 k_{on} 结合第一表位,则可以认为抗体优先结合第一表位。在另一个实施方案中,如果抗体以比对第二表位的抗体 k_{on} 大至少两个数量级的 k_{on} 结合第一表位,则可以认为抗体优先结合第一表位。

[0378] 在其他实例中,如果抗体以小于对第二表位的抗体 k_{off} 的解离速率常数($off\ rate (k_{off})$)结合第一表位,则可以认为抗体优先结合第一表位。在一个实施方案中,如果抗体以比对第二表位的抗体 k_{off} 小至少一个数量级的 k_{off} 结合第一表位,则可以认为抗体优先结合第一表位。在另一个实施方案中,如果抗体以比对第二表位的抗体 k_{off} 小至少两个数量级的 k_{off} 结合第一表位,则可以认为抗体优先结合第一表位。

[0379] 在可用于本文的某些方法中,通常通过评估一种抗体抑制一种或多种其他抗体与表位结合的能力来评估两种或更多种抗体的竞争性结合。在某些实施方案中,如果抗体优先结合某表位使得在某种程度上阻断参照抗体与该表位的结合,则该抗体被认为竞争性抑制参照抗体与给定表位的结合。竞争性抑制可以通过本领域已知的任何方法确定,例如竞争ELISA测定法。通常,可以说抗体至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%竞争性抑制参照抗体与给定表位的结合。

[0380] 如本文所述的抗体或其抗原结合片段、其变体或衍生物也可以根据其交叉反应性来描述或限定。如本文所用,术语“交叉反应性”是指对一种抗原特异的抗体识别并结合第二抗原的能力。通常,将抗体交叉反应性的观察结果作为支持这种交叉反应性的两种(或更多种)不同抗原性物质之间相关性的量度。因此,如果抗体与诱导其形成的表位以外的表位结合,则该抗体具有交叉反应性。

[0381] 应当理解,在某些情况下,表位也可以被称为或描述为交叉反应的,由此两个或更多个不同的表位可以被一个特定抗体识别和/或结合。交叉反应性表位通常包含许多与诱导或起始表位相同的互补结构特征。在某些情况下,交叉反应性表位可以以比起始表位更大的亲和力被结合。

[0382] 应当理解,出于诊断目的,通常优选具有低或无交叉反应性的抗体和抗原。

[0383] 如本文所用,术语“多肽”旨在涵盖单数个“多肽”以及复数个“多肽”,并且是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)组成的分子。术语“多肽”是指具有两个或多个氨基酸的任何一条或多条链,并不指该产物的特定长度。因此,“多肽”的定义中包括肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指代两个或更多个氨基酸的一条或多条链的任何其他术语,术语“多肽”可以代替这些术语中的任何术语或与这些术语中的任何术语互换使用。

[0384] 术语“多肽”还旨在指多肽的表达后修饰的产物,包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、或非天然存在的氨基酸的修饰。多肽可以源自天然生物来源或通过重组技术产生,但不一定从指定的核酸序列翻译而来。它可以以任何方式产生,包括通过化学合成。

[0385] 本发明多肽的大小可以为约3或更多、5或更多、10或更多、20或更多、25或更多、50或更多、75或更多、100或更多、200或更多、500或更多、1,000或更多、或2,000或更多个氨基酸。多肽可以具有限定的三维结构,尽管它们不是一定具有这种结构。术语糖蛋白是指与至少一个碳水化合物部分偶联的蛋白质,所述至少一个碳水化合物部分通过氨基酸残基例如丝氨酸残基或天冬酰胺残基的含氧或含氮侧链与该蛋白质连接。

[0386] “分离的”多肽或其片段、变体或衍生物是指不在其天然环境中的多肽。不要求特定的纯化水平。例如,可以从其自然或天然环境中去除分离的多肽。用于本发明的目的,在宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质被认为是分离的,并且已经通过任何合适的技术分离、分级或部分或基本上纯化的天然或重组多肽也被认为是分离的。

[0387] 本发明的多肽还包括上述多肽的片段、衍生物、类似物或变体,及其任何组合。当提及本发明的抗体或抗体多肽时,术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”包括保留相应天然结合分子、抗体或多肽的至少一些抗原结合特性的任何多肽。本发明多肽的片段包括蛋白水解片段以及缺失片段。多肽的变体包括如上所述的片段,以及由于氨基酸取代、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。变体可以天然存在或非天然存在。可以使用本领域已知的诱变技术产生非天然存在的变体。变体多肽可包含保守或非保守氨基酸取代、缺失或添加。变体多肽在本文中也可以称为“多肽类似物”。多肽的衍生物在本文中被认为是已被改变以表现出天然多肽上未发现的其他特征的多肽。实例包括融合蛋白或功能修饰的多肽,如PEG化多肽、与珠连接的多肽、和与一种或多种其他试剂或化合物共价连接的多肽。在一个实施方案中,多肽的“衍生物”是指具有通过功能性侧链基团反应化学衍生的一个或多个残基的主题多肽。“衍生物”还包括含有二十种标准氨基酸的天然存在的氨基酸衍生物的那些肽。例如,可以用4-羟基脯氨酸取代脯氨酸;可以用5-羟基赖氨酸取代赖氨酸;可以用3-甲基组氨酸取代组氨酸;可以用高丝氨酸取代丝氨酸;可以用鸟氨酸取代赖氨酸。

[0388] 在一个实施方案中,特异性鉴定的多肽的类似物可以,例如在10个或更多个连续氨基酸的序列上,与该指定多肽序列(如图中所示的氨基酸序列或其片段)具有约70%的序列同一性。即,各多肽的70%残基是相同的。在另一个实施方案中,特异性鉴定的多肽的类似物将具有大于75%的同一性。在另一个实施方案中,特异性鉴定的多肽的类似物将具有大于80%的同一性。在另一个实施方案中,特异性鉴定的多肽的类似物将具有大于85%的同一性。在另一个实施方案中,特异性鉴定的多肽的类似物将具有大于90%的同一性。在另

一个实施方案中,特异性鉴定的多肽的类似物将具有大于95%的同一性。在另一个实施方案中,特异性鉴定的多肽的类似物将具有大于99%的同一性。在另一个实施方案中,相对于指定多肽的序列,本发明多肽的类似物将具有少于约20个氨基酸残基的取代、修饰或缺失,例如少于10个。

[0389] 在另一个实施方案中,多肽将具有大于70%的同源性。在另一个实施方案中,多肽将具有大于75%的同源性。在另一个实施方案中,多肽将具有大于80%的同源性。在另一个实施方案中,多肽将具有大于85%的同源性。在另一个实施方案中,多肽将具有大于90%的同源性。在另一个实施方案中,多肽将具有大于95%的同源性。在另一个实施方案中,多肽将具有大于99%的同源性。在另一个实施方案中,本发明多肽的衍生物和类似物将具有少于约20个氨基酸残基的取代、修饰或缺失,更优选地少于10个。优选的取代是本领域已知的保守取代,即取代的残基共有物理或化学性质,如疏水性、大小、电荷或官能团。

[0390] 还考虑在指定数量的连续氨基酸残基上具有指定同一性程度的多肽的类似物。例如,在一个实施方案中,指定多肽的类似物在参照/指定序列的10个或更多个连续氨基酸上具有大于90%的氨基酸序列同一性。在另一个实施方案中,指定多肽的类似物在参照/指定序列的20个或更多个连续氨基酸上具有大于90%的氨基酸序列同一性。

[0391] 术语“多核苷酸”旨在涵盖单数个核酸以及复数个核酸,并且是指分离的核酸分子或构建体,包括例如信使RNA (mRNA) 或质粒DNA (pDNA)。多核苷酸可以包含常规的磷酸二酯键或非常规的键(例如,酰胺键,如在肽核酸(PNA)中存在的)。术语“核酸”是指存在于多核苷酸中的任何一个或多个核酸片段,例如DNA或RNA片段。“分离的”核酸或多核苷酸是指已从其天然环境中取出的核酸分子、DNA或RNA。例如,出于本公开的目的,认为包含在载体中的编码抗体或抗原的重组多核苷酸是分离的。分离的多核苷酸的其他实例包括保持在异源宿主细胞中的重组多核苷酸或在溶液中的(部分或基本上)纯化的多核苷酸。分离的RNA分子包括本文所述的多核苷酸的体内或体外RNA转录本。本文所述的分离的多核苷酸或核酸还包括合成产生的此类分子。另外,多核苷酸或核酸可以是或可以包括调节元件,如启动子、核糖体结合位点或转录终止子。

[0392] 如本文所用,术语“样品”是指获自受试者或患者的任何生物材料,但应当理解,在本文所述的大多数实施方案(例如方法)中,将优选其中能够存在一种或多种抗体的样品。在一个实施方案中,样品可以包含血液、血浆、血清、脑脊髓液(“CSF”)或尿液。例如,样品可包含全血、血浆、从血液样品中富集的B细胞、或培养的细胞(例如,来自受试者的B细胞)。样品还可以包括活检或组织样品,包括粘膜或神经组织。在其他实施方案中,样品可包含全细胞和/或细胞的裂解物。收集和/或制备样品的方法是本领域众所周知的。

[0393] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指需要诊断、预后、预防或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者,例如人类患者。

[0394] 如本文所用,术语“治疗”是指治疗性处理和预防性或防止性措施,其中目的是防止或减缓(减轻)不希望的生理变化或病症,如风湿热或APSGN的发生或进展。有益或期望的临床结果包括但不限于,症状缓解、疾病程度减轻、疾病状态稳定(即不恶化)、疾病进展延迟或减慢、疾病状态改善或减轻、病原体清除、和缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的。与未接受治疗的预期生存期相比,“治疗”还可以意味着延长的生存期。需要治疗的那些受试者包括已经患有病症或疾患的那些受试者以及易于患病症或疾患

的那些受试者或待预防病症或疾患表现的那些受试者。

[0395] 在某些实施方案中,本文所述的抗原用于定量或定性检测样品中化脓性链球菌特异性抗体。这可以通过提供目视可检测信号的技术来实现,所述信号可以是荧光(免疫荧光)、酶促反应的生色产物、沉淀的产生、化学发光或生物发光中的任何一种。某些实施方案将荧光或有色标记的抗体与光学显微镜、流式细胞术或荧光检测结合使用。可用于检测抗体的其他技术和标记物包括但不限于胶体金、放射性标签、GFP(绿色荧光蛋白)等,亲和素/链霉亲和素-生物素、磁珠、以及物理系统,例如纳米技术体系,对实际结合敏感。

[0396] 抗原、抗体或其片段可用于组织学染色,如免疫组织化学、免疫荧光或免疫电子显微镜,以及用于抗体或蛋白质的原位检测。普通技术人员将容易地认识到,可以修改多种组织学方法中的任何一种,如染色程序,以实现这种原位检测。

[0397] 可以用于标记和直接检测本文描述的抗体或抗原的方法之一是,将抗体或抗原连接至酶并用于酶免疫测定法(EIA)。在之后暴露于合适的底物时,该酶将与底物反应产生可被检测的化学部分,例如可通过分光光度法、荧光测定法或通过目视手段检测。可用于可检测地标记抗体或抗原的酶包括但不限于苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ 5-甾族异构酶、酵母醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、葡萄糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。可以通过比色法完成检测,该比色法采用酶的生色底物。在某些实施方案中,通过目测比较底物与类似制备的标准物的酶促反应程度来完成检测,该程序适用于可溶性有色产物和非可溶性有色产物,包括例如在硝酸纤维素或塑料支持物、浸条(dip strip)等上实施的那些)。

[0398] 在一些实施方案中,在合适的情况下,通过使用结合抗原:抗体复合物的第二抗体或其他结合伴侣(可与抗原反应或更通常与抗体反应),可进一步辅助检测抗体与抗原的反应。通常,该第二抗体或配体被可检测地标记,其中对第二抗体的检测允许推断抗原:抗体复合物的存在。

[0399] 特异性结合伴侣(如第二抗体)常与样品来源的物种的免疫球蛋白的保守区域是反应性的。在本文特别考虑的实例中,第二抗体或特异性结合伴侣对人免疫球蛋白如IgG具有亲和力。第二抗体的选择将至少部分取决于样品的来源,并因此取决于预期存在于其中的抗体的性质。

[0400] 许多众所周知的检测方法适用于实践本文所述的方法。例如,酶免疫测定法,如免疫荧光测定法(IFA)、光度测定法、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、ELISPOT测定法和免疫印迹法,可以容易地适应性修改用于完成特异性抗体的检测。

[0401] 也可以使用其他检测系统包括基于使用源自金黄色葡萄球菌Cowan菌株I的蛋白A、源自C组链球菌(例如,菌株26RP66)的蛋白G的那些系统,或采用生物素-亲和素结合反应的系统。

[0402] 其中可以使用本文所述的抗原和抗体的其他免疫酶学检测方法是蛋白质印迹法和斑点印迹法,其中试剂通过电泳分离并转移到硝酸纤维素膜或其他合适的支持物上。然后使待测样品(例如血浆)与膜接触,并通过已经描述的方法检测所形成的免疫复合物的存在。在该方法的一种变型中,将纯化的抗原按线或点施加到膜上,并允许其与样品中存在的任何抗体结合,使用本文所述的技术检测形成的免疫复合物。

[0403] 也可以通过聚集,检测抗体:抗原复合物的存在。在这种方法的一个代表性实例中,本文所述的抗原用于包被例如乳胶颗粒以形成均一的悬浮液。当与样品(例如含有能够识别抗原的特异性抗体的血清)混合时,引起胶乳颗粒聚集,并且可以目视检测大聚集体的存在。

[0404] 使用通过本领域已知的方法以可检测部分标记的抗体或配体,可以促进检测抗体与抗原的反应。这种可检测的部分允许沉淀物或颜色变化的目视检测、通过显微镜进行的目视检测、或者通过光谱法或放射测量法等进行的自动检测。可检测部分的实例包括荧光素和若丹明(用于荧光显微镜检查)、辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶(用于光学显微镜或电子显微镜和生化检测,以及用于通过颜色变化进行的生化检测)、和生物素-链霉亲和素(用于光学或电子显微镜)。所使用的检测方法和部分可以按照本领域公知的应用于此类选择的标准条件,从上面的列表或其他合适的例子中选择。

[0405] 尽管现在比以前通常不太看好依赖于放射性同位素的方法,但是可以使用放射性检测方法,其通过放射性标记抗原、抗体或抗体片段以及使用放射免疫测定法(RIA)来完成检测。放射性同位素可通过如使用 γ/β 计数器或闪烁计数器的方法或通过放射自显影来检测。

[0406] 更常用的方法用非放射性的可检测标记物(如荧光化合物)标记待检测的抗体或抗原。当荧光标记的抗体或抗原暴露于适当波长的光时,由于荧光的原因,可以检测到抗体或抗原的存在。最常用的荧光标记的化合物是异硫氰酸荧光素、若丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛和荧光胺。

[0407] 也可以使用发射荧光的金属如 ^{152}E 或镧系其他金属可检测地标记抗体或抗原。可以使用如二亚乙基三胺五乙酸(ETPA)的金属螯合基团将这些金属连接至抗体或抗原。

[0408] 抗体或抗原也可通过与化学发光化合物偶联而被可检测地标记。然后通过检测在化学反应过程中产生的发光的存在来确定化学发光标记的抗体或抗原的存在。特别有用的化学发光标记化合物的实例是鲁米诺、异鲁米诺、theromatic吡啶酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯。

[0409] 同样,生物发光化合物可用于标记抗体或抗原。生物发光通常在生物系统中通过催化性蛋白的活性而发生,这增加了化学发光反应的效率。通过检测发光的存在来确定给定的生物发光蛋白的存在。用于标记目的的重要生物发光化合物是萤光素、萤光素酶和水母发光蛋白。

[0410] 例如,在以下专利中公开了用于检测生物样品中的抗体的方法的特定实例,包括采用浸条或其他固定化的测定装置的方法:美国专利号5,965,356(单纯疱疹病毒类特异性血清测定法);美国专利号6,114,179(用于检测抗原和/或抗体的方法和测试试剂盒);美国专利号6,077,681(通过检测抗体诊断运动神经病);美国专利号6,057,097(用于包括自身免疫反应的病理和/或用于炎症疾病的标记物);和美国专利号5,552,285(针对氧化的DNA碱基的抗体的免疫测定方法、组合物和试剂盒)。

[0411] 举例来说,微球测定法(也称为流式珠测定法)也可以用于检测生物流体(如来自受试者的血液或血清样品)中对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体。以Luminex Corporation开发的系统和Becton Dickinson开发的其他系统为代表的这项技术,使得能够处理非常少量的样品(通常为20 μL),以检测一种或几种分析物。该测定法的原

理基于将捕获抗体与含有特定量的红色染料和红外染料的微球偶联。将这些微球与样品、偶联藻红蛋白(PE)的第二检测抗体孵育后,用流式细胞仪分析珠。一种激光检测珠,另一种激光检测结合到这些珠上的PE的强度。这项技术已被用于多重测定中检测许多生物学上重要的分子或试剂,包括细胞因子、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的血清分型、人绒毛膜促性腺激素(hCG)和甲胎蛋白(AFP)的同时测量、针对弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、风疹病毒、巨细胞病毒、和单纯疱疹病毒1型和2型的血清IgG的同时检测(参加Luminex Corp.提供的技术说明,例如在其网站上或通过其产品目录)。

[0412] 在某些实施方案中,存在于生物样品中的对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体与偶联至微球的抗原性蛋白结合。在一些实施方案中,第二检测抗体(其一个实例在本文中也称为特异性结合伴侣)是单克隆抗体,例如抗人IgG的单克隆抗体。在其他实施方案中,第二检测抗体是多克隆抗体,例如针对人IgG的多克隆抗体。可以将在此类方法中使用的第二抗体偶联至例如生物素,或以其他方式可检测地标记。

[0413] 适用于本文预期用途的免疫学技术包括依赖于抗体:抗原复合物形成的免疫学方法,例如使用标记的抗体或抗体片段,包括标记的第二抗体。示例性方法包括ELISA方法,例如间接ELISA、竞争性ELISA、夹心ELISA,以及其他基于免疫学的方法、试剂或装置,如免疫色谱条、荧光免疫微粒、蛋白质印迹、基于电化学反应的生物传感器(所述电化学反应通过与抗体连接的酶催化)、包被有抗体的磁性颗粒、表面等离振子体共振、以及其他检测结合到抗体的分析物的技术。存在用于实现这些方法的各种方法和技术,并且对于本领域技术人员而言将是众所周知的,可以包括微流体技术、自动化和/或高通量技术。

[0414] 合适的测定法可以是定量技术,如ELISA,或者是定性的,如快速免疫色谱测定法、免疫印迹、浸条等。应当理解,在某些情况下可以定性地采用通常用作定量测定的测定法。

[0415] 定性的、可选的快速的测定法,如免疫色谱测定法,特别是那些采用免疫色谱条的测定法,特别适用于使用更复杂的测定技术不可行或不实际的地区(例如发展中国家),或作为一线诊断来识别可能受益于进一步评估的受试者。

[0416] 例如,在检测对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体的存在或量是否大于或小于某一量的定性测定法的一个实施方案中,使用定性ELISA测定法,在该定性ELISA测定法中使用本文描述的两种或更多种抗原。该程序可以用本文所述的试剂盒进行,如试剂盒可以含有组合物,如缓冲液或样品制备溶液(其包含一种或多种化脓性链球菌抗原),任选地阴性对照(其中不存在对化脓性链球菌抗原特异的抗体),任选地阳性对照(其中存在对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体),以及ELISA的成分(如反应容器,例如多孔板),和用于检测对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体与该一种或多种化脓性链球菌抗原之间形成的复合物的一种或多种第二检测抗体,以及任选地用于固定复合物和/或用于测定显色的一种或多种成分。在一个实施方案中,首先,在将一种或多种化脓性链球菌抗原固定在容器上的条件下,将包含该一种或多种化脓性链球菌抗原的组合物引入反应容器,如ELISA板。在另一个实施方案中,提供的反应容器如ELISA板具有已经固定在其上的一种或多种化脓性链球菌抗原。在另一个尤其考虑的实例中,一种或多种第二检测抗体可以已经固定在反应容器上或反应容器中,或者可以在组合物中提供并在可以将该检测抗体固定于反应容器上的条件下将其引入反应容器中。本领域技术人员将理解,存在各种替代方法,其中依赖于分析物的复合物的形成、捕获和标记可以提供可

检测信号,并且这些方法通常取决于抗体:抗原复合物的固定来进行检测。

[0417] 在定性测定法的另一个实施方案中,使用免疫色谱条,在该测定法中确定对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体的存在,或在该测定法中确定所述抗体的量是否大于或小于某一阈值。在一个实例中,该试条包含本文所述的两种或更多种抗原,并且通常与一种或多种组合物一起提供,如缓冲溶液或样品制备溶液,任选地阴性对照(其中不存在对化脓性链球菌抗原特异的抗体),任选地阳性对照(其中存在对一种或多种抗原特异的一种或多种抗体),以及用于检测对一种或多种化脓性链球菌抗原特异的一种或多种抗体与一种或多种化脓性链球菌抗原之间形成的复合物的特异性结合伴侣,以及任选地用于测定显色的一种或多种成分。在一个实例中,提供分开的其中不存在化脓性链球菌抗原的免疫色谱条,以用作阴性对照。在其他实施方案中,一个或多个免疫色谱条具有至少两个不同的区域,其中一个区域包含一种或多种化脓性链球菌抗原,任选地其中另一个区域不包含化脓性链球菌抗原,并且任选地另一个区域包含能够被第二检测抗体或特异性结合伴侣结合的一种或多种固定的抗体或其他试剂,以作为阳性对照区域。

[0418] 在一个特定的实施方案中,通过捕获ELISA进行检测。捕获ELISA(也称为“夹心”ELISA)是一种敏感的测定法,用于定量非常少量(从皮克到微克)的物质(如激素、细胞信号传导化学物质、感染性疾病抗原和细胞因子,以及在本公开的上下文中,抗体)。当要分析的物质可能太稀而无法与支持材料如聚苯乙烯微量滴定板结合(如细胞培养上清液中的蛋白质)时,或者与塑料的结合性不好(如小的有机分子)时,通常考虑这种类型的ELISA。捕获试剂(例如捕获抗原)、样品、对照和检测抗体的最佳稀释度以及孵育时间通常是凭经验确定的,可能需要大量滴定。理想地,可以使用酶标记的检测抗体或检测抗原。但是,如果检测抗体或抗原未标记,则第二抗体不应与包被抗体或抗原发生交叉反应。

[0419] 如在本文中本说明书中所使用的,术语“可检测的部分”、“可检测的标记”和语法上的等同物是指,可以直接或间接监控其存在、不存在或水平的任何原子、分子或其部分、试剂或物质。一个实例包括放射性同位素。其他实例包括(i)可以催化颜色或发光(发光)反应的酶和(ii)荧光团。可检测部分的检测可以是直接的,条件是该可检测部分本身是可检测的,例如在荧光团的情况下。或者,可检测部分的检测可以是间接的。在后一种情况下,通常使用与可检测部分反应的第二部分,所述第二部分本身是直接检测的。可检测部分可以是抗体或标记抗原固有的,例如通过共价键连接的。例如,抗体的恒定区可以用作间接可检测部分,其可特异性结合具有直接可检测部分的第二抗体。

[0420] 因此,第二抗体是在本文所述方法中用于检测抗体的特别合适的手段。该第二抗体本身可以与可检测部分缀合。可以用于可检测地标记根据本发明的抗体的一种方法是,将其连接至酶。在以后暴露于合适的底物时,该酶将继而与底物反应以产生化学部分,该化学部分可以通过例如分光光度法、荧光法或目视手段被检测。可用于可检测地标记抗体的酶包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -5类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。

[0421] 可以通过比色法完成检测,该比色法使用酶的生色底物。还可以通过目视比较底物与类似制备的标准品的酶促反应程度来完成检测。

[0422] 在采用与试剂(例如,抗原或抗体(如适用))结合的固体支持物的实施方案(例如方法、测定法和试剂盒的实施方案)中,该固体支持物可以为任何不溶于水、不悬浮于水的固体支持物。合适的固体支持物的实例包括例如聚苯乙烯的珠、滤纸、试管、浸条和微量滴定板。结合的试剂可以通过共价键或通过吸附结合到固体支持物上。使用固相支持物的优点是不需要离心步骤进行固相和液相的分离,尽管在特定的实施方案中可以使用离心,例如基于珠的测定法,以促进加工。

[0423] 上述固体支持物可包括聚合物,如聚苯乙烯、琼脂糖、琼脂糖凝胶、纤维素、玻璃珠、和纤维素或其他聚合物的可磁化颗粒。固体支持物可以是大的或小的珠或颗粒、管、板、条的形式或其他形式。

[0424] 作为固体支持物,通常使用试管或微量滴定板,其内壁包被第一抗体或抗原,例如,对待检测化脓性链球菌抗体特异的抗原或其任何片段或衍生物,如本文具体公开的那些。

[0425] 还考虑提供一种试剂盒,该试剂盒包含进行本文所述的一种或多种方法所必需的一种或多种组分。试剂盒通常将包含组合物,所述组合物包含至少一种本文所述的化脓性链球菌抗原,例如组合物包含两种或更多种所述抗原。试剂盒中可以有用地包含用于进行根据本公开的方法的其他组分。例如,试剂盒可包含一种或多种试剂,其用于构成有利于使该一种或多种抗原与生物样品接触的介质。试剂盒还可以包含用于样品收集的装置,例如拭子、移液管或类似的收集工具,以及用于进行使试剂接触的一个或多个反应步骤的装置,如孵育装置(包括置于板、试管、玻璃或塑料表面、孔中或吸收性纸条上的液体或半固体介质),或类似装置。其他试剂盒组分可以包括一种或多种试剂,该试剂使得能够检测一种或多种抗原与生物样品中存在的一种或多种化脓性链球菌抗原特异性抗体之间形成的复合物。

[0426] 在某些实施方案中,本文考虑的方法、测定法和试剂盒可以包括或利用一个或多个样品与其他测定试剂(如一种或多种化脓性链球菌抗原)的接触,其中后者排列在阵列中,以允许例如快速处理多个样品,包括高通量实施。

[0427] 如本文所用,术语“阵列”是指一种或多种识别剂(如两种或更多种化脓性链球菌抗原的组合)的“寻址”空间排列。阵列的每个“地址”是预定的包含一种或多种识别剂的特定空间区域。例如,阵列可以是多个容器(试管)、板、微板中的微孔,每个包含一组抗原。设想各种阵列的实施方式。在一个实施方案中,每个地址都包含相似或相同的识别剂,并且测定多个样品,每个地址一个样品。在另一个实施方案中,每个地址包含不同的识别剂或不同的识别剂组合,并且将单个样品的等分试样引入每个地址。在其他实施方案中,采用这些方法的组合。阵列也可以是任何固体支持物,其不同区域(点、线、列)中容纳已知识别剂,例如,其中不同的识别剂以不同的组合放置在一个或多个不同的位置,或者在不同的位置接触不同的样品。在某些实施方案中,阵列包括内置的适当对照,例如,没有样品的区域、没有抗原的区域、没有二者中任一的区域(例如,仅具有溶剂和试剂)、以及含有结合该一种或多种抗原的合成或分离的抗体(作为阳性对照)的区域。

[0428] 可用于本文的固体支持物,例如用于阵列或试剂盒的固体支持物,通常基本上不溶于液相。本发明的固体支持物不限于特定类型的支持物。事实上,可获得大量支持物,并且其是本领域普通技术人员已知的。因此,有用的固体支持物包括固体和半固体基质,如气

凝胶和水凝胶、树脂、珠、生物芯片(包括包被薄膜的生物芯片)、微流体芯片、硅芯片、多孔板(也称为微量滴定板或微板)、膜、过滤器、导电和非导电金属、玻璃(包括显微镜载玻片)和磁性支持物。有用的固体支持物的更具体的例子包括硅胶、聚合物膜、颗粒、衍生的塑料膜、玻璃珠、棉、塑料珠、氧化铝凝胶、多糖如琼脂糖凝胶、尼龙、乳胶珠、磁珠、顺磁珠、超顺磁珠、淀粉等。

[0429] 抗原

[0430] 应当理解,原则上,在受试者体内产生的抗体所针对的任何化脓性链球菌抗原都可以用于本文所述的方法,特别是本文所述的多重方法。如本文实施例中所示,临床建立的抗原DNaseB和SLO可以与珠交联,用于多重CBA测定法。在某些情况下,并且不希望被任何理论所束缚,申请人已经确立可以有效地稳定某些抗原,例如SpnA,以促进它们包括在本文所述的多重测定法中。在SpnA的情况下,全长多肽的截短改善了免疫学稳定性,特别是当与在本文所述方法的实施方案中使用的固体支持物(在这种情况下为珠)交联或以其他方式结合时。

[0431] 在一个实施方案中,利用两种或更多种化脓性链球菌抗原,特别可以考虑利用三种或更多种化脓性链球菌抗原,例如在单个多重测定中。在一个实例中,每种抗原与珠或其它底物结合,其中每个抗原结合珠群彼此不同。本文实施例中提供了这种多重测定法的一个例子,其中SLO、DNaseB和SpnA各自共价连接至不同的珠群,使得每个抗原标记的珠群均可分别鉴定,由此可以在单个测定中确定对每种抗原特异的抗体的量。

[0432] 在某些实施方案中,例如当与样品接触时,两种或更多种化脓性链球菌抗原在单个组合物(例如,包含任何所需缓冲液或载体、稳定剂等)的单个溶液)中提供,并因此其特别适合于多重实施方式。在一个实例中,例如当与样品接触时,化脓性链球菌SpnA抗原与至少一种其他化脓性链球菌抗原一起提供,例如,SpnA和至少一种其他化脓性链球菌抗原存在于单个组合物中。在一个具体考虑的实例中,例如当与样品接触时,化脓性链球菌SpnA抗原和SLO例如在单个组合物中提供。在另一个具体考虑的实例中,例如当与样品接触时,化脓性链球菌SpnA抗原和DNaseB例如在单个组合物中提供。在另一个特别考虑的实例中,例如当与样品接触时,化脓性链球菌SpnA抗原、DNaseB和SLO例如在单个组合物中提供。

[0433] SLO(AAK33267.1)是一种分泌的、形成孔的细胞溶素。在一个实施方案中,SLO来源于化脓性链球菌M1 GAS(菌株:SF370,血清型:M1,基因座标签:SPy_0167(NCBI:NP_268546.1)。在一个实例中,使用SLO的重组片段,例如包含氨基酸34-571的重组多肽(参见图6A,SEQ ID NO.1)。在一个实例中,重组多肽带有标签,例如以帮助纯化,并且特别考虑了N-末端或C-末端His标签。在另一个实施方案中,使用“去毒”SLO类似物,其中一个或多个确定会贡献毒性的氨基酸被氨基酸取代,产生与野生型SLO发生免疫交叉反应但显示出降低的毒性的多肽(例如,以减少生产、处理或容纳限制或要求)。去毒SLO类似物的一个代表性实例的氨基酸序列在图6B和SEQ ID NO.2中给出。在此去毒SLO的实例中,编码核苷酸序列中的两个点突变导致P427L和W535F取代:在图6A和6B中用下划线标出了取代的氨基酸。

[0434] DNase-B(AAK34710.1)是一种降解DNA的分泌酶。在一个实施方案中,DNaseB衍生自化脓性链球菌M1 GAS(菌株:SF370,血清型:M1,基因座标签:SPy_2043(NCBI:NP_269989.1))。在一个实例中,使用DNaseB的重组片段,例如包含氨基酸43-271的重组多肽(参见图7,SEQ ID NO.5)。在一个实例中,重组多肽带有标签,例如以帮助纯化,并且特别考

虑了N-末端或C-末端His标签。

[0435] SpnA (AAK33693.1) 是细胞壁锚定的酶,也能降解DNA。在一个实施方案中,SpnA源自化脓性链球菌M1 GAS (菌株:SF370,血清型:M1,基因座标签:SPy_0747 (NCBI:NP_268972.1))。在一个实例中,使用SpnA的重组片段,例如包含氨基酸28-854的重组多肽(参见图8,SEQ ID NO.8)。在一个实例中,重组多肽带有标签,例如以帮助纯化,并且特别考虑了N-末端或C-末端His标签。

[0436] 本领域技术人员将认识到,在本文公开的发明的某些实施方案中,包括本文所述的方法、多肽、珠、组合物和试剂盒,特别是与本文所述的多重诊断方法和组合物相关的实施方案,提供了对如下患者的准确而快速的诊断和/或鉴定:需要治疗近期发作的风湿热或急性PSGN、或需要治疗急性化脓性链球菌感染,但不需要长期治疗(包括长期预防性治疗)风湿热、PSGN或持续的化脓性链球菌感染的患者,或只需要持续监测(例如以快速鉴定随后的化脓性链球菌感染)的患者。

[0437] 在各种实施方案中,例如,当使用本文所述的方法将患者鉴定为具有或已经具有近期的化脓性链球菌暴露或近期的化脓性链球菌感染时,该患者将接受适合于治疗近期化脓性链球菌感染的治疗、和正在进行治疗,如预防性治疗以防止随后的化脓性链球菌感染,或减轻风湿热、PSGN、慢性风湿性心脏病的一种或多种症状,或监测疾病状态。在其他实施方案中,当使用本文所述的方法将患者鉴定为具有或已经具有化脓性链球菌的先前暴露或化脓性链球菌的先前感染时,该患者将接受正在进行治疗,如预防性治疗以防止随后的化脓性链球菌感染,或减轻风湿热、PSGN、慢性风湿性心脏病的一种或多种症状,或监测疾病状态。代表性的治疗包括本文中所述的那些。

[0438] 提供以下实施例、序列表和附图以帮助理解本发明,本发明的真实范围在所附权利要求中阐明。应该理解的是,可以在不背离本发明精神的前提下对所提出的方案进行修改。

实施例

[0439] 实施例一

[0440] 该实施例描述了基于珠的多重测定法的开发,以测定生物样品中GAS特异性抗体的存在和量。

[0441] 方法

[0442] 研究受试者

[0443] 在这项研究中,从四种不同来源获得人血清。患有ARF的患者根据新西兰修订的琼斯标准[3]诊断,并在2004-2006年间在奥克兰星际儿童医院住院(n=8)期间募集以及在2012-2015年间在汉密尔顿怀卡托医院住院(n=8)期间募集。从“儿童范围”(Children of Scope, CoS)研究中获得种族匹配的健康儿童(6岁)的血清。最后,从奥克兰大学募集的年龄在20岁或20岁以上的非匹配健康志愿者中获得血清,作为另外的对照组。人口统计资料如表1所示。所有参与者均已提供了书面知情同意书,并获得了四个地点的相应伦理委员会的批准。

[0444] 表1-研究参与者*

	ARF (n = 16)	健康儿童 (n = 13)
性别 (n)		
男性/女性	11/5	7/6
年龄 (岁)		
平均值	10.3	6
范围	6 – 15	6 – 6
种族		
毛利/太平洋	13/3	11/2

[0446] *健康成人组 (n=18) 由年龄大于20岁且无近期咽炎史的成年志愿者组成。这些参与者没有种族数据。

[0447] 抗原准备

[0448] 本研究中使用的重组抗原均以其成熟形式制备,没有N末端信号序列。分子量为64.4kDa (氨基酸34-571, SEQ ID NO.1) 并且有N-末端His₆-标签的SLO购自Fitzgerald Industries International。使用以下引物从化脓性链球菌SF370 (ATCC 700294) 基因组DNA扩增编码DNase B的基因:正向:5' CACCATGCGACAAACACAGGTCTCAAATGATGTTG-3' [SEQ ID NO.3]反向:5' TTTCTGAGTAGGTGTACCG TTATGGTAGTTAATGG-3' [SEQ ID NO.4],使用Topo克隆方法克隆到pET101/D TOPO (Life Technologies)。所得载体编码DNaseB (氨基酸43-271, 本文描述为[SEQ ID NO.5]的氨基酸序列) 以及随后的C-末端His₆-标签,总分子量为29kDa。在补充有氨苄青霉素和0.1%葡萄糖的Lennox肉汤 (LB) 培养基中,在37℃,用1mM IPTG诱导,在大肠杆菌BL21λDE3细胞中表达该蛋白3小时。用含有KasI和XhoI限制性酶切位点(下划线)的引物从化脓性链球菌SF370基因组DNA中扩增SpnA:正向:5' AAAGGCGCCCCGCAAAATT TGACTTATGCCAA-3' [SEQ ID NO.6],反向:5' AAAC TCGAGCTATTTGGAAAATGATAATT GAAGTAACA-3' [SEQ ID NO.7]。将得到的spnA扩增子(编码SpnA氨基酸28-854, [SEQ ID NO.8]) 克隆到pProExHta载体中,该载体编码N末端His₆-标签,并转化到大肠杆菌BL21λDE3细胞中。在含有氨苄青霉素的LB中在18℃用0.3mM IPTG诱导蛋白表达16h。使用标准Ni²⁺-NTA亲和色谱法从大肠杆菌细胞裂解物中纯化rDNaseB和rSpnA。使用重组烟草蚀刻病毒蛋白酶 (rTEV与重组蛋白的比例为1:100) 将His₆标签从rSpnA上切割下来,得到85kDa蛋白。通过SDS-PAGE验证所有抗原的纯度。

[0449] 抗原特异性IgG的纯化

[0450] 从合并的人免疫球蛋白 (静脉内免疫球蛋白, IVIG (**Intragam**[®])) 纯化对SLO、DNaseB和SpnA特异的IgG。通过使用**AminoLink**[®]偶联试剂盒 (Thermo Scientific)、通过其伯胺将抗原与琼脂糖树脂共价偶联,而生成每种GAS抗原的亲和柱。用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (pH 7.4) 将5ml IVIG溶液稀释四倍,然后使其流经树脂以允许结合抗体。用PBS洗涤树脂四次以除去未结合的抗体。用0.2M甘氨酸-HCl缓冲液 (pH 2.5-3.0) 洗脱结合的抗体,并立即用1M Tris缓冲液 (pH 9) 中和。使用Melon旋转柱 (Thermo Scientific) 除去痕量IgA,并使用离心滤器 (Merck Millipore) 浓缩所得的抗原特异性IgG。为了确认洗脱的IgG对于其分离的抗原是特异的,进行了酶联免疫吸附测定 (ELISA)。用5μg/ml的抗原包被板,并在室温 (RT) 下用补充有0.1% Tween-20和5% 脱脂奶粉的PBS (PBST-5% 奶) 封闭1小

时。在室温下添加纯化的IgG 1小时,并使用抗人辣根过氧化物酶 (HRP) 第二抗体 (1:3000; Santa Cruz Biotechnology) 进行结合检测,如之前公开的[4]。

[0451] 细胞术微珠阵列法

[0452] 根据制造商的说明 (Becton, Dickinson and Company), 使用胺基与巯基交联剂 sulfo-SMCC, 将每种抗原偶联至功能性珠。简而言之, 通过添加25mM二硫苏糖醇 (DTT), 制备了带颜色编码的7.5 μ m聚苯乙烯珠用于缀合。通过添加44 μ g/ml sulfo-SMCC溶液修饰靶抗原 (90 μ g), 并使用Bio-Rad旋转柱 (Biorad) 去除未反应的蛋白质。然后将修饰的蛋白质和功能性珠混合, 并在室温下孵育1小时, 然后添加N-乙基马来酰亚胺 (44 μ g/ml), 再孵育15分钟。将洗涤后的缀合珠避光保存在4 $^{\circ}$ C。使抗原与包含不同比例的荧光团 (APCy7和APC) 的功能性珠缀合, 以确保使用流式细胞仪上的两个检测器 (FL3和FL4) 在独特的位置发荧光。如下选择珠的位置以确保抗原之间最大程度地分离: rSL0, 位置E4; rDNaseB, 位置A4; 和rSpnA, 位置A9。

[0453] 一式两份在96孔U型底板中进行细胞术微珠阵列法 (CBA) 实验的孵育。通过在室温下分别将rSL0-、rDNaseB和rSpnA包被的珠与在检测稀释液中以1:10,000稀释的血清样品孵育1小时, 进行单重测定。为了检测血清抗体结合, 在室温以浓度1:100添加R-藻红蛋白缀合的驴抗人IgG Fc γ 特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch), 持续2h。在流式细胞仪 (BD Accuri C6) 上读取每个反应的中值荧光强度 (MFI)。遵循相同的方案进行多重珠测定, 不同之处是在加入以1:10,000稀释的血清样品之前, 将rSL0-、rDNaseB-和rSpnA偶联的珠以相等的比例混合。在多重测定中使用1:30稀释的驴抗人IgG Fc γ 特异性抗体用于检测。

[0454] 通过在一个试管中混合已知起始浓度的SL0-、DnaseB-和SpnA-特异性抗体并进行两倍系列稀释, 为每种抗原创建七点标准曲线。SL0和DNaseB的起始浓度为500ng/ml, 而SpnA的起始浓度为1500ng/ml。将珠与每种稀释的标准液孵育1h, 然后如上所述用驴抗人IgG Fc γ 特异性第二抗体检测。MFI值转换为浓度 (μ g/ml), 并使用流式细胞术分析程序 (FCAP) 阵列软件 (版本3) (BD)、使用五参数逻辑回归方程生成每种抗原的标准曲线。当将研究受试者的血清与每种抗原的七点标准曲线一起进行多重分析时, 使用FCAP Array软件将MFI转换为浓度 (μ g/ml)。每种抗原的检测下限定义为标准曲线上的最低浓度, 其MFI比空白值高3个标准差 (其中空白是珠加上二抗), 如之前公开的[5]。

[0455] 数据分析与统计

[0456] 通过对每个CoS血清样品确定的抗体浓度进行排名, 并在Microsoft Excel (版本15.24) 中确定第80个百分位数, 以计算每种抗原的正常值上限 (ULN)。使用GraphPad Prism (版本7a) 制备统计分析和图形。所有的相关性使用线性回归进行分析。

[0457] 使用商业测定法的ASO和ADB滴度

[0458] ASO和ADB的滴度均在新西兰奥克兰的Labtests Pathology处测定。使用人抗链球菌溶血素-O试剂盒在SPApplus分析仪 (美国加利福尼亚州, The Binding Site) 上通过比浊技术测量ASO滴度 (IU/mL)。通过酶抑制测定法 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, 法国) 测量ADB滴度 (U/mL)。此测定法针对<100U/ml的低滴度提供不精确的数字; 对于落入该范围的样品估计了50U/mL的中间滴度值 (midtiter)。

[0459] 结果

[0460] 珠偶联和多重测定法

[0461] 为了生成用于本研究分析的GAS抗原偶联的珠,在大肠杆菌中重组产生了三种抗原中每一种的高纯化制品。表达没有N-末端信号序列的分泌蛋白(SLO和DNaseB),而SpnA表达为没有N-末端信号序列并在分选酶基序上游在K854截短以改善蛋白质的稳定性。三种蛋白质中的每一种都与功能性CBA珠偶联,该珠在独特位置发荧光:rSLO(E4位置)、rDNaseB(A4位置)和rSpnA(A9位置)。选择这些珠位置以确保在双色荧光图上具有最大的分离度。测试了各种血清稀释度和浓度的抗IgG检测试剂,以确定测定法的线性范围和饱和点。该试错过程鉴定了1:10,000的血清稀释度在所有三种抗原的线性范围中。

[0462] 为了评估是否可以同时测量三种抗原的滴度,将单重测定法的结果与多重测定法进行了比较。进行单重测定,其中将每个珠与来自10个参与者的以1:10,000稀释的血清一起孵育。这10个血清是ARF和对照样品的混合物,选择它们的原因是:之前的ELISA方法已显示,这些参与者对三种抗原的反应性从低到高,从而确保了在CBA测定法中MFI的良好分布(图1)。然后在多重测定法中测试这相同的10个血清,在该多重测定法中将三种抗原珠等份混合,并在单个测定孔中与测试血清一起孵育。如图1所示,多重测定法中的MFI显示出与每种抗原的单重MFI具有极强的相关性(R^2 值:SLO=0.999;DNaseB B=0.998;SpnA=0.998)。这表明珠之间没有干扰或IgG交叉反应,证明了包含三种链球菌抗原的多重测定法的可行性。

[0463] 多重CBA测定法的标准化和精度

[0464] 针对三种抗原中的每种抗原生成标准曲线,以确定结合偶联抗原的珠的抗体的浓度,并使得能够进行测定轮次之间的比较。通过亲和色谱法从IVIG纯化对SLO、DNaseB和SpnA特异的IgG。通过ELISA验证了纯化抗体的特异性。如图2所示,SLO-、DnaseB-和SpnA-特异性抗体仅显示了与其相应抗原的反应性,而与其他两种抗原没有可检测的反应性。纯化的IgG用于为每种抗原生成七点标准曲线。将已知浓度的纯化IgG两倍稀释,其中抗SLO和抗DNase B的起始浓度为500ng/ml,抗SpnA的起始浓度为1500ng/ml。将这些稀释的标准品与偶联抗原的珠以多重形式孵育,并使用五参数逻辑公式拟合标准曲线。示例的标准曲线如图5所示。这些标准曲线是高度可重现的,拟合精度为至少98%,表明亲和纯化的多克隆抗体可用作参考标准品用于这些抗原。

[0465] 使用纯化的抗体标准品,确定CBA测定法中三种抗原的检测下限:抗SLO,1ng/mL;抗DNaseB,0.1ng/mL;和抗SpnA 0.1ng/mL。使用上述单重/多重比较中使用的相同10个血清,评估了该多重测定法的变异系数(CV)。在结合IgG标准曲线的测定中测量了这10个血清的IgG浓度,每种抗原的平均测定内和测定间CV分别<4%和<15%(表2)。这些CV表明多重珠测定法具有良好的精度,并且是可重复的。标准曲线和该测定的测试结果的可重复性意味着,这些试剂可用于检查未来批次的抗原偶联珠的偶联功效和完整性。

[0466] 表2-变异系数

		SLO	DNaseB	SpnA
[0467]	测定内 CV (%)	3.05	3.44	3.24
	测定间 CV (%)	11.17	12.32	12.03

[0468] 测量ARF患者血清中的抗体滴度

[0469] 为评估SpnA抗原和基于珠的技术在临床链球菌血清学中的应用,对所有研究受试者(表1)进行了多重测定。由一位操作人员在1天在一个实验中对所有47名参与者测定SLO、

DNaseB和SpnA特异的IgG浓度。如图3所示,对于三种抗原中的每一种,ARF样品中的平均抗体滴度均显著高于健康儿童和健康成年对照组中的平均滴度。与之前研究所观察到的一致[6],如表3中更大的置信区间所示,相比于健康成年人,健康儿童中ASO和ADB的滴度更高并且表现得更加分散。值得注意的是,健康儿童中SpnA的滴度与健康成年人的相似,并且与健康儿童组(表1)的ASO和ADB滴度相比,置信区间更窄。这支持了之前观察到的健康个体中SpnA的背景滴度低[2]。

[0470] 使用ULN值评估了抗原检测先前GAS暴露以用于ARF诊断的能力。从健康儿童组计算了SL0、DNaseB和SpnA的ULN或第80个百分位数,分别为644、360和170 μ g/ml。与SL0和DNaseB相比,SpnA的较低ULN反映在健康儿童中看到的降低的滴度。然后将这些实验确定的截断值(如图3中的虚线所示)应用于ARF样品,以确定每种抗原的灵敏度。这是基于观察到的滴度是否高于ULN而检测到的真阳性的数。DNaseB是最不灵敏的,在16个ARF样本中只检测到9个(56.25%)。SL0显示出中等灵敏度,16个ARF样品中检测到12个(75%)。SpnA显示出最高的灵敏度,16个ARF样品中检测到14个(87.5%)。

[0471] 表3通过细胞术微珠测定法测定的对SL0、DNaseB和SpnA特异的抗体的浓度(μ g/ml)的统计概述

	抗原	急性风湿热 (n = 16)	健康儿童 (n = 13)	健康成年人 (n = 18)
	链球菌溶血素-O			
[0472]	平均值 (95% CI)	1539 (859.9-2218.0)	559 (115.2-1003.0)	173 (89.6-256.2)
	中值 (95% CI)	1225 (601.4-1948.0)	326 (123.7-757.9)	123 (53.6-201.4)
	DNaseB			
	平均值(95% CI)	718.5 (387.4-1050)	180.9 (56.2-305.5)	41.7 (24.7-58.7)
	中值(95% CI)	439.5 (240.9-1071)	89.01 (0-383.7)	29.38 (22.8-49.6)
	SpnA			
	平均值(95% CI)	1029 (304.9-1752)	119.8 (36.7-202.9)	52.2 (1.3-103.1)
	中值(95% CI)	422.2 (229.1-1156)	76.01 (0-177.3)	7.4 (0-49.7)

[0473] 与现有血清学测试的比较

[0474] 为了比较多重CBA测定法与现有的可商购方法,对从20名参与者(可获得足够体积血清)获得的血清,在商业实验室中进行了ASO和ADB测试。使用广泛使用的比浊技术测量ASO,并获得国际单位的确切值(IU/mL)。相反,使用提供滴度范围(100、200、300、400、600、800、1200和~1600)的酶抑制测定法,测量ADB滴度。如图4A所示,在CBA测定法和市售的浊度技术中测定的ASO IgG浓度之间具有极好的相关性($R^2=0.968$)。如图4B所示,在CBA测定法和市售的酶抑制测定法中测定的ADB IgG浓度之间也存在良好的相关性($R^2=0.934$)。

[0475] 然而,图中也说明了ADB酶抑制测定法缺乏精度。在酶抑制测定法中,三个样品被分类为“1200”,但在我们的CBA测定法中测量的抗DNaseB IgG浓度分别为1508、1070和914 μ g/ml(带框的数据点)。

[0476] 讨论

[0477] 该实施例展示了制备多重珠测定法用于GAS血清学,以及该测定法在测定来自健康和ARF受试者的一系列样品中的抗体浓度中的用途。有用地,该实施例表明,可以使用非

常小的样品量 (1 μ L或更少),在单个多重测定中组合使用三种化脓性链球菌抗原,以鉴定不同化脓性链球菌特异性抗体群组的存在,其中没有明显的交叉反应性。

[0478] 特别是,与现有的DnaseB测定法不同,本文展示的多重测定法可定量用于每种抗原:抗体复合物。此外,预期灵敏度/特异性提高,这部分归因于加入了在健康受试者中具有较低背景的SpnA,部分归因于提高的灵敏度,这尤其不受多重操作的负面影响。

[0479] 实施例二

[0480] 本实施例描述了使用Luminex平台开发基于珠的多重测定法,以确定生物样品中GAS特异性抗体的存在和量。

[0481] 方法

[0482] 研究受试者

[0483] 在该研究中,如以上实施例一所述获得人血清。同样,所有参与者均已提供了书面知情同意书,并获得了合适的伦理委员会批准。

[0484] 血清制备

[0485] 收集血清样品并按1:15,000稀释用于分析。使用前将IVIG参照物1:60,000稀释。

[0486] Luminex珠的制备和测定

[0487] 根据制造商的说明 (Luminex Corporation),使用胺与羧基交联剂,将每种抗原偶联到xMAP微球上。尝试了三种不同的抗原:珠比例进行缀合,并选择用12.5 μ g抗原缀合的珠用于进一步分析。

[0488] 选择三个间隔良好的珠位置,其中DNaseB位于珠位置030;SLO位于珠位置072;和SpnA位于珠位置078。将缀合的珠与1:30稀释的抗人IgG第二抗体孵育,用于多重反应。

[0489] 根据制造商的说明书,在Magpix™系统 (Merck) 上进行了Luminex测定。

[0490] 结果

[0491] 单重和多重测定法

[0492] 为了评估是否可以同时测量三种抗原的滴度,比较单重测定法与多重测定法的结果。进行单重测定法,其中将每个珠与来自参与者的血清一起孵育,然后在多重测定法中测试相同的血清,其中将三种抗原珠等分混合并在单个测定孔中与测试血清一起孵育。如图9所示,对于每种抗原,这些多重测定法中的MFI显示出与单重MFI极强的相关性, R^2 值如下: SLO=0.999 (图9A);DNaseB B=0.999 (图9B);和SpnA=0.999 (图9C)。这表明珠之间没有干扰或IgG交叉反应性,并证明了包含此三种链球菌抗原的基于Luminex的多重测定法的可行性。

[0493] 使用上述单重/多重比较中使用的相同10个血清,评估多重Luminex测定法的变异系数(CV)。在结合IgG标准曲线的测定中测量了这10个血清的IgG浓度,每种抗原的平均测定内和测定间CV分别为<2%和<11% (表3)。

[0494] 表3-变异系数

n=10	SLO	DNaseB	SpnA
测定内 CV (%)	1.8	1.5	1.8
测定间 CV (%)	9.3	10.4	10.4

[0496] 这些CV表明,基于Luminex的多重测定法具有良好的精度并且可重复。标准曲线和

测定法测试结果的可重复性意味着,这些试剂还可用于检查未来批次的抗原偶联珠的偶联功效和完整性。

[0497] 与现有血清学测试的比较

[0498] 为了比较Luminex测定法与现有的可商购方法,对从61名参与者(可获得足够体积的血清)获得的血清,进行了ASO和ADB测试。使用广泛使用的比浊技术,如以上实施例一所述,测量了ASO,并获得国际单位的确切值(IU/mL)。使用提供滴度范围(100、200、300、400、600、800、1200和~1600)的酶抑制测定法,测量了ADB滴度(还是如以上实施例一所述)。如图10A所示,在市售的浊度技术中测定的ASO IgG浓度和Luminex测定法测定的抗SLO抗体滴度之间具有良好的相关性($R^2=0.933$)。如图10B所示,在市售的酶抑制测定法中测定的ADB IgG浓度和Luminex测定法测定的抗DNaseB抗体滴度之间也存在良好的相关性($R^2=0.942$)。

[0499] ARF中的免疫动力学

[0500] 根据住院天数对诊断为ARF的患者(RFRF研究)的血清进行分层。从图11可以容易地看出,与住院少于20天收集的血清中的水平($n=19$)相比,在住院多于20天收集的血清中($n=17$)抗SpnA IgG的水平显著降低,表明比抗SLO抗体或抗DNaseB抗体具有较短的半衰期。

[0501] 这反过来提示SpnA对链球菌血清学具有有利的免疫动力学,支持其在诊断分析中的应用,特别是在多重测定法(如本文所述和例示的那些测定法)中的应用。应当理解,通过本文公开的本发明能够进行的分析,允许了快速鉴定和治疗近期暴露于化脓性链球菌的患者,但是对于这些患者,长期的抗生素治疗(经常延长使用多年)和随之而来的费用和 risk 是不必要的,是可以避免的。

[0502] 实施例三

[0503] 本实施例描述了使用Luminex平台进一步评估基于珠的多重测定法,以确定生物样品中GAS特异性抗体的存在、量和免疫动力学。

[0504] 方法

[0505] 研究受试者

[0506] 在该研究中,如以上实施例一所述获得人血清。同样,所有参与者均已提供了书面知情同意书,并获得了伦理委员会的适当批准。

[0507] 血清制备

[0508] 将急性风湿热患者的血清样本根据获得血液样品的日期进行分组:自住院之日起少于20天;入院后20天或更长时间。血清样品按1:15,000稀释用于分析。使用前将IVIG参照物1:60,000稀释。

[0509] Luminex珠的制备和测定法

[0510] 如实施例二中所述制备用于测定法中的每种抗原:xMAP微球。根据制造商的说明书,在Magpix™系统(Merck)上进行Luminex测定法。

[0511] 使用三重Luminex测定法,确定了SLO、DnaseB和SpnA的血清抗体滴度比较。使用GraphPad Prism 7.0软件进行了统计分析。

[0512] 结果

[0513] ARF中的免疫动力学

[0514] 根据住院天数将诊断为ARF的患者的血清分层(RFRF研究)。该分析的结果显示在下面的表4和图12中。

[0515] 表4-免疫动力学

抗原	<20 天 (n=48)	20+ 天 (n=37)	p-值
<u>SLO</u>			
平均值 (95% CI)	834.9 (598.3 - 1072)	695.2 (552.1 - 838.4)	
中值 (95% CI)	558.1 (430.9 - 740.6)	592.0 (465 - 727.8)	ns (p=0.8983)
<u>Dnase B</u>			
平均值(95% CI)	341.2 (267.7 - 414.6)	288.1 (220 - 356.2)	
中值(95% CI)	279.6 (238.2 - 355.7)	223.3 (184.2 - 293)	ns (p=0.3248)
<u>SpnA</u>			
平均值(95% CI)	103.4 (79.4 - 127.5)	70.1 (51.7 - 88.5)	
中值(95% CI)	75.1 (61.2 - 91.6)	59.3 (43.0 - 69.8)	p=0.0389

[0517] 在这些组之间，SLO和DnaseB的抗体滴度没有显著差异。但是，从图12可以容易地看出，与入院少于20天收集的血清中水平 (n=48) 相比，在住院多于20天收集的血清中抗 SpnA IgG水平显著降低 (n=37)，与上述实施例二中给出的结果一致。这支持以下结论：抗 SpnA抗体的半衰期比抗SLO抗体或抗DNaseB抗体短。

[0518] 这又表明SpnA对链球菌血清学具有有利的免疫动力学，支持其在诊断分析 (尤其是在如本文所述和示例的多重测定法)、治疗评估和治疗方案中的应用。

[0519] 实施例四

[0520] 此实施例描述了SpnA热稳定性的表征，作为诊断测定中应用的适宜性评估的一部分，所述诊断测定为例如在基于珠的多重测定法如Luminex平台中，或在浸条/试纸条测定上 (特别是在冷链存储不可行或不可用的情况下)。

[0521] 方法

[0522] 测定全长SpnA (aa28-877) 和C端截短的SpnA (aa28-854, SEQ ID NO:8) 的室温稳定性。简言之，将每种蛋白的等分试样在室温存储5天。使用SDS-PAGE显现蛋白质，并与未在室温存储任何时间 (0天) 的蛋白质进行比较。

[0523] 结果

[0524] 对于全长和C端截短的多肽两者，完整SpnA作为~85kDa的条带存在。然而，全长构建体在室温较不稳定，如在5天孵育后该~85kDa条带的量的显著降低所显示的 (图13A)。相反，对于截短的SpnA，室温5天存储后，该~85kDa条带的量具有微小的改变，如图13B所示。

[0525] 这些数据清楚地表明，室温存储时，截短SpnA多肽比全长天然SpnA多肽稳定性更高。这些结果支持截短SpnA在诊断测定、治疗评估、和治疗方案中的应用，尤其是在长期试剂存储、或存储条件对于典型基于蛋白的组合物非最佳 (例如，室温或缺少冷链) 的情况下。

[0526] 实施例五

[0527] 此实施例描述了SpnA热稳定性的表征,作为评估其用于诊断测定的适宜性的一部分,所述诊断测定例如在基于珠的多重测定法如Luminex平台中,或在浸条/试纸条测定上(特别是在冷链存储不可行或不可用的情况下)。

[0528] 方法

[0529] 根据公开的方案 (Moreau, M. J. J., Morin, I. & Schaeffer, P. M. *Mol. BioSyst.* 6, 1285-1292 (2010)), 使用热熔, 测定SpnA稳定性。简而言之, 通过将蛋白质在相同缓冲液中在图14A所示的温度下孵育5分钟, 比较原始SpnA构建体 (aa28-877) 与截短构建体 (aa28-854) 的热稳定性。

[0530] 这之后是冷却和离心步骤以去除蛋白聚集体。通过SDS-PAGE确定折叠蛋白的百分数, 并使用GraphPad Prism 7.0软件根据热聚集曲线计算Tagg值 (50%蛋白聚集时的温度)。

[0531] 结果

[0532] 通过SDS-PAGE评估的每个温度下折叠蛋白的百分比显示在图14A的色谱图中。绘制了每个温度下每种蛋白质的Tagg (50%蛋白聚集的温度) (图14B), 清楚地表明这两种蛋白质的熔解曲线的差异。在三个重复实验中, 截短构建体的平均Tagg值为51.0 $\pm$ 0.6 $^{\circ}$ C, 显著高于原始构建体的47.5 $\pm$ 0.9 $^{\circ}$ C, $p < 0.05$, 如图14C清楚所示。

[0533] 这清楚地表明截短SpnA多肽具有更高的热稳定性, 支持其在诊断测定法、治疗评估和治疗方案中的用途, 尤其是在长期试剂存储、或存储条件对于典型基于蛋白的组合物非最佳 (例如, 室温或缺乏冷链) 的情况下。

[0534] 出版物

[0535] 1. Johnson DR, Kurlan R, Leckman J, Kaplan EL. The human immune response to streptococcal extracellular antigens: clinical, diagnostic, and potential pathogenetic implications. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 50: 481-90.

[0536] 2. Chang A, Khemlani A, Kang H, Proft T. Functional analysis of *Streptococcus pyogenes* nuclease A (SpnA), a novel group A streptococcal virulence factor. *Molecular Microbiology*. 2011; 79: 1629-42.

[0537] 3. Atatoa-Carr P, Lennon D, Wilson N, New Zealand Rheumatic Fever Guidelines Writing Group. Rheumatic fever diagnosis, management, and secondary prevention: a New Zealand guideline. *N Z Med J*. 2008; 121: 59-69.

[0538] 4. Raynes JM, Frost HRC, Williamson DA, Young PG, Baker EN, Steemson JD, et al. Serological Evidence of Immune Priming by Group A Streptococci in Patients with Acute Rheumatic Fever. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1119.

[0539] 5. Dabito D, Margolick JB, Lopez J, Bream JH. Multiplex measurement of proinflammatory cytokines in human serum: comparison of the Meso Scale Discovery electrochemiluminescence assay and the Cytometric Bead Array. *J Immunol Methods*. 2011; 372: 71-7.

[0540] 6. Steer AC, Vidmar S, Ritika R, Kado J, Batzloff M, Jenney AWJ, et al. Normal ranges of streptococcal antibody titers are similar whether streptococci are endemic to the setting or not. *Clin. Vaccine Immunol*. 2009; 16:

172-5.

[0541] 7. Moreau, M. J. J., Morin, I. & Schaeffer, P. M. Mol. BioSyst. 6, 1285-1292 (2010) .

[0542] 上文和下文引用的所有申请、专利和出版物的全部公开内容(如果有的话)均通过引用并入本文。

[0543] 在本说明书中对任何现有技术的引用不是、也不应认为是承认或以任何形式地暗示该现有技术在这个世界上任何国家都构成所属领域的公知常识的一部分。

[0544] 本发明也可以广义地说在于单独地或集合地在本申请说明书中提及的或指出的部分、要素和特征,在于所述部分、要素或特征中的两个或更多个的任何或全部组合。

[0545] 在前面的描述中提到整数或具有其已知等同物的组分时,这些整数在这里被并入,就如同分别单独述及一样。

[0546] 应当注意,对于本领域技术人员而言,对于本文描述的当前优选实施方案的各种改变和修改将是显而易见的。可以在不脱离本发明的精神和范围并且不减少其附加优点的情况下进行这种改变和修改。因此,意图将这样的改变和修改包括在本发明内。

[0547] 本发明也可以广义地说在于单独地或集合地在本申请说明书中提及或指出的部分、要素和特征,在于所述部分、要素或特征中的两个或更多个的任何或全部组合。

[0548] 本发明的各个方面已经通过实施例的方式描述,应当理解在不脱离本发明范围的情况下可以对其进行修改和添加。

序列表

<110> 奥克兰联合服务有限公司(Auckland Uniservices Limited)

<120> 分析和治疗方法和组合物及其用途

<130> 306276PCT

<150> NZ 731324

<151> 2017-04-26

<150> NZ 736448

<151> 2017-10-16

<160> 8

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 540

<212> PRT

<213> 化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes)

<400> 1

Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn

1 5 10 15

Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly

20 25 30

Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala

35 40 45

Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser

[0001] 50 55 60

Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp

65 70 75 80

Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn

85 90 95

Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala

100 105 110

Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr

115 120 125

Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro

130 135 140

Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp

145 150 155 160

Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro

165 170 175

Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala

180 185 190

Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn

195 200 205

Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser

210 215 220

Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser

225 230 235 240

	Lys	Ile	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Ser	Ile	Ser	Lys	
					245					250						255	
	Gly	Glu	Lys	Lys	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Lys	Gln	Ile	Phe	Tyr	Thr	
					260					265						270	
	Val	Ser	Ala	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Asp	Lys	Ser	
					275					280						285	
	Val	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	Gly	Val	Ser	Asn	Glu	Ala	Pro	
					290					295						300	
	Pro	Leu	Phe	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Thr	Val	Phe	Val	Lys	
	305					310					315					320	
	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ser	Asn	Asp	Val	Glu	Ala	Ala	Phe	Ser	Ala	
					325					330						335	
	Ala	Leu	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Thr	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ser	Asp	Ile	
					340					345						350	
	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	Ala	Ala	
					355					360						365	
	Glu	His	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Lys	Asp	Phe	Asp	Val	Ile	Arg	Asn	Val	
					370					375						380	
	Ile	Lys	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Arg	Lys	Asn	Pro	Ala	Tyr	Pro	Ile	
	385					390					395					400	
	Ser	Tyr	Thr	Ser	Val	Phe	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Ile	Ala	Gly	Val	Asn	
					405					410						415	
[0002]	Asn	Arg	Thr	Glu	Tyr	Val	Glu	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Tyr	Thr	Ser	Gly	
					420					425						430	
	Lys	Ile	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Ala	Tyr	Val	Ala	Gln	Tyr	Glu	Ile	
					435					440						445	
	Leu	Trp	Asp	Glu	Ile	Asn	Tyr	Asp	Asp	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Ile	Thr	
					450					455						460	
	Lys	Arg	Arg	Trp	Asp	Asn	Asn	Trp	Tyr	Ser	Lys	Thr	Ser	Pro	Phe	Ser	
	465					470					475					480	
	Thr	Val	Ile	Pro	Leu	Gly	Ala	Asn	Ser	Arg	Asn	Ile	Arg	Ile	Met	Ala	
					485					490						495	
	Arg	Glu	Cys	Thr	Gly	Leu	Ala	Trp	Glu	Trp	Trp	Arg	Lys	Val	Ile	Asp	
					500					505						510	
	Glu	Arg	Asp	Val	Lys	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Asn	Val	Asn	Ile	Ser	Gly	
					515					520						525	
	Ser	Thr	Leu	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr	Lys					
					530					535						540	
<210>	2																
<211>	540																
<212>	PRT																
<213>	化脓性链球菌																
<400>	2																
	Glu	Ser	Asn	Lys	Gln	Asn	Thr	Ala	Ser	Thr	Glu	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	
1					5					10						15	

	Glu	Gln	Pro	Lys	Pro	Glu	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Thr	Glu	Lys	Ala	Gly	
				20					25						30		
	Gln	Lys	Thr	Asp	Asp	Met	Leu	Asn	Ser	Asn	Asp	Met	Ile	Lys	Leu	Ala	
			35					40					45				
	Pro	Lys	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Ser	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Lys	Lys	Ser	
			50				55					60					
	Glu	Asp	Lys	Lys	Lys	Ser	Glu	Glu	Asp	His	Thr	Glu	Glu	Ile	Asn	Asp	
	65					70				75					80		
	Lys	Ile	Tyr	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asn	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Ala	Lys	Asn	
					85				90						95		
	Gly	Glu	Thr	Ile	Glu	Asn	Phe	Val	Pro	Lys	Glu	Gly	Val	Lys	Lys	Ala	
				100					105						110		
	Asp	Lys	Phe	Ile	Val	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys	Lys	Asn	Ile	Asn	Thr	Thr	
			115					120					125				
	Pro	Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Arg	Thr	Tyr	Pro	
			130				135						140				
	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Asn	Lys	Gly	Phe	Thr	Glu	Asn	Lys	Pro	Asp	
	145					150					155				160		
	Ala	Val	Val	Thr	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Lys	Ile	His	Ile	Asp	Leu	Pro	
					165				170						175		
	Gly	Met	Gly	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Glu	Val	Asn	Asp	Pro	Thr	Tyr	Ala	
			180					185					190				
[0003]	Asn	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Val	Asn	Gln	Trp	His	Asp	Asn	
			195					200					205				
	Tyr	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Ala	Arg	Thr	Gln	Tyr	Thr	Glu	Ser	
			210				215					220					
	Met	Val	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Asn	Val	Asn	Ser	
	225					230					235				240		
	Lys	Ile	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Ser	Ile	Ser	Lys	
					245				250						255		
	Gly	Glu	Lys	Lys	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Lys	Gln	Ile	Phe	Tyr	Thr	
				260					265						270		
	Val	Ser	Ala	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Asp	Lys	Ser	
			275					280							285		
	Val	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	Gly	Val	Ser	Asn	Glu	Ala	Pro	
			290				295					300					
	Pro	Leu	Phe	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Thr	Val	Phe	Val	Lys	
	305					310					315				320		
	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ser	Asn	Asp	Val	Glu	Ala	Ala	Phe	Ser	Ala	
					325				330						335		
	Ala	Leu	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Thr	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ser	Asp	Ile	
				340					345						350		
	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	Ala	Ala	
			355					360						365			
	Glu	His	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Lys	Asp	Phe	Asp	Val	Ile	Arg	Asn	Val	

	370	375	380
	Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala Tyr Pro Ile		
	385	390	395 400
	Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn		
	405	410	415
	Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly		
	420	425	430
	Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile		
	435	440	445
	Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr		
	450	455	460
	Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser		
	465	470	475 480
	Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala		
	485	490	495
	Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp		
	500	505	510
	Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly		
	515	520	525
	Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys		
	530	535	540
[0004]	<210> 3		
	<211> 35		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的- 实验室中合成的寡核苷酸		
	<400> 3		
	caccatgcga caaacacagg tctcaaatga tgttg		35
	<210> 4		
	<211> 35		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的- 实验室中合成的寡核苷酸		
	<400> 4		
	tttctgagta ggtgtaccgt tatggtagtt aatgg		35
	<210> 5		
	<211> 229		
	<212> PRT		
	<213> 化脓性链球菌		
	<400> 5		
	Arg Gln Thr Gln Val Ser Asn Asp Val Val Leu Asn Asp Gly Ala Ser		
	1 5 10 15		
	Lys Tyr Leu Asn Glu Ala Leu Ala Trp Thr Phe Asn Asp Ser Pro Asn		

	20	25	30
	Tyr Tyr Lys Thr Leu Gly Thr Ser Gln Ile Thr Pro Ala Leu Phe Pro		
	35	40	45
	Lys Ala Gly Asp Ile Leu Tyr Ser Lys Leu Asp Glu Leu Gly Arg Thr		
	50	55	60
	Arg Thr Ala Arg Gly Thr Leu Thr Tyr Ala Asn Val Glu Gly Ser Tyr		
	65	70	75
	Gly Val Arg Gln Ser Phe Gly Lys Asn Gln Asn Pro Ala Gly Trp Thr		
	85	90	95
	Gly Asn Pro Asn His Val Lys Tyr Lys Ile Glu Trp Leu Asn Gly Leu		
	100	105	110
	Ser Tyr Val Gly Asp Phe Trp Asn Arg Ser His Leu Ile Ala Asp Ser		
	115	120	125
	Leu Gly Gly Asp Ala Leu Arg Val Asn Ala Val Thr Gly Thr Arg Thr		
	130	135	140
	Gln Asn Val Gly Gly Arg Asp Gln Lys Gly Gly Met Arg Tyr Thr Glu		
	145	150	155
	Gln Arg Ala Gln Glu Trp Leu Glu Ala Asn Arg Asp Gly Tyr Leu Tyr		
	165	170	175
	Tyr Glu Ala Ala Pro Ile Tyr Asn Ala Asp Glu Leu Ile Pro Arg Ala		
	180	185	190
	Val Val Val Ser Met Gln Ser Ser Asp Asn Thr Ile Asn Glu Lys Val		
[0005]	195	200	205
	Leu Val Tyr Asn Thr Ala Asn Gly Tyr Thr Ile Asn Tyr His Asn Gly		
	210	215	220
	Thr Pro Thr Gln Lys		
	225		
	<210> 6		
	<211> 32		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的- 实验室中合成的寡核苷酸		
	<400> 6		
	aaagcgcccc gccaaaattt gacttatgcc aa		32
	<210> 7		
	<211> 38		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的- 实验室中合成的寡核苷酸		
	<400> 7		
	aaactcgagc tatttggaat atgataattg aagtaaca		38
	<210> 8		
	<211> 827		

<212> PRT
 <213> 化脓性链球菌
 <400> 8
 Arg Gln Asn Leu Thr Tyr Ala Asn Glu Ile Val Thr Gln Arg Pro Lys
 1 5 10 15
 Arg Glu Ser Val Ile Ser Asp Lys Ser Asn Phe Pro Val Ile Ser Pro
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Ser Val Asp Phe Gly Glu Arg Lys Thr Pro Leu Pro Thr
 35 40 45
 Pro Asp Lys Gly Val Lys Val Thr Thr Glu Gln Ser Ile Ala Gln Val
 50 55 60
 Arg Lys Gly Pro Glu Glu Arg Pro Tyr Thr Val Thr Gly Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 Ser Val Ile Asn Gly Trp Gly Gly Tyr Gly Phe Tyr Ile Gln Asp Ser
 85 90 95
 Glu Gly Ile Gly Leu Tyr Val Tyr Pro Gln Lys Asp Leu Gly Tyr Ser
 100 105 110
 Lys Gly Asp Ile Val Gln Leu Thr Gly Thr Leu Thr Arg Phe Lys Gly
 115 120 125
 Asp Leu Gln Leu Gln Gln Val Thr Ala His Lys Lys Leu Glu Leu Ser
 130 135 140
 Phe Pro Thr Ser Val Lys Glu Ala Val Ile Ser Glu Leu Glu Thr Thr
 [0006] 145 150 155 160
 Thr Pro Ser Thr Leu Val Lys Leu Ser His Val Thr Val Gly Glu Leu
 165 170 175
 Ser Thr Asp Gln Tyr Asn Asn Thr Ser Phe Leu Val Arg Asp Asp Ser
 180 185 190

 Gly Lys Ser Ile Val Val His Ile Asp His Arg Thr Gly Val Lys Gly
 195 200 205
 Ala Asp Val Val Thr Lys Ile Ser Gln Gly Asp Leu Ile Asn Leu Thr
 210 215 220
 Ala Ile Leu Ser Ile Val Asp Gly Gln Leu Gln Leu Arg Pro Phe Ser
 225 230 235 240
 Leu Glu Gln Leu Glu Val Val Lys Lys Val Thr Ser Ser Asn Ser Asp
 245 250 255
 Ala Ser Ser Arg Asn Ile Val Lys Ile Gly Glu Ile Gln Gly Ala Ser
 260 265 270
 His Thr Ser Pro Leu Leu Lys Lys Ala Val Thr Val Glu Gln Val Val
 275 280 285
 Val Thr Tyr Leu Asp Asp Ser Thr His Phe Tyr Val Gln Asp Leu Asn
 290 295 300
 Gly Asp Gly Asp Leu Ala Thr Ser Asp Gly Ile Arg Val Phe Ala Lys
 305 310 315 320
 Asn Ala Lys Val Gln Val Gly Asp Val Leu Thr Ile Ser Gly Glu Val

	325	330	335
	Glu Glu Phe Phe Gly Arg Gly Tyr	Glu Glu Arg Lys Gln Thr	Asp Leu
	340	345	350
	Thr Ile Thr Gln Ile Val Ala Lys	Ala Val Thr Lys Thr Gly	Thr Ala
	355	360	365
	Gln Val Pro Ser Pro Leu Val Leu Gly	Lys Asp Arg Ile Ala Pro	Ala
	370	375	380
	Asn Ile Ile Asp Asn Asp Gly Leu Arg	Val Phe Asp Pro Glu Glu	Asp
	385	390	395
	Ala Ile Asp Tyr Trp Glu Ser Met Glu	Gly Met Leu Val Ala Val	Asp
	405	410	415
	Asp Ala Lys Ile Leu Gly Pro Met Lys	Asn Lys Glu Ile Tyr Val	Leu
	420	425	430
	Pro Gly Ser Ser Thr Arg Pro Leu Asn	Asn Ser Gly Gly Val Leu	Leu
	435	440	445
	Pro Ala Asn Ser Tyr Asn Thr Asp Val	Ile Pro Val Leu Phe Lys	Lys
	450	455	460
	Gly Lys Gln Ile Ile Lys Ala Gly Asp	Ser Tyr Lys Gly Arg Leu	Ala
	465	470	475
	Gly Pro Val Ser Tyr Ser Tyr Gly Asn	Tyr Lys Val Phe Val Asp	Asp
	485	490	495
	Ser Lys Asn Met Pro Ser Leu Met Asp	Gly His Leu Lys Pro Glu	Lys
[0007]	500	505	510
	Thr Asn Leu Gln Lys Asp Leu Ser Lys	Leu Ser Ile Ala Ser Tyr	Asn
	515	520	525
	Ile Glu Asn Phe Ser Ala Asn Pro Ser	Ser Thr Lys Asp Glu Lys	Val
	530	535	540
	Lys Arg Ile Ala Glu Ser Phe Ile His	Asp Leu Asn Ala Pro Asp	Ile
	545	550	555
	Ile Gly Leu Ile Glu Val Gln Asp Asn	Asn Gly Pro Thr Asp Asp	Gly
	565	570	575
	Thr Thr Asp Ala Thr Gln Ser Ala Gln	Arg Leu Ile Asp Ala Ile	Lys
	580	585	590
	Lys Leu Gly Gly Pro Thr Tyr Arg Tyr	Val Asp Ile Ala Pro Glu	Asn
	595	600	605
	Asn Val Asp Gly Gly Gln Pro Gly Gly	Asn Ile Arg Thr Gly Phe	Leu
	610	615	620
	Tyr Gln Pro Glu Arg Val Ser Leu Ser	Asp Lys Pro Lys Gly Gly	Ala
	625	630	635
	Arg Asp Ala Leu Thr Trp Val Asn Gly	Glu Leu Asn Leu Ser Val	Gly
	645	650	655
	Arg Ile Asp Pro Thr Asn Ala Ala Trp	Lys Asp Val Arg Lys Ser	Leu
	660	665	670
	Ala Ala Glu Phe Ile Phe Gln Gly Arg	Lys Val Val Val Val Ala	Asn
	675	680	685

	His	Leu	Asn	Ser	Lys	Arg	Gly	Asp	Asn	Ala	Leu	Tyr	Gly	Cys	Val	Gln	
	690						695					700					
	Pro	Val	Thr	Phe	Lys	Ser	Glu	Gln	Arg	Arg	His	Val	Leu	Ala	Asn	Met	
	705					710					715					720	
	Leu	Ala	Gln	Phe	Ala	Lys	Glu	Gly	Ala	Lys	His	Gln	Ala	Asn	Ile	Val	
					725					730					735		
	Met	Leu	Gly	Asp	Phe	Asn	Asp	Phe	Glu	Phe	Thr	Lys	Thr	Ile	Gln	Leu	
			740						745					750			
[0008]	Ile	Glu	Glu	Gly	Asp	Met	Val	Asn	Leu	Val	Ser	Arg	His	Asp	Ile	Ser	
		755						760						765			
	Asp	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Phe	His	Gln	Gly	Asn	Asn	Gln	Thr	Leu	Asp	Asn	
		770						775						780			
	Ile	Leu	Val	Ser	Arg	His	Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Glu	Phe	Asp	Met	Val	
	785					790					795					800	
	His	Val	Asn	Ser	Pro	Phe	Met	Glu	Ala	His	Gly	Arg	Ala	Ser	Asp	His	
					805					810					815		
	Asp	Pro	Leu	Leu	Leu	Gln	Leu	Ser	Phe	Ser	Lys						
			820							825							

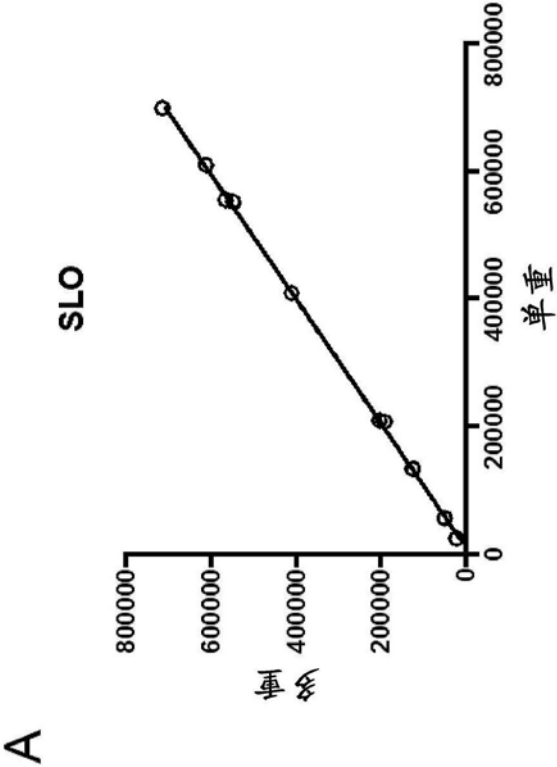


图1A

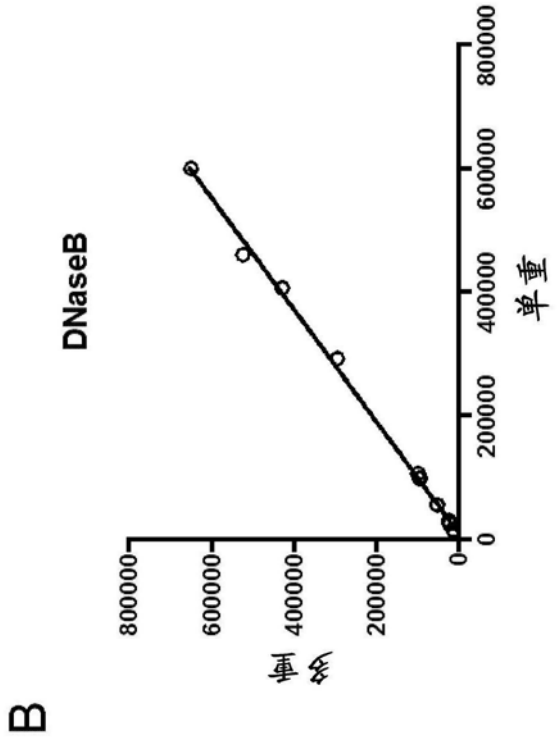


图1B

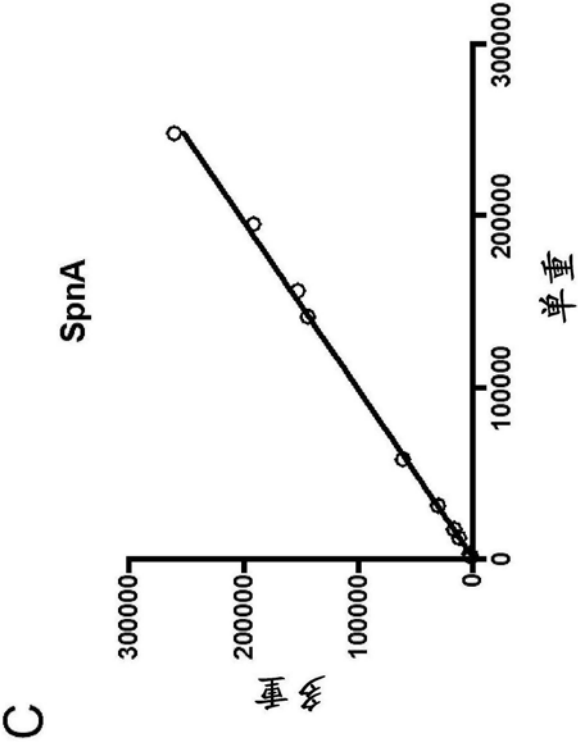


图1C

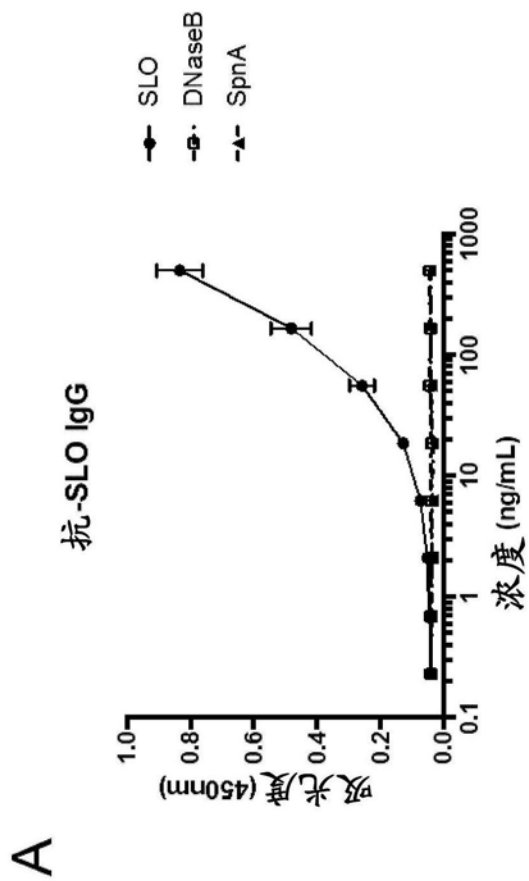


图2A

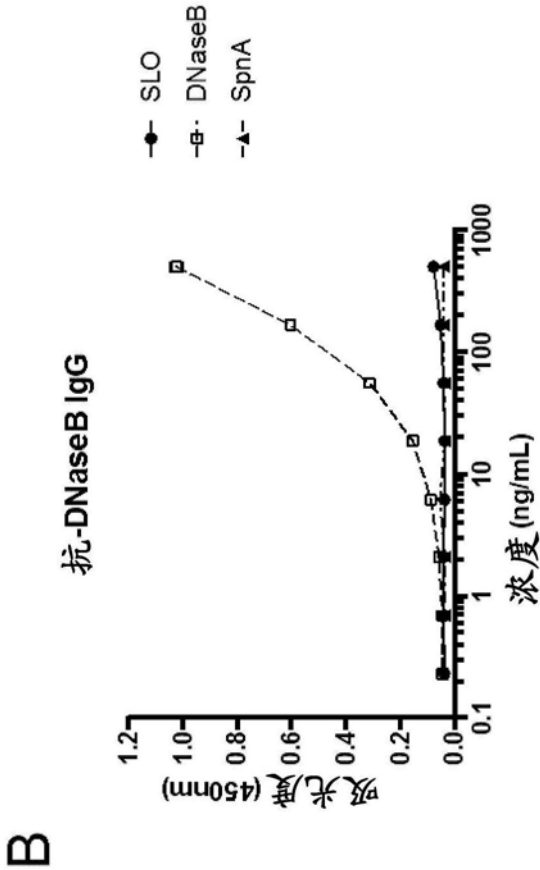


图2B

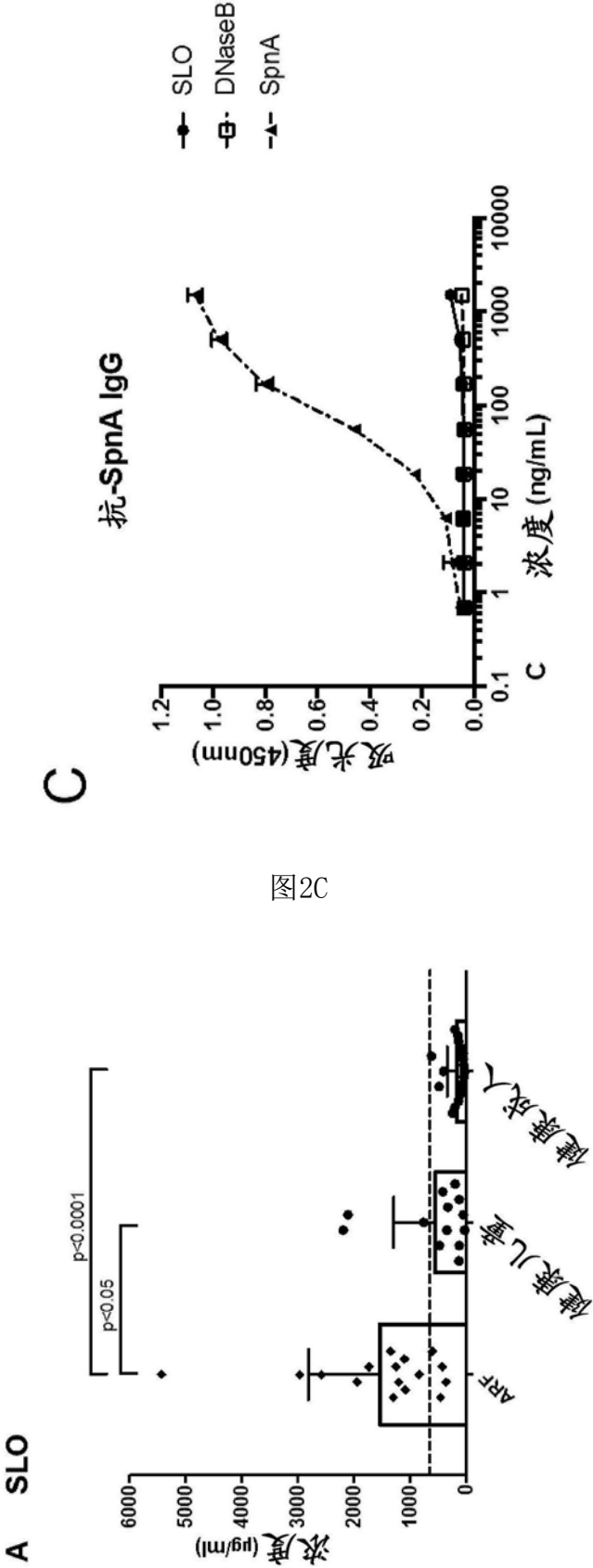


图2C

图3A

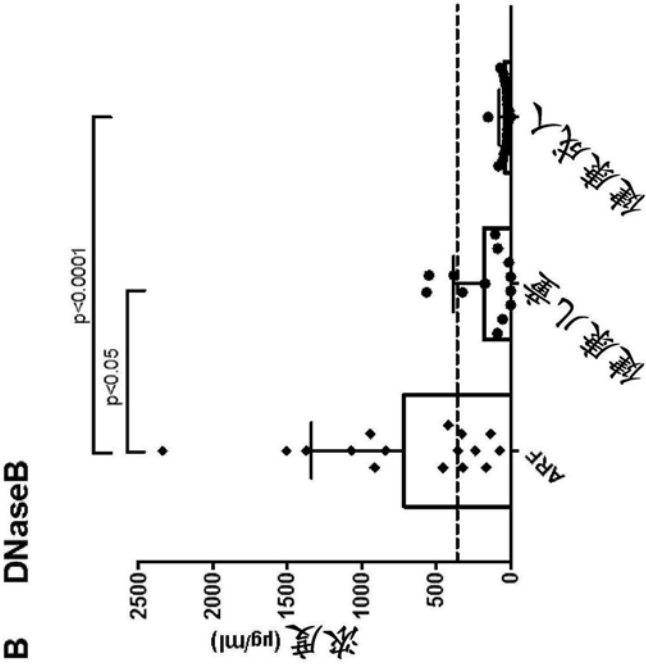


图3B

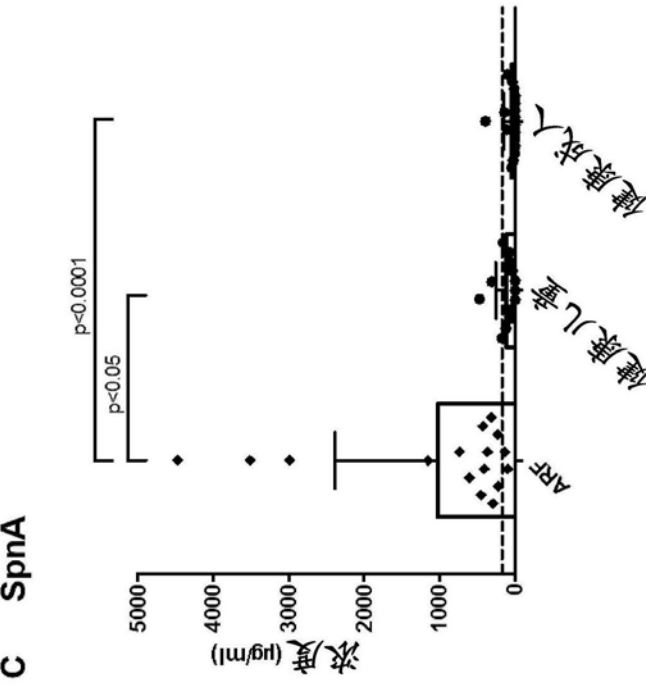


图3C

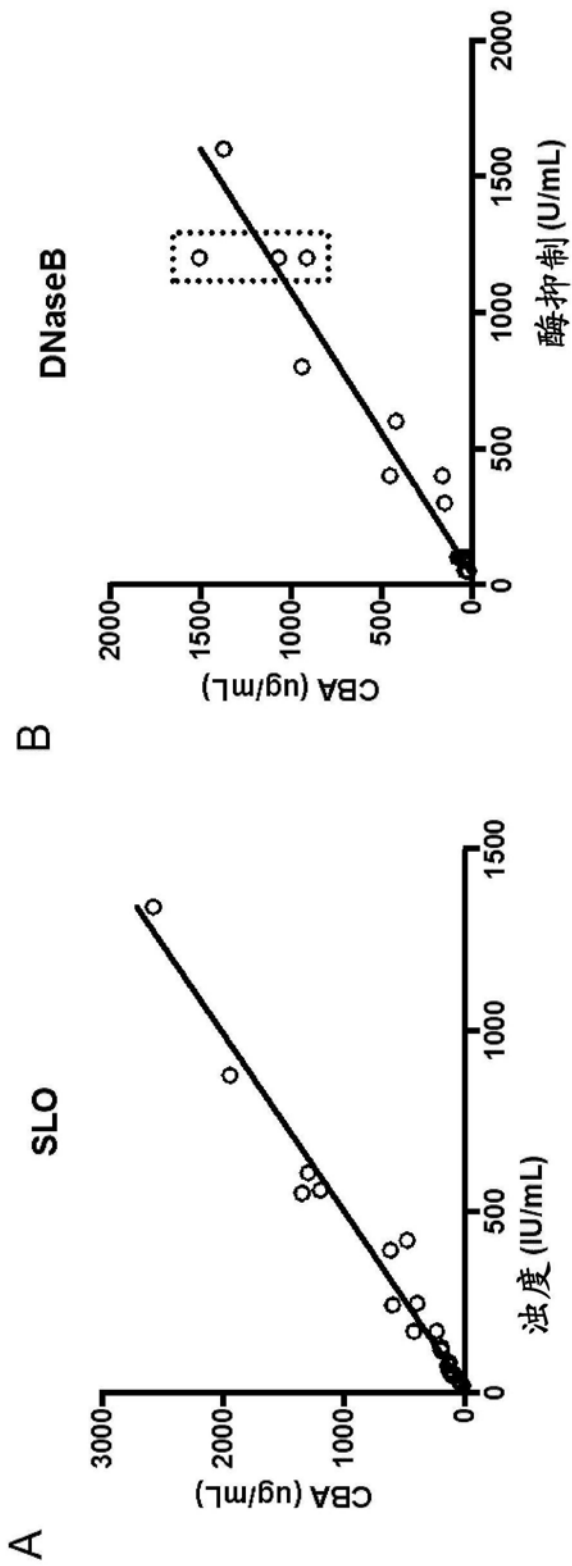


图4

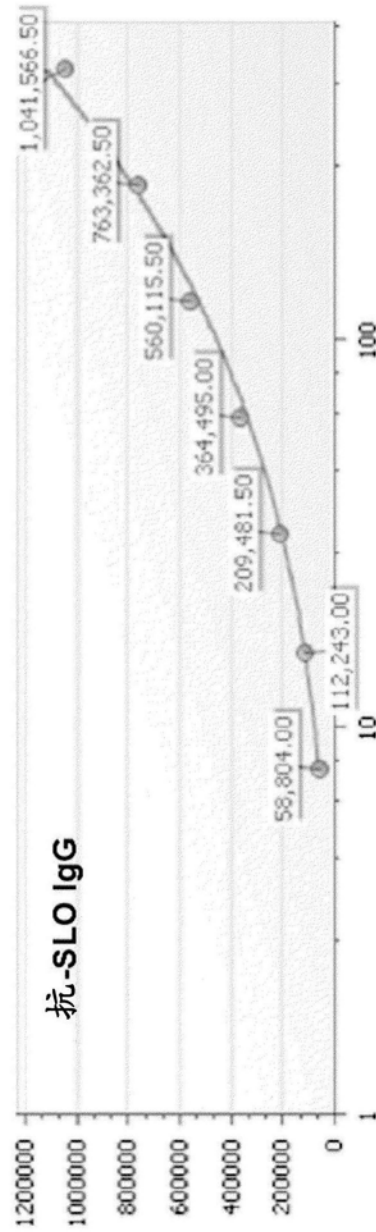


图5A

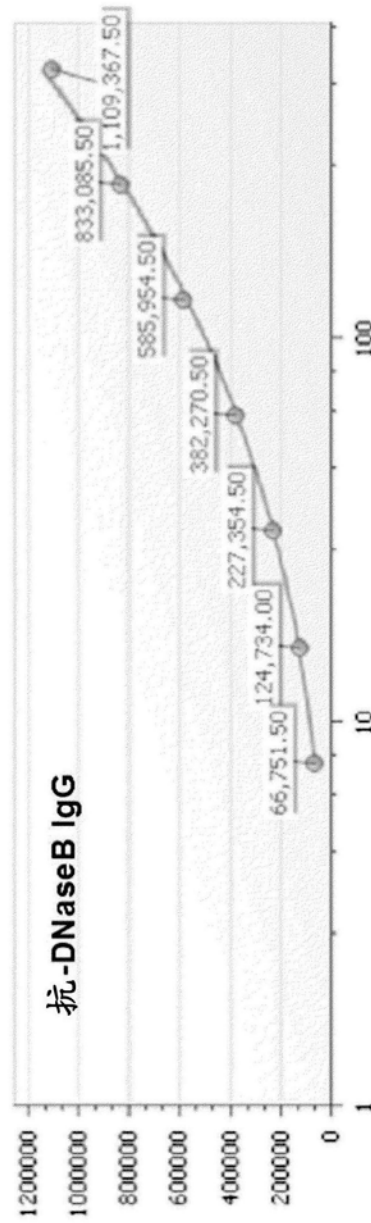


图5B

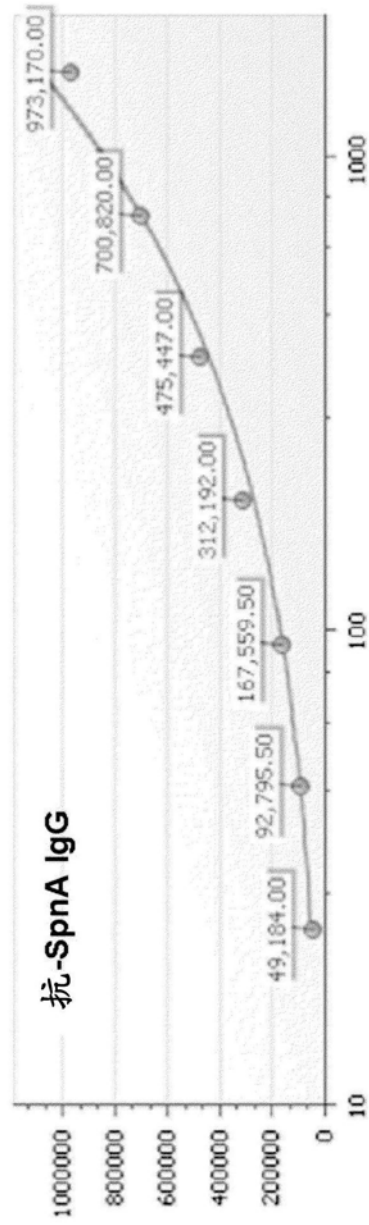


图5C

>野生型SLO

ESNKQNTASTETTTTNEQPKPESELTTTEKAGQKTD DMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKE
 EKKSEDKKKSEEDHTEEIINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIIVIER
 KKKNINTTPVDISIIDSVTDRTPAALQLANKGFTENKPD AVVTKRNPQKIHIDLPGMGD
 KATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTL PARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNS
 KILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQKKGVS
 NEAPPLFVSNVAYGRTVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILENSSFTA
 VVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPI SYTSVFLKNNKIAGVNNRTE
 YVETSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEIN YDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTS PFS
 TVIPLGANSRNIRIMARECTGLAEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK

图6A

> 脱毒的SLO

ESNKQNTASTETTTNEQPKPESELTTTEKAGQKTDMDLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKE
EKKSEDKKKSEEDHTEEIINDKIYSLNYNELVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIER
KKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGMGD
KATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNS
KILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNPNPADVFDKSVTFKELQKKGVS
NEAPPLFVSNVAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAFSAAALKGTDVKTNGKYSDILENSSFTA
VVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNLAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTE
YVETSTEYTSKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSPPFS
TVIPLGANSRNIRIMARECTGLAEEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK

图6B

>DNaseB 43-271
RQTQVSNQVVLNDGASKYLNEALAWTFNDSPNYKTLGTSQITPAPFPKAGDILYSKLDDELGRTRTARGTLTYANVEGSGVVRQSFQKQNPAGWT
GNPNHVKKYKIEWLNGLSYVGDFWNRSHLIADSLGGDALRVNAVGTGTRTQNVGGRDQKGGMRYTEQRAQEWLEANRDGYLYEAAPIYNADLIPRA
VVVSMQSSDNTINEKVLVYNTANGYTTINYHNGTPTQK

图7

>SpnA 28-854
RQNLTYANEIVTQRPKRESVISDKSNFPVISPYLASVDFGERKTPLETPDKGVKVTTEQSIQVRKGPPERPYTVTGKITSVINGWGGYGFYIQDS
EGIGLYVYPQKDLGYSKGDIVQLTGTLTRFKGDLQLQQVTAHKKLELSEFTSVKEAVISELETTPTSTLVKLSHVTVGELSTDQYNNNTSFLVRRDDS
GKSI VVHIDHRTGVKGADVVTKISQGD LINLTAILSI VDGQLQLRPFSLEQLLEVKKVTSSNSDASSRNIVKIGEI QGASHTSPLLKKAVTVEQVV
VTYLD DSTHFYVQDLNGDGLATSDGIRVFAKNAKVQVGDVLTISGEVEEFFGRGYEERKQTDLTITQIVAKAVTKGTGAQVPSPLVLGKDRIAPA
NI IDNDGLRVFDPEEDAI DYWESMEGMLVAVDDAKILGPMKNKEIYVLP GSSTRPLNNSGGVLLPANSYNTDVI PVLFKKGKQIIKAGDSYKGRLA
GPVSYSYGN YKVFVDDSKNMPSLMDGHLKPEKTNLQKDL SKLSIASYNIENFSANPSSTKDEKVKRIAESFIHDLNAPDIIIGLIEVQDNNNGPTDDG
TTDATQSAQRLIDAIKKLGGPTYRYVDIAPENNVDGGQPGGNIRTGFLYQPERVSLSDKPKGGARDALTWVNGELNLSVGRIDPTNAAWKDV RKSL
AAEFIFQGRKVVVVANHLNSKRGDNALYGCVPVTFKSEQRRHVLANMLAQFAKEGAKHQANIVMLGDFNDFEFTKTIQLIEEGDMVNILVSRHDIS
DRYSYFHQGNQOTLDNILVSRHLLDHYEFDVMHVNSPFMEAHGRASDHDPLLLQLSFSK

图8

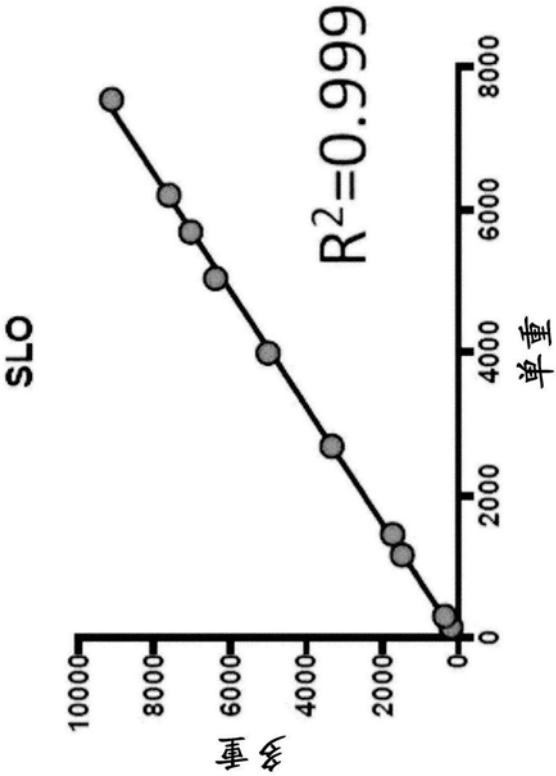


图9A

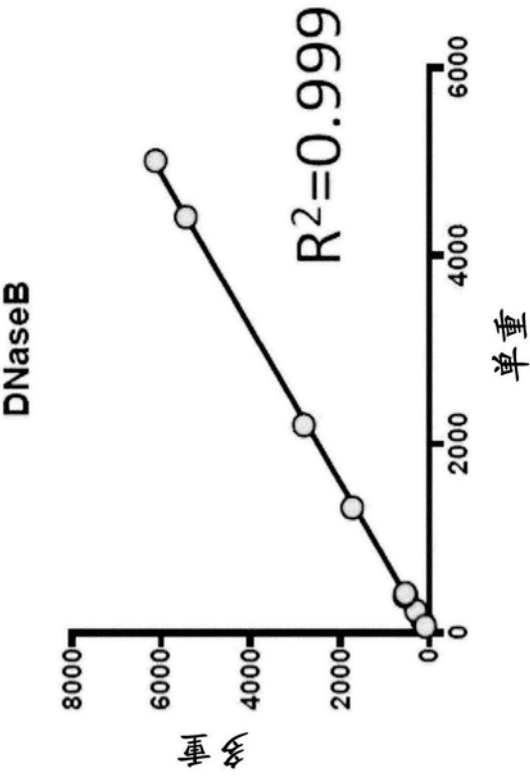


图9B

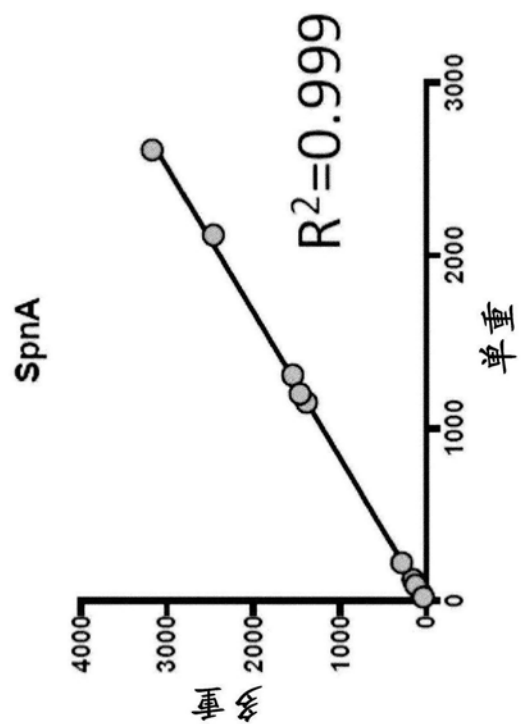


图9C

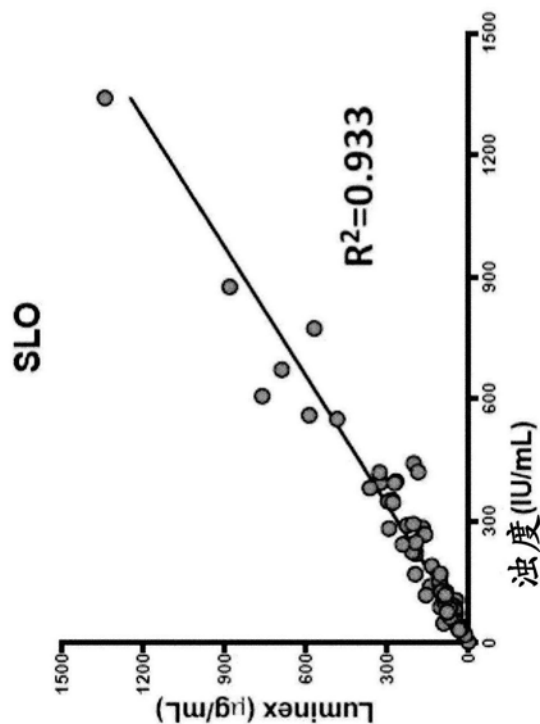


图10A

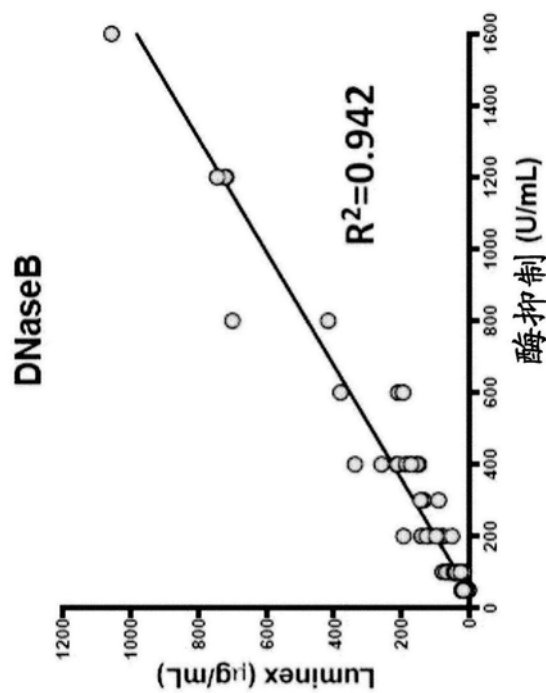


图10B

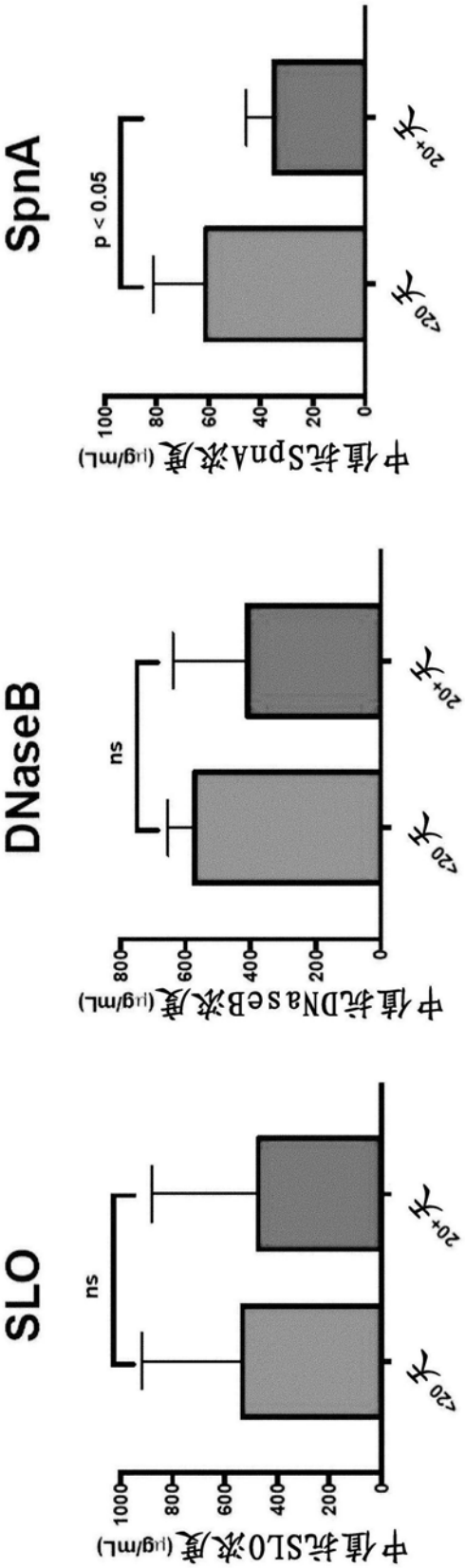


图11

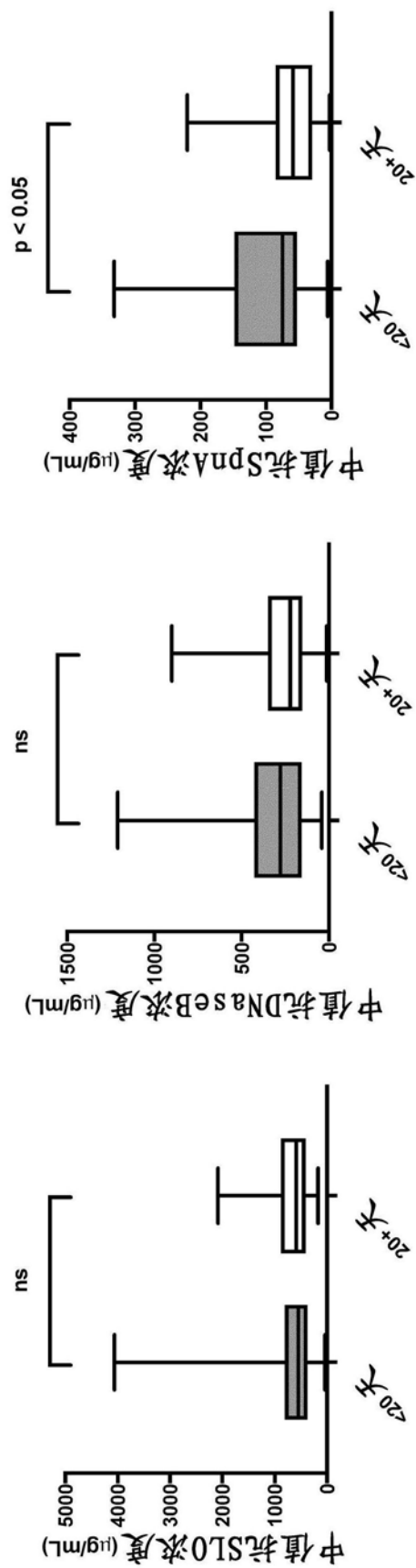


图12

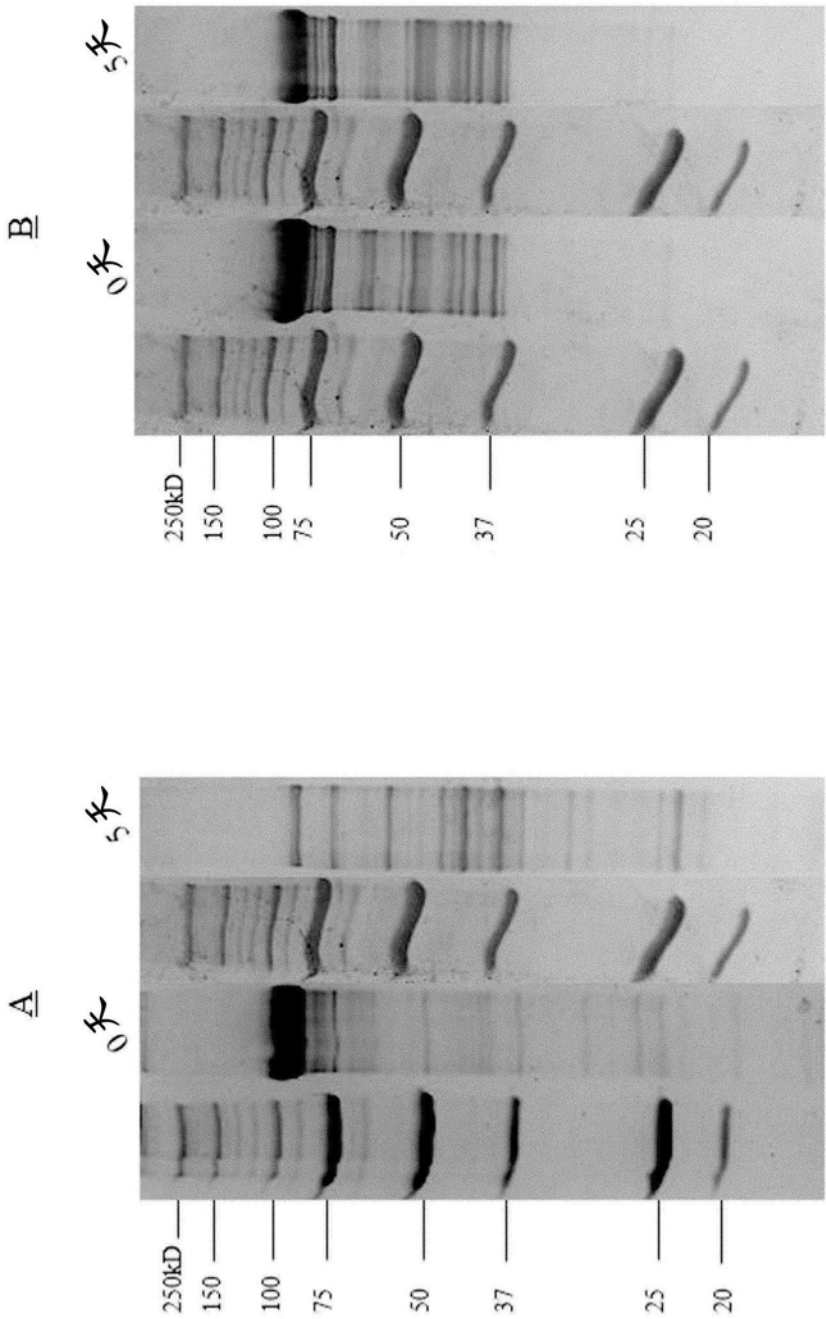


图13

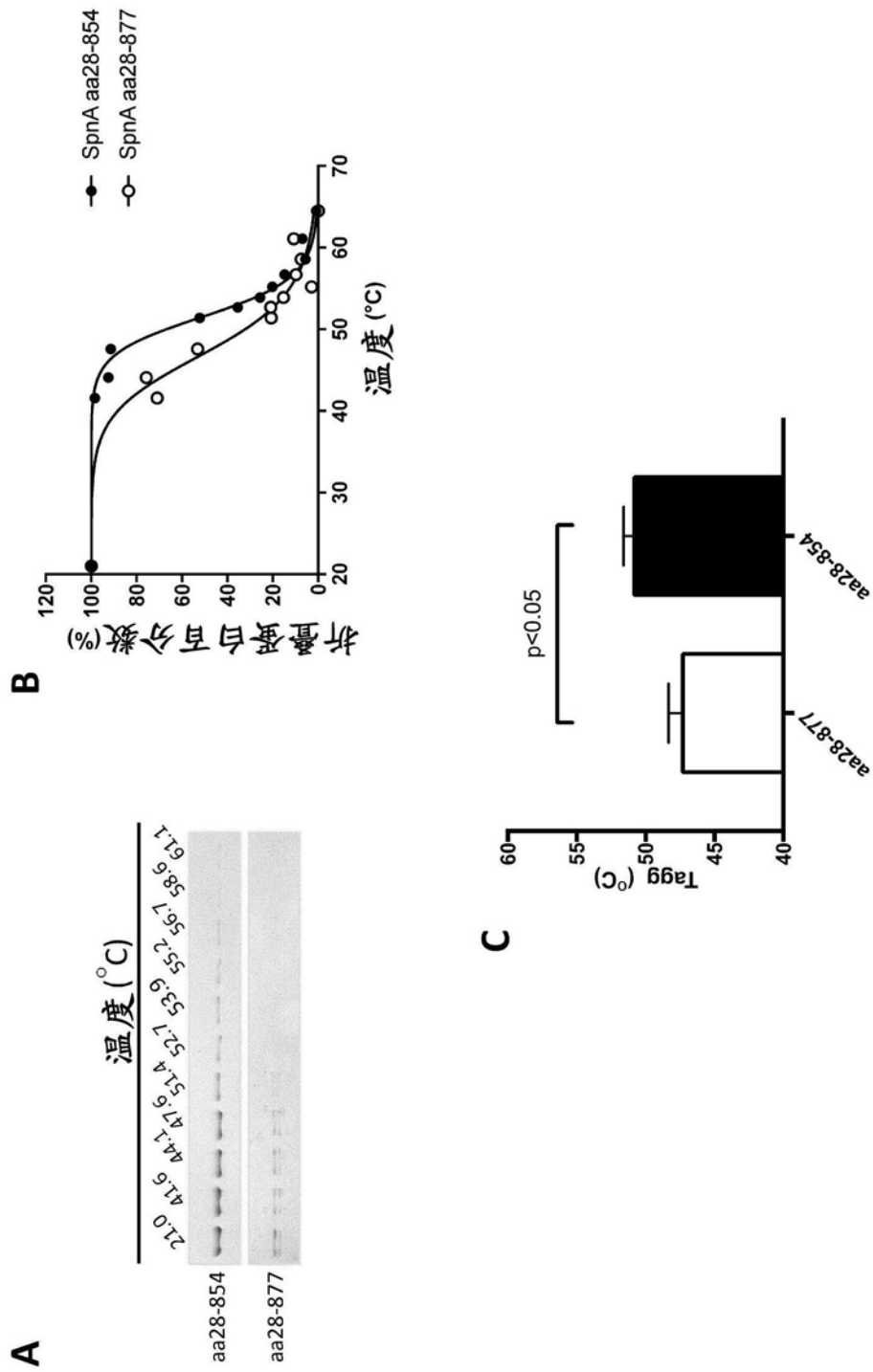


图14

专利名称(译)	分析和治疗方法和组合物及其用途		
公开(公告)号	CN110785662A	公开(公告)日	2020-02-11
申请号	CN201880042330.3	申请日	2018-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	奥克兰联合服务有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥克兰联合服务有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥克兰联合服务有限公司		
发明人	N·J·莫兰 P·G·扬 T·普罗夫特		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/195		
CPC分类号	C07K14/315 G01N33/56944 G01N2333/315 G01N2800/347		
代理人(译)	张莉		
优先权	731324 2017-04-26 NZ 736448 2017-10-16 NZ		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一般涉及用于在有需要的受试者中治疗、检测和辅助诊断化脓性链球菌感染、风湿热或链球菌感染后肾小球肾炎(PSGN)的组合物和方法，以及用于评估发展为风湿热或PSGN的倾向的组合物和方法。本发明还提供重组多肽，包括重组化脓性链球菌SpnA多肽，和包含该多肽的组合物用于本发明方法中的用途。

