



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.06

(21) Номер заявки
201691981

(22) Дата подачи заявки
2015.03.27

(51) Int. Cl. **A61K 39/35** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 17/06 (2006.01)

(54) УЛУЧШЕННЫЕ ТРАНСПОРТНЫЕ МОЛЕКУЛЫ МОДУЛЯРНОГО АНТИГЕНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **14162575.6**

(32) **2014.03.31**

(33) **EP**

(43) **2017.03.31**

(86) **PCT/EP2015/056670**

(87) **WO 2015/150243 2015.10.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ВЕТМЕДИКА ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Розе Хорст, Райхе Дания Бирте,
Таммен Харальд (DE)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) US-A1-2005281816
SENTI GABRIELA ET AL.: "Intralymphatic immunotherapy for cat allergy induces tolerance after only 3 injections", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 129, no. 5, 7 February 2012 (2012-02-07), pages 1290-1296, XP028421201, ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/J.JACI.2012.02.026

[retrieved on 2012-02-25] Abstract, the paragraph bridging p. 1290 to p. 1291, p. 1291 right-hand column first full paragraph, p. 1293 left-hand column 3rd full paragraph - p. 1294 right-hand column line 11, Fig. 1-4 and discussion

SCHAFFARTZIK A. ET AL.: "Equine insect bite hypersensitivity: What do we know?" VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 147, no. 3, 27 March 2012 (2012-03-27), pages 113-126, XP028509195, ISSN: 0165-2427, DOI: 10.1016/J.VETIMM.2012.03.017 [retrieved on 2012-04-03] Abstract, p. 118 left-hand column first full paragraph - p. 119 right-hand column last full paragraph and table 2

GADERMAIER G. ET AL.: "Targeting the cysteine-stabilized fold of Art v 1 for immunotherapy of Artemisia pollen allergy", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 47, no. 6, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 1292-1298, XP026920613, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2009.11.029 [retrieved on 2010-02-25] the whole document

WO-A1-2007065633

BERGEN VAN J. ET AL.: "GET INTO THE GROOVE! TARGETING ANTIGENS TO MHC CLASS II", IMMUNOLOGICAL REVIEWS, BLACKWELL PUBLISHING, MUNKSGAARD, vol. 172, 1 December 1999 (1999-12-01), pages 87-96, XP001145539, ISSN: 0105-2896, DOI: 10.1111/J.1600-065X.1999.TB01358.X the whole document

(57) Изобретение относится к (изолированным) рекомбинантным белкам, которые также называются улучшенными молекулами MAT (iMAT), включающим по крайней мере один транслокационный модуль, по крайней мере один нацеливающий модуль и по крайней мере один антигенный модуль, где по крайней мере один остаток цистеина является замещенным с помощью отличного аминокислотного остатка. Такие молекулы iMAT являются полезными, в частности, в качестве вакцин, например, для терапии и/или для профилактики аллергий и/или инфекционных заболеваний и/или для предотвращения передачи инфекционных заболеваний у лошадей. Настоящее изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, которые кодируют такие молекулы iMAT, соответствующим векторам и первичным клеткам и линиям клеток.

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к (изолированным) рекомбинантным белкам, которые также называются улучшенными МАТ (iMAT) молекулами, включающим по крайней мере один транслокационный модуль, по крайней мере один нацеливающий модуль и по крайней мере один антигенный модуль, где по крайней мере один остаток цистеина является замещенным с помощью отличного аминокислотного остатка. Молекулы iMAT могут быть получены с помощью существенно сниженных производственных усилий и являются специфическими для вида, безопасными и иммунологически весьма эффективными. Такие (изолированные) рекомбинантные белки являются полезными, в частности, в качестве вакцин, например, для терапии и/или для профилактики аллергий и/или инфекций и/или для профилактики передачи инфекций у лошадей.

Предпосылки создания изобретения

Процессинг антигенов с помощью антиген-презентирующих клеток (АПК) происходит двумя путями. Антигены, которые находятся внутри клетки, представляются МНС I (главный комплекс гистосовместимости класса I, МНС класса I) молекулами на поверхности клеток, в то время как внеклеточные антигены представляются МНС II (главный комплекс гистосовместимости класса II, МНС класса II) молекулами на поверхности клетки. Оба механизма инициируют иммунный ответ хозяина на антиген. Путь, который проходит антиген от момента поступления в клетку до презентации на клеточной поверхности в виде МНС II антигена, осуществляется с помощью различных органелл клетки, в частности, через эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, сеть транс-Гольджи, лизосомы, эндосомы и через компартменты МНС класса II (МПС). МПС играют важную роль в опосредованной МНС II презентации антигена. В этих органеллах клетки молекулы МНС II загружаются низкомолекулярными антигенами или протеолитическими фрагментами белков. В этом процессе инвариантная цепь (также называется МНС II гамма-цепью или Ii), которая первоначально является связанной с молекулой МНС II, подвергается протеолитической деградации, и антиген связывается с молекулой МНС II при регуляции различных белков, которые непосредственно или косвенно связываются с МНС II. Эти регуляторные молекулы в организме человека включают в себя, среди прочих, HLA-DM, HLA-DO, LAMP-1, LAMP-2, CD63, CD83 и др. Точная функция этих белков частично все еще является необъяснимой, но многие из них имеют сигнальные последовательности, которые способствуют их транспорту в лизосомы, эндосомы, в сеть транс-Гольджи, МПС и т.д. Ряд протеаз является вовлеченным в протеолитический процессинг, необходимый для того, чтобы антиген мог быть представлен на молекулах МНС II. Протеазы, которые присутствуют в МПС, включают, в частности, различных членов семейства катепсина, таких как, например, катепсин S и катепсин L. В отличных от человека видах гомологи молекулы МНС класса II имеют различные аминокислотные последовательности. У лошадей организация системы МНС является подобной таковой у людей с непрерывными участками класса I, III и II (Kelley J. и др., Immunogenetics 2005, 56:683-695).

Концепция обеспечения транспортного модуля модулярного антигена (МАТ) для модуляции иммунных реакций, связанных с ними конструкций, способа и их применения является раскрытой в WO 2004/035793 (эквивалентная заявка США US 2005/0281816). Этот документ описывает полезность молекулы МАТ, которая состоит из трех частей, для введения эпитопов антигенов в клетки, определяя, таким образом, иммунный ответ, который подвергается модуляции с помощью такой молекулы МАТ. В данном документе описываются различные транслокационные модули, нацеливающие модули, а также антигенные модули. Эта технология и лежащий в ее основе метод позволяют, во-первых, эффективно передавать антигены из внеклеточного пространства во внутриклеточное пространство клетки-мишени, и, во-вторых, обеспечивают возможность для антигенов после поступления их внутрь клетки эффективно достигать клеточных органелл для того, чтобы впоследствии подвергаться процессингу для презентации антигена. Как правило, этот двухэтапный процесс можно использовать для целенаправленной, эффективной модуляции иммунного ответа у субъекта. Использование МАТ молекул раскрывается, например, у Martínez-Gómez J.M. и др. [Allergy 2009, 64(1): 172-178]; Rose H. (Arb Paul Ehrlich Inst Bundesinstitut Impfstoffe Biomed Arzneim Langen Hess, 2009, 96, 319-327), а также позднее у Senti G. и др. [J. Allergy Clin. Immunol., 2012, 129(5): 1290-1296]. На основе технологии МАТ главный кошачий аллерген Fel d1 подвергали слиянию с транслокационным доменом белка, который имеет происхождение от ТАТ, и с укороченной инвариантной цепью человека для нацеливания на путь класса II МНС. Иммуногенность оценивали у мышей, в то время как потенциальные проблемы безопасности были оценены с помощью соответствующих тестов на основе реактивности базофилов, полученных от пациентов с аллергией на кошачью шерсть. Было продемонстрировано возможное применение этого модельного соединения. В данном источнике описывается, что ожидается, что молекулы МАТ являются более безопасными и более эффективными в отношении индукции желаемого иммунного ответа, а именно снижения чувствительности к антигенам, чем рекомбинантные аллергены или экстракты аллергенов при использовании традиционной специфической для аллергена иммунотерапии (SIT). В недавней публикации Senti G. и др. была описана внутрилимфатическая иммунотерапия для лечения аллергии на кошачью шерсть у людей, которая индуцировала толерантность после трех инъекций. В данном способе было описано первое клиническое исследование для человека при использовании МАТ - Fel d1, которое продемонстрировало безопасность и индукцию толерантности к аллергену после осуществления только трех внутрилимфатических

инъекций. Дополнительные источники уровня техники являются следующими.

Gadermaier G. и др. (Molecular Immunology 2010, 47: 1292-1298) описывает нацеливание стабилизированной цистеином складки Art v1 для иммунотерапии аллергии на пыльцу полыни. Авторы использовали подходы генной инженерии для нацеливания посттрансляционных модификаций Art v1 с целью создания гипоаллергенной молекулы: (i) дисульфидные мостики домена дефенсина были разорваны с помощью сайт-направленного мутагенеза, и (ii) полученные мутантные конструкции экспрессировали в *E.coli* для получения негликозилированных белков. Тем не менее, задача заключалась только в манипуляциях с трехмерной складкой домена дефенсина Art v1 для устранения IgE-связывания (т.е. создание гипоаллергенной молекулы) путем замены единичных остатков цистеина на серин при сохранении интактными (т.е. немодифицированными) эпитопов, которые распознаются Т-клетками (даже если таковые содержат остатки цистеина).

Доклад о работе третьего Havemeyer семинара по аллергическим заболеваниям лошадей (Hólar, Iceland, June 2007, Veterinary Immunology and Immunotherapy 2008, 126: 351-361) был сфокусирован на иммунологических и генетических аспектах гиперчувствительности к укусам насекомых (IBH) и рецидивирующей обструкции дыхательных путей (RAO). На этом семинаре обсуждались новые подходы для осуществления SIT против IBH, в частности использование вирусных векторов или вакцинации белками при использовании аллергенов, слитых с молекулами модулярных транслокационных антигенов (MAT).

В ежегодных отчетах SIAF 2010 и 2011 гг. Cramer R. сообщает о применении MAT технологии для вакцинации подверженных IBH лошадей.

Однако основные проблемы возникали при производстве и изготовлении MAT молекул, описанных в уровне техники. В частности, стандартные способы, используемые при разработке процесса выделения и очистки (DSP) при изготовлении MAT молекул с применением надлежащей существующей производственной практики (GMP), не могут быть применены. Не удалось очистить гомогенные молекулярные виды MAT молекулы, что, очевидно, связано с их аномальными физико-химическими свойствами.

Некоторые известные способы очистки не могут быть применены (см., пример 5 в данном описании) при использовании MAT молекул, описанной в предшествующем уровне техники, несмотря на то, что исследовали различные принципы разделения (например, гель-фильтрационная хроматография, ВЭЖХ с обратной фазой). Способы, применяемые для определения чистоты рекомбинантных белков, в целом включают хроматографическое разделение, например, ВЭЖХ с обратной фазой и электрофоретическое разделение (например, капиллярный электрофорез, зональный электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, SDS-ПАГЭ в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях). Кроме того, эти аналитические методы не могут быть использованы для MAT молекул без специфической для молекулы адаптации. Для оценки чистоты должна быть разработана адаптированная специфическая SDS-ПАГЭ процедура исследования. Такая процедура исследования включает приготовление образца с восстанавливающим агентом и додецилсульфатом лития (LDS) и нагревание до 75°C, что приводит к получению множественных, воспроизводимых четких полос после электрофоретического разделения. Окрашивание при использовании синего красителя Кумасси приводит к линейному количественному поведению (денситометрия) в гелях. С помощью моноклонального антитела, которое позволяет осуществлять обнаружение модуля аллергена в молекуле MAT, проявляли основную полосу и несколько слабых полос. Все полосы мигрировали воспроизводимым образом до того же положения, что и в исходном геле, также после повторной загрузки второго геля с вырезанными полосами первого геля. Удивительно, но во всех этих полосах с кажущейся более низкой и более высокой молекулярной массой MAT молекулы полной длины были идентифицированы путем вырезания полос из геля, их переваривания трипсином и последующего анализа с помощью масс-спектрометрии (наноЖХ/ЭРИ-МС-МС). Из этих экспериментов можно сделать вывод о нетипичном, аномальном поведении различных вариантов фолдинга MAT молекул в SDS-ПАГЭ ("гелевый сдвиг"). Кроме того, во всех партиях MAT молекул могут быть обнаружены многомерные формы белка, которые было трудно отделить от мономерных форм.

Например, для экономических аспектов, а также для нормативных требований, необходимо улучшить (i) процесс изготовления MAT молекул и (ii) их пригодность для стандартных аналитических способов определения чистоты. Кроме того, для адаптации MAT молекул к специфическим целевым видам, таким как лошади, требуется адаптация иммунологического нацеливания в рамках технологии MAT.

Кроме того, MAT молекулы легко используются при аллергиях, которые вызываются известным основным аллергеном (например, аллергии на кошачью шерсть у людей, вызываемые Fel d1). Тем не менее, является сложным использовать MAT молекулы предшествующего уровня техники в клинических условиях, таких как аллергии, при которых, например, как известно, участвуют различные не реагирующие перекрестно аллергены, но важность таких аллергенов для стимуляции аллергии неизвестна (т.е. основные аллергены не известны).

Задача, которая лежит в основе изобретения, представляет собой улучшенные MAT молекулы, которые являются полезными в качестве активных агентов в фармацевтической композиции, такой как вакцина, которая преодолевает проблемы, существующие в области техники.

Раскрытие изобретения

Краткое изложение сущности изобретения

В одном аспекте задача, которая лежит в основе изобретения, была неожиданно решена путем обеспечения (изолированного) рекомбинантного белка предпочтительно улучшенной молекулы МАТ (iMAT), включающей:

(i) по крайней мере один первый модуль, который имеет аминокислотную последовательность, которая позволяет осуществлять транслокацию молекулы iMAT из внеклеточного пространства внутрь клеток,

(ii) по крайней мере один второй модуль, который имеет аминокислотную последовательность, которая позволяет осуществлять специфическое для вида нацеливание молекулы iMAT на клеточные органеллы, которые являются вовлеченными в процессинг антигенов и/или загрузку МНС молекул антигенами, предпочтительно процессированными антигенами, и

(iii) по крайней мере один третий модуль в качестве антигенного модуля, который имеет аминокислотную последовательность, которая имеет происхождение по крайней мере от одного полного или частичного эпитопа, по крайней мере одного антигена, предпочтительно по крайней мере одного аллергена, который определяет специфичность иммунного ответа, модулируемого с помощью такой молекулы iMAT, которая характеризуется тем, что, по крайней мере, в антигенной(ых) модуле(ях) по крайней мере один остаток цистеина является замещенным с помощью отличного аминокислотного остатка, предпочтительно серина, лейцина, изолейцина и/или аспарагиновой кислоты.

Предпочтительным является, когда по крайней мере в одном антигенном модуле все остатки цистеина являются замещенными с помощью отличного аминокислотного остатка, предпочтительно серина, лейцина, изолейцина и/или аспарагиновой кислоты. Более предпочтительно, когда в полной молекуле iMAT все остатки цистеина являются замещенными с помощью отличного аминокислотного остатка, предпочтительно серина, лейцина, изолейцина и/или аспарагиновой кислоты.

Предпочтительно, когда не все остатки цистеина являются замещенными с помощью отличного аминокислотного остатка, предпочтительно серина, лейцина, изолейцина и/или аспарагиновой кислоты, и даже некоторое количество остатков цистеина остается в цельной молекуле iMAT.

Предпочтительным является, когда все такие модули являются ковалентно связанными друг с другом, необязательно с помощью дополнительного(ых) модуля(ей) между двумя или более соседними, необязательно, всеми из таких, как первый, второй и/или третий модули.

Более предпочтительно, когда все такие модули являются ковалентно связанными друг с другом и никакого(их) дополнительного(ых) спейсерного(ых) модуля(ей) не присутствует между двумя или более соседними модулями из таких, как первый, второй и/или третий модули, вообще.

В другом аспекте задача, которая лежит в основе изобретения, была неожиданно решена путем обеспечения вакцины, или иммуногенной композиции, или фармацевтической композиции, включающей (изолированный) рекомбинантный белок, как раскрыто или заявлено в данном изобретении.

В другом аспекте задача, которая лежит в основе изобретения, была неожиданно решена путем обеспечения (изолированного) рекомбинантного белка, как раскрыто или заявлено в данном изобретении, или вакцины, или иммуногенной композиции, или фармацевтической композиции, как раскрыто или заявлено в данном изобретении, для применения в способе профилактики и/или терапии одной или более аллергий у лошадей, предпочтительно гиперчувствительности на укус насекомого (IBH), крапивницы и/или рецидивирующей обструкции дыхательных путей (RAO). Соответствующие способы профилактики и/или лечения лошадей, которые в этом нуждаются, и применение для получения фармацевтической композиции/лекарственного средства для профилактики и/или лечения лошадей также предназначены, чтобы находиться в пределах объема настоящего изобретения.

В другом аспекте задача, которая лежит в основе изобретения, была неожиданно решена путем обеспечения (изолированного) рекомбинантного белка, как раскрыто или заявлено в данном изобретении, или вакцины, или иммуногенной композиции, или фармацевтической композиции, как раскрыто или заявлено в данном изобретении, для применения в способе профилактики и/или терапии одного или более инфекционных заболеваний у лошадей, и/или предотвращения передачи одного или более инфекционных заболеваний у лошадей, и/или предотвращения передачи одного или более инфекционных заболеваний у лошадей переносчиками, предпочтительно питающимися кровью мухами, мошками, клещами и/или комарами, более предпочтительно *Rhodococcus pneumonia*, удушения, африканской чумы лошадей, вируса лихорадки Западного Нила, дерматофитии и/или паразитов пищеварительного тракта и/или других органов и/или криптоспориоза, гельминтов и/или их препатентных этапов развития. Соответствующие способы профилактики и/или лечения лошадей, которые в этом нуждаются, и применение для получения фармацевтической композиции/лекарственного средства для профилактики и/или лечения лошадей также предназначены, чтобы находиться в пределах объема настоящего изобретения.

В дополнительном аспекте задача, которая лежит в основе изобретения, была неожиданно решена путем обеспечения нуклеиновой кислоты, которая кодирует (изолированный) рекомбинантный белок, как раскрыто или заявлено в данном изобретении.

В дополнительном аспекте задача, которая лежит в основе изобретения, была неожиданно решена

путем обеспечения вектора, включающего по крайней мере одну нуклеиновую кислоту, как раскрыто или заявлено в данном изобретении.

Еще в одном дополнительном аспекте задача, которая лежит в основе изобретения, была неожиданно решена путем обеспечения первичной клетки или линии клеток, включающей по крайней мере одну нуклеиновую кислоту, как раскрыто или заявлено в данном изобретении, и/или по крайней мере один вектор, как раскрыто или заявлено в данном изобретении.

Неожиданно было обнаружено, что молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением, как раскрыто или заявлено в данном изобретении, обладают физико-химическими и/или иммунологическими характеристиками, которые обеспечивают им преимущества по сравнению с МАТ молекулами в соответствии с уровнем техники.

(i) Замена по крайней мере одного остатка цистеина, предпочтительно всех остатков цистеина, с помощью отличного аминокислотного остатка в антигенном(ых) модуле(ях), предпочтительно цельной молекулы iMAT, которая является выбранной *in silico* так, чтобы не нарушать стабильность заключительной iMAT молекулы, обеспечивает молекулу iMAT в соответствии с настоящим изобретением, которая неожиданно является приемлемой для применения стандартных процедур очистки для биофармацевтических средств, а также для стандартных аналитических способов.

(ii) Предпочтительная непосредственная ковалентная связь модулей молекулы iMAT, т.е. первого транслокационного модуля, второго нацеливающего модуля и третьего антигенного модуля, без каких-либо дополнительных спейсерных модулей между указанными модулями, т.е. при полном отсутствии дополнительных спейсерных модулей между двумя или более соседними модулями, такими как первый, второй и/или третий модуль, осуществляет свой вклад в получение дополнительных к указанным в (i) улучшенных характеристик молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением: такие молекулы iMAT, которые считаются более жесткими в отношении трехмерной структуры и, следовательно, не способны образовывать конформационные эпитопы IgE, являются еще более гипоаллергенными - они практически не имеют аллергенности, которая может быть обнаружена, как показано в примере 2, приведенном в данной заявке.

(iii) Предпочтительное присутствие (n) (квази) N-терминальной His-метки приводит к получению молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением, которая может использоваться в качестве суррогатных маркеров для мониторинга иммунитета и/или длительности иммунитета, поскольку такой модуль метки, необязательно, вместе с одним или более соседними аминокислотными остатками из транслокационного модуля может использоваться для индукции специфического сигнала, который определяется иммунологически (например, антитело) у целевого субъекта, т.е. является специфическим для генерической структуры молекулы iMAT (см. пример 1 в данной заявке). Кроме того, присутствие такого модуля метки может быть использовано для разделения белков в образце, который включает молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением, например, при использовании цинк- или кобальт-заряженных твердых носителей и, следовательно, дополнительно повышает возможность получения молекул iMAT в соответствии с настоящим изобретением при отсутствии агрегации в процессе очистки.

(iv) По крайней мере один нацеливающий модуль в молекулах iMAT в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является специфическим для вида, т.е. в случае предполагаемого применения таких молекул iMAT к лошадям, выбирается лошадиный модуль нацеливания, например инвариантная цепь лошади. С помощью такого специфического для вида нацеливания могут быть успешно достигнуты оптимизированные характеристики молекул iMAT в соответствии с настоящим изобретением в отношении к связыванию молекул МНС класса II.

(v) По крайней мере один антигенный модуль в молекулах iMAT в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой аллерген. Таковой может быть получен из плесени (грибов и/или их спор), пыльцы, домашней пыли или амбарных клещей (и/или их фекалий), предпочтительно из пыльцы с деревьев, трав, травянистых растений, амброзии и/или пыльцы растений крестоцветных Brassicaceae и/или грибов и/или их спор из родов *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Eurotium*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Erysiphe/oidium*, *Fusarium*, *Lichtheimia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Periconia*, *Peronospora*, *Polythrincium*, *Saccharopolyspora* (ранее также назывались *Faenia* или *Micropolyspora*), *Thermoactinomyces*, *Stemphylium*, *Torula* и/или клещей (или их фекалий) рода *Acarus*, *Glycophagus*, *Tyrophagus*, *Dermatophagoides*. По крайней мере один антигенный модуль в молекулах iMAT в соответствии с настоящим изобретением более предпочтительно представляет собой аллерген *Culicoides*. Аллерген выбирается в соответствии со следующими критериями: когда основные аллергены, вызывающие аллергию у пациентов, являются неизвестными, то по крайней мере один антигенный модуль в молекулах iMAT в соответствии с настоящим изобретением может быть выбран с помощью биоинформационного подхода, как описано иллюстративно и подробно изложено в примерах 6 и 7 в данной заявке. Таким образом, могут быть получены улучшенные молекулы МАТ, которые могут быть использованы в качестве вакцин, в частности, например, для лечения и/или для профилактики аллергии у лошадей. По крайней мере один антигенный модуль в молекулах iMAT в соответствии с настоящим изобретением также может представлять собой антиген патогена, который принимает участие в одном или нескольких инфекционном(ых) заболевании(ях). Таковые могут иметь происхождение

ние от родов *Rhodococcus*, *Streptococcus*, *Orbivirus*, *Flavivirus*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Cryptosporidium* и/или *Strongylus*. По крайней мере один антигенный модуль в молекулах iMAT в соответствии с настоящим изобретением может также представлять собой антиген переносчика, который является вовлеченным в передачу одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий), например компоненты слюны *Culicoides*, *Culex* и/или *Ixodes*. Таким образом, могут быть получены улучшенные молекулы МАТ, которые могут быть использованы в качестве вакцин, например, для терапии и/или для профилактики и/или предотвращения передачи инфекционных заболеваний у лошадей.

В частности, настоящее изобретение обеспечивает (изолированные) рекомбинантные белки, которые демонстрируют улучшенную растворимость, которые являются легко пригодными для хроматографических методов разделения и которые демонстрируют улучшенную стабильность.

Кроме того, (изолированные) рекомбинантные белки в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно демонстрируют высокие активности и эффективности в индукции желаемых иммунологических эффектов, а именно преимущественное специфическое для вида модулирование иммунного ответа на аллергены у субъекта, предпочтительно у лошади. Например, с помощью этих способов становится возможным лечение и ослабление симптомов ИВН у пораженных животных семейства лошадиных.

Подробное описание изобретения

Перед тем как варианты осуществления в соответствии с настоящим изобретением будут описаны подробно, следует отметить, что, как используется в данной заявке и в приложенных пунктах формулы, сингулярные формы "какой-либо" и "данный" включают в себя ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют те же значения, которые обычно понятны среднему специалисту в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Все приведенные диапазоны и значения могут варьировать в пределах от 1 до 5%, если не указано иное, или иным образом не является известным специалисту в данной области техники, поэтому термин "приблизительно", как правило, опускается в описании и формуле изобретения. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящей заявке, могут быть использованы в практике или при испытании настоящего изобретения, предпочтительные способы, устройства и материалы будут описаны далее. Все публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в данную заявку в качестве ссылки с целью описания и раскрытия веществ, наполнителей, носителей и методик, как описано в публикациях, которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением. Ничто в данной заявке не должно быть истолковано как допущение того, что изобретение не имеет права датировать такое раскрытие задним числом на основании предшествующего изобретения.

Термины "изолированный рекомбинантный белок", "рекомбинантный белок" и/или "улучшенная молекула МАТ (iMAT)" используются попеременно в описании данного изобретения. Все они имеют идентичное значение.

Термин "модуль" в описании настоящего изобретения относится к специфической аминокислотной последовательности, например к части, блоку или фрагменту полипептида, обычно коротким аминокислотным/пептидным последовательностям, которые имеют определенную функцию.

Термин "первый модуль, который имеет аминокислотную последовательность, позволяющую осуществлять транслокацию (изолированного) рекомбинантного белка, предпочтительно улучшенной молекулы МАТ (iMAT), из внеклеточного пространства внутрь клеток" в данной заявке также взаимозаменяемо может быть сформулирован как "транслокационный модуль" или "последовательность транслокации", и в контексте настоящего изобретения относится к специфической аминокислотной последовательности, которая способствует транспорту молекулы переносчика, например аминокислотной последовательности, пептида, полипептида, белка и веществ других классов, таких как нуклеиновые кислоты или фармацевтически активные ингредиенты (API), внутрь клеток, в частности эукариотических клеток, более конкретно клеток, которые экспрессируют молекулы МНС класса II на своей поверхности и/или молекулы МНС класса I на своей поверхности, как является известным в литературе.

С помощью присутствия транслокационного модуля является возможным способствовать поступлению указанной молекулы переносчика в клетки.

Аминокислотные последовательности, полезные в качестве транслокационных модулей, описываются в уровне техники. Например, US 7653866 раскрывает несколько полезных последовательностей транслокации, включающих HIV-tat молекулу или белок VP22, который имеет происхождение от вируса простого герпеса. Этот принцип содействия поступлению данной целевой молекулы внутрь клеток описывается в ряде различных исследований в соответствующей патентной и непатентной литературе. Кроме того, приемлемые последовательности транслокации включают последовательности гомеопротейна, последовательности лейциновых застёжек или обогащенные лизином и обогащенные аргинином последовательности, а также различные другие последовательности белков или полипептидов, которые секретируются, несмотря на отсутствие сигнальной последовательности секреции. Особенно полезными являются вирусные пептидные последовательности, например белок активатора транскрипции HIV (HIV tat). Последовательность Tat или Tat пептид были описаны в уровне техники, включая их различные мо-

дификации. Все вариации, которые описаны в уровне техники для пептидных последовательностей Tat, являются в общем случае приемлемыми в качестве транслокационных модулей. Другие примеры включают VP22 пептид, а также пептиды Antennapedia (сложный локус, в котором локализованы гомеозисные мутации), имеющие происхождение от гомеотического белка антеннапедия *Drosophila*. Кроме того, могут использоваться другие гомеопротеины. Различные примеры приемлемых гомеопротеинов описываются в уровне техники. Кроме того, могут использоваться белки лейциновых застежек, подобные человеческому cFos-(139-164), или человеческому cJun-(252-279). Кроме того, обогащенные аргинином и/или обогащенные лизином пептиды являются приемлемыми в качестве транслокационных модулей, включая последовательности, подобные HIV-1 rev (34-50), или другие пептиды, которые имеют происхождение от вирусов или дрожжей. Конечно, пептиды, обогащенные полиаргинином и/или полилизином, могут быть получены синтетически. Указанные обогащенные полиаргинином и/или полилизином пептиды могут включать дополнительные аминокислоты. Предпочтительные примеры описываются в соответствующем уровне техники.

В предпочтительном варианте осуществления по крайней мере один транслокационный модуль включает (предпочтительно состоит из) аминокислотную последовательность, которая не состоит из полной белковой последовательности, как иллюстрируется выше, но вместо этого содержит минимальную последовательность, которая все еще остается функциональной, т.е. такой, которая является способной эффективно содействовать поступлению в клетки. Приемлемые минимальные последовательности, например, представляют собой аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1.

В другом предпочтительном варианте осуществления по крайней мере один транслокационный модуль включает (предпочтительно состоит из) HIV-tat, VP22 и/или Antennapedia или их частичные последовательности, при условии, что такой по крайней мере один транслокационный модуль является функциональным в качестве модуля для транслокации из внеклеточного пространства внутрь клеток.

Термин "второй модуль, который имеет аминокислотную последовательность, которая позволяет осуществлять видоспецифическое внутриклеточное нацеливание (изолированного) рекомбинантного белка предпочтительно улучшенной молекулы MAT (iMAT), на клеточные органеллы, которые являются вовлеченными в процессинг антигенов и/или загрузку МНС молекул антигенами, предпочтительно процессированными антигенами, в данной заявке также взаимозаменяемо называется "нацеливающим модулем" или "нацеливающей последовательностью", и в контексте настоящего изобретения относится к специфической аминокислотной последовательности, которая позволяет осуществлять/способствует внутриклеточному транспорту (изолированных) рекомбинантных белков, как раскрывается и заявлено в данной заявке, к таким клеточным органеллам, которые являются вовлеченными в процессинг антигенов и/или загрузку МНС молекул антигенами.

В частности, такие клеточные органеллы включают эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, сеть транс-Гольджи, лизосомы, эндосомы и компартменты МНС класса II. Такие внутриклеточные органеллы являются вовлеченными в такие процессы, как, например, транспорт и/или процессинг антигенов, получение и/или загрузка молекул МНС II антигенами или процессированными антигенами, и/или транспорт молекул МНС II, нагруженных такими антигенами, на свою поверхность.

Ряд последовательностей является известным в уровне техники. Примечательный пример полезных нацеливающих последовательностей включает инвариантную цепь молекулы МНС класса II, которая также является известной как Ii инвариантная цепь или МНС II гамма-цепь. Различные варианты инвариантной цепи описываются в патентной и непатентной литературе.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения инвариантная цепь является выбранной из видов, у которых иммунный ответ должен подвергаться модулированию, и/или из видов, у которых молекула iMAT должна быть нацеленной на внутриклеточное пространство.

Например, для семейства лошадиных, таких как лошади, предпочтительная инвариантная цепь является выбранной из лошадиной инвариантной цепи, включающей, предпочтительно состоящей из, аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2 или ее фрагмент, при условии, что фрагменты поддерживают ее функцию транспорта внутрь клетки. Такие предпочтительные фрагменты представляют собой аминокислотные последовательности в соответствии с SEQ ID NOS: 15 и/или 16.

Другие приемлемые примеры для нацеливания последовательностей включают лизосомальные мембранные белки, которые включают последовательности, приемлемые в качестве нацеливающих модулей. Существует ряд мембранных белков, которые образуются в лизосомах и имеют последовательности мотивов, которые позволяют осуществлять нацеливание на лизосому. Эти группы белков включают, среди прочих, lamp 1, lamp 2, lamp 3, limp II и lap. Кроме того, белки тетраспина являются известными в уровне техники в качестве нацеливающих модулей. Дополнительные белки можно обнаружить в эндо-сомальных/лизосомальных компартментах, эти белки демонстрируют свойства нацеливания. Специалист в данной области техники знает, как определить приемлемые нацеливающие последовательности соответственно.

В другом предпочтительном варианте осуществления по крайней мере один нацеливающий модуль включает, предпочтительно состоит из, инвариантную цепь лошади, и предпочтительно состоит из одной или более из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, 15, 16.

Термин "третий модуль в качестве антигенного модуля, который имеет аминокислотную последовательность, которая имеет происхождение по крайней мере от одного полного или частичного эпитопа, по крайней мере одного антигена, предпочтительно по крайней мере одного аллергена, определяющего специфичность иммунного ответа, модулируемого с помощью такого (изолированного) рекомбинантного белка, предпочтительно улучшенной молекулы МАТ (iMAT) (у субъекта, предпочтительно представителя семейства лошадиных)", который в данной заявке также взаимозаменяемо упоминается как "антигенный модуль" или "антигенная последовательность", в контексте настоящего изобретения относится к специфической аминокислотной последовательности, которая позволяет модулировать иммунный ответ против эпитопа/антигена и определяет специфичность иммунного ответа у субъекта, предпочтительно у лошади.

В этом контексте такой(ие) антигенный(ые) модуль(и) включает(ют) по крайней мере один остаток цистеина, который является замещенным с помощью отличного аминокислотного остатка, предпочтительно серина, лейцина, изолейцина и/или аспарагиновой кислоты. Таким образом, иммунный ответ отличается от иммунного ответа субъекта, предпочтительно лошади, который подвергается воздействию при использовании неизменной аминокислотной последовательности антигена.

Не существует никаких ограничений, связанных с антигенами на основе данного способа. Этот способ может быть использован, например, для активации иммунной системы субъекта против патогенных микроорганизмов, таких как, например, вирусы, бактерии, грибы, паразиты, простейшие и т.д., т.е. в самом общем виде, в качестве вакцины. Кроме того, этот способ может быть использован не только непосредственно против таких патогенных микроорганизмов, но и для активации иммунной системы хозяина для предотвращения передачи трансмиссивных заболеваний, включающих заболевания, которые вызываются вирусами, бактериями, грибами, паразитами, простейшими и т.д. Кроме того, этот способ может использоваться для активации иммунной системы против дегенеративных клеток, таких как, например, опухолевые клетки и т.д. Тем не менее, он также может быть использован, с другой стороны, для десенсибилизации иммунной системы субъекта против аллергенов, таких как, например, пищевые аллергены, аллергены из плесени (грибов и/или их спор), пыльцы, шерсти животных, домашней пыли или амбарных клещей (и/или их фекалий), токсинов насекомых и т.д., или для целенаправленного подавления иммунной системы, например, если присутствуют аутоиммунные реакции, такие как, например, артрит, ревматизм, диабет, СКВ (системная красная волчанка) и т.д., а также для подавления реакций отторжения трансплантата. Дополнительные расстройства, которые не были упомянуты и которые являются связанными с иммунной реакцией, которая является слишком сильной или слишком слабой, точно так же можно лечить с помощью молекул iMAT, как раскрыто и заявлено в данной заявке.

Является возможным использовать в качестве антигенных модулей для целей настоящего изобретения, в принципе, все типы антигенов, способных модулировать иммунный ответ. Как антигены, которые в настоящее время являются известными, так и антигены, которые будут обнаружены в будущем, являются приемлемыми. В некоторых случаях антигены могут быть также такими, которые не приводят к иммунному ответу при использовании обычных способов иммунизации, известных в данной области техники в настоящее время, но которые при использовании нового способа, описанного в настоящем изобретении, приводят к иммунному ответу у субъекта. Кроме того, термин "антиген" включает антигенные фрагменты, содержащие антигенную детерминанту/антигенные детерминанты, который(ые) также является(ются) известным(и) как эпитоп(ы). Таким образом, антигенный модуль представляет собой всю молекулу, например белок, или представляет собой часть молекулы, т.е. ее фрагмент, такой как пептид, охватывающий по крайней мере одну антигенную детерминанту или эпитоп. По крайней мере одна антигенная детерминанта или эпитоп способны вызывать иммунный ответ, направленный против антигена. Эпитоп может содержать одну или более чем одну аминокислоту или пептид или другую структуру, способную вызывать иммунный ответ, такую как структуры сахаров, фосфорилированных аминокислот и т.д., или их комбинации. Антиген может представлять собой детерминанту непрерывного типа (т.е. такой, который не зависит от конформации, например, представлен в нативных и денатурированных белках) или детерминанту прерывистого типа (т.е. такой, который зависит от конформации, например, представлен только в нативной, свернутой форме, но не присутствует в денатурированных белках). Можно использовать не только белки и пептиды, но и структуры сахаров, липидов, например липополисахариды, липотейхоевые кислоты и другие компоненты бактериальных мембран (CD1b, например, связывает структуры сахаров и липиды), нуклеиновые кислоты, такие как, например, ДНК, содержащие мотивы CpG, различные органические вещества, такие как, например, латекс или фармацевтически активные вещества, такие как антиген, для целей настоящего изобретения. Антиген может быть получен из всех возможных жизненных форм, таких как, например, люди, животные, растения, грибы, паразиты, одноклеточные или многоклеточные микроорганизмы, вирусы и другие формы жизни. Антигены могут быть выделены из биологического материала, могут быть получены в виде рекомбинантных антигенов или получены путем синтеза, например путем пептидного синтеза. Синтетически полученные антигены могут представлять собой вещества, которые встречаются в природе, или те, которые не встречаются в природе, но могут быть получены путем химического синтеза. Примеры веществ, которые не встречаются в природе, но которые, однако, пригодны в качестве антигена при некоторых обстоятельствах, напри-

мер синтетически полученные вещества, которые присутствуют в лекарственных средствах, или синтетические пептиды, включающие аминокислотные последовательности, которые не встречаются в природе, или пептидомиметики и т.д. Встречающиеся в природе, или синтетические, или рекомбинантные антигены могут быть модифицированы с помощью молекулярной биологии, ферментативных, химических и/или других способов для того, чтобы придать им свойства, которые являются более выгодными для конкретного варианта применения. Эти полезные свойства, в частности, могут представлять собой большую или меньшую активность в качестве антигена, более широкое или более специфическое действие в качестве антигена, лучшую растворимость в гидрофильных или гидрофобных растворителях, большую способность к проникновению антигенных модулей для клеточных мембран, для мембран органелл, для гематоэнцефалического барьера и т.д., более высокий или более низкий период полураспада *in vivo* или *in vitro*, более низкую или более высокую токсичность, лучшую способность к выявлению антигена *in vivo* или *in vitro* после применения антигена в виде молекулы iMAT и т.д. Кроме того, для целей настоящего изобретения является возможным объединить множество антигенов в одном модуле антигена. Для этого является возможным для идентичных антигенов присутствовать в количестве более чем одна копия в антигенном модуле, или является возможным, например, для различных вариантов одного и того же антигена, чтобы они были объединены в антигенном модуле. Комбинация антигенов, например антигена 1, и других антигенов, например антигена 2, в антигенном модуле также является возможной и т.д. Дополнительные комбинации, такие как, например, антиген 1 в количестве более чем одна копия, и антигена 2 в единственном количестве, также могут быть объединены в антигенном модуле и т.д. Также дополнительно является возможным для одного или нескольких различных и/или одного или более одинаковых антигенных модулей присутствовать в молекуле iMAT. Является возможным, в принципе, для всех возможных комбинаций одного или множества, чтобы присутствовали идентичные или измененные копии антигенов, которые имеют происхождение от одного или более различных антигенов, которые будут объединены для целей настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте реализации антигенный модуль включает по крайней мере один полный или частичный эпитоп, который имеет происхождение по крайней мере от одного антигена, где такой антиген представляет собой аллерген. По крайней мере один эпитоп может вызывать иммунный ответ против аллергена, в соответствии с чем эпитоп может содержать одну или более чем одну структуру, например пептид, способный вызвать иммунный ответ. Эпитоп может представлять собой непрерывный эпитоп или прерывистый эпитоп аллергена. Эпитопы предпочтительно могут состоять по крайней мере из восьми аминокислот в длину, предпочтительно по крайней мере десяти аминокислот в длину, более предпочтительно по крайней мере 13 аминокислот в длину. Антигенный модуль включает по крайней мере один полный или частичный эпитоп, а также может содержать два или более полных или частичных эпитопа, которые могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Кроме того, антигенный модуль может включать дополнительные аминокислотные последовательности, примыкающие по крайней мере к одному полному или частичному эпитопу. Эпитоп может представлять собой существующий в природе эпитоп или может быть модифицированным эпитопом, который либо модифицирован в своей аминокислотной последовательности, либо при использовании одной или более посттрансляционных модификаций.

В одном варианте реализации по крайней мере один третий антигенный модуль включает по крайней мере один полный или частичный эпитоп, который имеет происхождение по крайней мере от одного антигена патогена, вовлеченного в одно или более инфекционное(ые) заболевание(я). Таковой может иметь происхождение от родов *Rhodococcus*, *Streptococcus*, *Orbivirus*, *Flavivirus*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Cryptosporidium* и/или *Strongylus*. По крайней мере один антигенный модуль в молекулах iMAT в соответствии с настоящим изобретением может также представлять собой антиген переносчика, который является вовлеченным в передачу одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий), например компоненты слюны *Culicoides*, *Culex* и/или *Ixodes*.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления по крайней мере один третий антигенный модуль включает по крайней мере один полный или частичный эпитоп, который имеет происхождение от, по крайней мере, одного аллергена, который вызывает одну или более аллергию(ий) у лошадей. Такой может представлять собой по крайней мере один полный или частичный эпитоп по крайней мере одного аллергена, который имеет происхождение от плесени (грибов и/или их спор), пыльцы, домашней пыли или амбарных клещей (и/или их фекалий), предпочтительно от пыльцы деревьев, трав, травянистых растений, амброзии и/или пыльцы растений крестоцветных *Brassicaceae* и/или грибов и/или их спор из родов *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Eurotium*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Erysiphe/oidium*, *Fusarium*, *Lichtheimia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Periconia*, *Peronospora*, *Polythrincium*, *Saccharopolyspora* (ранее также назывались *Faenia* или *Micropolyspora*), *Thermoactinomyces*, *Stemphylium*, *Torula* и/или клещей (или их фекалий) рода *Acarus*, *Glycophagus*, *Tyrophagus*, *Dermatophagoides*.

В предпочтительном варианте осуществления такой предпочтительно представляет собой по крайней мере один полный или частичный эпитоп по крайней мере одного аллергена, который имеет происхождение от насекомых, которые питаются кровью, более предпочтительно от рода *Culicoides*.

Примеры аллергенов рода *Culicoides* являются представленными на фиг. 1, которая идентифицирует виды, аллерген и номер доступа UniProt (обновление базы данных UniProt 2013_09).

В дополнительном предпочтительном варианте реализации такой по крайней мере один аллерген представляет собой Cul n4, Cul o1, Cul o2, Cul o3, Cul o4 и/или Cul o7 аллерген. Предпочтительные специфические последовательности антигенных модулей представляют собой аминокислотные последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 18, 19.

Термин "иммунный ответ, который модулируется путем (...)" или, взаимозаменяемо, "иммуномодуляторный иммунный ответ" в связи с "(изолированным) рекомбинантным белком" и/или "молекулой iMAT" в контексте настоящего изобретения относится к иммуногенным и/или толерогенным иммунным ответам.

Термин "аллерген" в контексте настоящего изобретения относится к типу антигена, который относится к типу антигена, который в нативной форме вызывает слишком энергичный иммунный ответ, при котором иммунная система отбивает все выявленные угрозы, которые иначе были бы безвредны для субъекта. Как правило, эти виды реакций приводят к фенотипу, известному как аллергия. Различные типы аллергенов являются описанными в предшествующем уровне техники, включая пищевые продукты, лекарственные препараты, продукты животного происхождения, природные или синтетические материалы. Предпочтительно белок считается аллергеном в том случае, когда он вызывает в нативной форме специфический IgE ответ по крайней мере у пяти субъектов, предпочтительно лошадей. Во избежание сомнения, "аллерген" в связи с "по крайней мере одним третьим антигенным модулем, включающим по крайней мере один полный или частичный эпитоп, который имеет происхождение по крайней мере от одного аллергена" уже не нуждается в том, чтобы находиться в нативной форме, которая также является предпочтительной, другими словами, термин "аллерген" в контексте настоящего изобретения также явным образом относится к ненативным аминокислотным последовательностям в составе молекул iMAT, как описано и заявлено в данной заявке, и которые уже не вызывают специфического IgE ответа по крайней мере у пяти субъектов, предпочтительно лошадей.

Термин "эпитоп", который в данной заявке также взаимозаменяемо упоминается как "антигенная детерминанта", в контексте настоящего изобретения относится к части антигена, которая распознается иммунной системой, либо В-клетками, либо Т-клетками. Эпитопы являются представленными на поверхности антигенпрезентирующих клеток с помощью молекул МНС, с которыми они являются связанными.

Термин "субъект", который в данной заявке также взаимозаменяемо упоминается как "индивидуум" и/или "организм", в контексте настоящего изобретения предпочтительно относится к лошадям.

Термин "лошадиные", который в данной заявке также взаимозаменяемо упоминается как "лошадь", в контексте настоящего изобретения включает в себя любого члена рода *Equus*. Он охватывает, например, любую лошадь, пони и/или осла, таксономические обозначения *Equus ferus* и/или *Equus caballus*, и/или подвиды *Equus ferus caballus*. Лошадиные, например, могут представлять собой домашнюю лошадь.

Термины "пептид" и "белок" используются как эквиваленты в контексте настоящего изобретения. Пептид или белок для целей настоящего изобретения означает ковалентное соединение по крайней мере двух аминокислот посредством пептидной связи. Термин "аминокислота" и термин "аминокислотный остаток" используются в качестве эквивалентов в настоящей заявке, т.е. смысл этих двух терминов одинаковый. Термины аминокислота/аминокислотный остаток и пептид/белок используются в настоящей заявке в форме максимально широкого определения.

В связи с этим термин "рекомбинантный белок" относится к полипептиду, который может быть получен с помощью генной инженерии и путем экспрессии в эукариотических или прокариотических системах. Кроме того, указанный термин охватывает полипептиды, полученные искусственным путем (например, с помощью твердофазного синтеза).

Как используется в данной заявке, термин "отличный аминокислотный остаток" относится к известному аминокислотному остатку, кроме цистеина, если не указано иное. Например, указанный остаток аминокислоты может представлять собой природный аминокислотный остаток, такой как серин или изолейцин.

Как используется в данной заявке, термин "линейная форма" относится к белкам в соответствии с настоящим изобретением, у которых отсутствует вторичная структура. Такие белки часто предполагаются как такие, которые обладают неупорядоченной конформацией, в которой единственная закрепленная взаимосвязь представляет собой соединение смежных аминокислотных остатков посредством пептидной связи.

В предпочтительном варианте осуществления (изолированный) рекомбинантный белок, как раскрыто или заявлено в данной заявке, присутствует в мономерной форме и/или линейной форме.

Как используется в данной заявке, термин "лечение" относится к введению (изолированного) рекомбинантного белка, как раскрывается и заявлено в данной заявке, и/или соответствующих вакцин и/или иммуногенных композиций, и/или фармацевтических композиций для того, чтобы получить желательные клинические результаты, включая профилактическое и/или терапевтическое лечение.

Как используется в данной заявке, термин "иммунотерапия" относится к терапевтическому и/или профилактическому лечению субъекта, например, путем профилактической и/или терапевтической вакцинации.

Как используется в данной заявке, термин "переносчик" в связи с "передачей одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий)" относится к живому организму и в данной заявке попеременно используется с термином "биологический переносчик", "биологический носитель" и/или "носитель заболевания", таким как мухи, мошки, клещи и/или комары, которые питаются кровью.

Кроме того, является возможным и предпочтительным, чтобы (изолированный) рекомбинантный белок, как описано и заявлено в данном изобретении, дополнительно содержал по крайней мере один tag модуль. То есть является возможным и предпочтительным, чтобы один или несколько различных и/или идентичных tag модулей являлись частью (изолированного) рекомбинантного белка, как описано и заявлено в данной заявке. Tag модули могут представлять собой короткие пептиды, которые часто включают вплоть до 20 аминокислот или функциональных групп, которые не состоят из аминокислот, такие как, например, биотин или дигоксигенин. Приемлемые tag модули включают в себя хорошо известную и предпочтительную His-метку, содержащую последовательность гистидина в количестве от 4 до 12, или более предпочтительно непосредственно соседние остатки гистидина, предпочтительно 5, 6 или 7 последовательных остатков гистидина. Другие приемлемые модули включают в себя HA-метку, FLAG-метку, GST-метку или Strep-метку. Несмотря на то, что метка может присутствовать в любом месте (изолированного) рекомбинантного белка, как описано и заявлено в данной заявке, в предпочтительном варианте осуществления модуль метки присутствует на N-терминальном конце и/или на C-терминальном конце (изолированного) рекомбинантного белка.

Модули метки являются полезными для изоляции (изолированных) рекомбинантных белков, как описано и заявлено в данной заявке, и дополнительно позволяют обнаруживать присутствие таких (изолированных) рекомбинантных белков *in vitro* или *in vivo*. Кроме того, модуль метки, необязательно, вместе с одним или несколькими соседними аминокислотными остатками из соседнего модуля, или линкер, который разделяет друг от друга различные модули, может быть использован для того, чтобы индуцировать специфический иммунологически определяемый сигнал (например, антитело) у субъекта, представляющего интерес, который может быть использован в качестве суррогатного маркера иммунитета и/или длительности иммунитета. Иммунотерапии при использовании (изолированных) рекомбинантных белков, как описано и заявлено в данной заявке, вызывает специфический для антигена, предпочтительно специфический для аллергена, иммунный ответ у исследуемых субъектов, который является качественно неотличимым от естественного иммунного ответа после воздействия существующих в природе антигенов, предпочтительно аллергенов. Таким образом, антитела, связывающиеся с антигенным модулем, являются непригодными в качестве суррогатного маркера эффективности индуцированного молекулой iMAT иммунного модулирующего эффекта. Это препятствие может быть устранено путем определения уникального специфического для антигена иммунологического сигнала, полученного с помощью C-терминального и/или N-терминального модуля метки необязательно вместе с соседними аминокислотными остатками. Следовательно, является возможным обеспечить подходящие суррогатные маркеры.

В предпочтительном варианте реализации (изолированный) рекомбинантный белок, как раскрывается и заявлено в данной заявке, дополнительно включает по крайней мере один модуль метки, предпочтительно по крайней мере одну His-метку, где такой по крайней мере один модуль метки предпочтительно представляет собой N-терминальный и/или C-терминальный конец (изолированного) рекомбинантного белка, более предпочтительно N-терминальный конец после одного остатка метионина.

Кроме того, модули (изолированного) рекомбинантного белка, как раскрывается и заявлено в данной заявке, в частности, по крайней мере один транслокационный модуль, по крайней мере один нацеливающий модуль и по крайней мере один антигенный модуль могут необязательно быть разделены одним или более спейсерными модулями, расположенными по крайней мере между двумя такими модулями.

Спейсерные модули могут представлять собой, в частности, пептидные последовательности или органические молекулы. Многочисленные спейсерные молекулы, которые могут быть использованы для целей данного изобретения, являются известными в области техники. Кроме того, также является возможным использовать для целей данного изобретения спейсерные молекулы, которые могут быть усовершенствованы или раскрыты в будущем. Приемлемые спейсерные модули представляют собой, среди прочих, пептидные спейсеры, поперечно-сшивающие агенты, природные или синтетические полимеры, такие как, например, нуклеиновые кислоты, замещенные или незамещенные углеводороды и подобные им.

Соединение может осуществляться как за счет ковалентных (предпочтительно), так и нековалентных связей. Спейсерные модули имеют задачу, в частности, разделения различных модулей (изолированного) рекомбинантного белка, как описано и заявлено в данной заявке, друг от друга в пространстве таким образом, что они не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга с точки зрения их функциональных возможностей. Модули (изолированного) рекомбинантного белка для целей настоящего изобретения могут быть соединены одним или несколькими спейсерными модулями, которые могут подвергаться расщеплению с помощью химических и/или ферментативных реакций, например протеаза-

ми. Таким образом, можно разделить модули (изолированного) рекомбинантного белка, как описано и заявлено в данном изобретении, которые соединены спейсерными модулями, друг от друга, по мере необходимости.

Однако в предпочтительном варианте реализации, в частности, когда антигенный модуль представляет собой аминокислотную последовательность, которая имеет происхождение по крайней мере от одного полного или частичного эпитопа, по крайней мере одного антигена, который представляет собой по крайней мере один аллерген, никаких таких дополнительных спейсерных модулей, т.е. никаких модулей между двумя или более соседними модулями такого первого, второго и/или третьего модулей не присутствует вообще.

Любое желательное изменение размещения индивидуальных модулей (изолированного) рекомбинантного белка, как раскрывается и заявлено в данной заявке, является в общем случае возможным. Каждый модуль может присутствовать один или более раз в (изолированном) рекомбинантном белке. Минимальное требование представляет собой присутствие по крайней мере одного транслокационного модуля, по крайней мере одного нацеливающего модуля и по крайней мере одного антигенного модуля. Дополнительные модули, такие как модули метки, спейсерные модули и т.д., могут факультативно присутствовать, но это не является обязательным. Все модули могут присутствовать один или несколько раз в (изолированном) рекомбинантном белке, как раскрывается и заявлено в данной заявке. Если модули присутствуют более чем один раз, то они могут присутствовать в виде идентичных копий или в виде различных версий модуля в каждом случае в единственном экземпляре или более чем в одном экземпляре. Также является возможным для совершенно разных модулей одного и того же класса модулей, например модуля His-метки и модуля биотиновой метки, присутствовать в (изолированном) рекомбинантном белке, как раскрывается и заявлено в данной заявке. Оба модуля функционально осуществляют одну и ту же задачу (модуль метки) в (изолированном) рекомбинантном белке, но не должны иметь ничего общего с точки зрения их молекулярной структуры.

В предпочтительном варианте реализации является возможным, чтобы две или более копий одного из модулей являлись присутствующими в (изолированном) рекомбинантном белке, как раскрывается и заявлено в данной заявке. То есть могут присутствовать две или более копий идентичных или различных антигенных модулей. В качестве альтернативы (изолированный) рекомбинантный белок может содержать два различных антигенных модуля для модулирования иммунного ответа у субъекта.

Две или более идентичные копии антигенного модуля в рекомбинантном белке могут, например, вызывать улучшенный иммунный ответ на такой релевантный антиген. Два или более различных антигенных модуля могут, например, соединяться в один (изолированный) рекомбинантный белок для того, чтобы модулировать одновременно иммунный ответ на два или более различных антигена. Два или более различных транслокационных модулей могут использоваться в (изолированном) рекомбинантном белке, как раскрывается и заявлено в данной заявке. Например, Tat последовательность и VP22 последовательность могут служить для того, чтобы сделать транслокацию более эффективной, поскольку транслокация (изолированного) рекомбинантного белка потом осуществляется эффективно в более широком спектре различных типов клеток или типов тканей. Также является возможным, например, использовать два или более модулей метки в одном (изолированном) рекомбинантном белке, например, His-метку и FLAG-метку, в соответствии с этим, например His-метка используется для рекомбинантного белка, а, например, FLAG-метка служит для определения (изолированного) рекомбинантного белка. Является возможным также использовать два или более различных модулей в одном (изолированном) рекомбинантном белке, например последовательность из инвариантной цепи молекулы МНС II и дополнительный нацеливающий модуль группы манноза 6-фосфата. Например, инвариантная цепь действует в качестве нацеливающего модуля на МНС, а группа маннозы 6-фосфата опосредует нацеливание на липосому. Таким образом, является возможным повышать эффективность презентации антигена или ряда различных эпитопов антигена, презентируемого с помощью антиген-презентирующих клеток в целом. Кроме того, молекула iMAT в соответствии с настоящим изобретением может охватывать две или более различных инвариантных цепей, которые имеют происхождение от идентичных или различных видов, позволяя, таким образом, использовать белки в соответствии с настоящим изобретением у различных видов.

Положение отдельных модулей в (изолированных) рекомбинантных белках, как раскрывается и заявлено в данной заявке, также можно варьировать по желанию, до тех пор, пока присутствуют по крайней мере один транслокационный модуль, по крайней мере один нацеливающий модуль и по крайней мере один антигенный модуль. Также возможно для всех или некоторых из модулей в (изолированном) рекомбинантном белке, например, присутствовать не в виде линейного последовательного расположения модулей, а в виде круговой или разветвленной структуры модуля, либо в форме дендримеров, либо в виде комбинации линейной и/или разветвленной и/или круговой и/или дендритной части молекулы. Существуют ряд коммерческих поставщиков экспрессионных векторов, поставляющих специфические векторы, которые делают возможным получение круговых слитых белков с помощью таких механизмов, как, например, IMPACT™-TWIN система от New England Biolabs, Beverly, MA, США. Разветвленные модули могут быть получены путем синтеза, например, пептидов, в которых, начиная от поли-L-лизина

новый остаток лизина присоединен к каждой свободной аминогруппе каждого из последующих остатков лизина. Таким образом, можно создать пептидную структуру с практически любой степенью разветвленности. Впоследствии является возможным синтезировать, например, транслокационные модули и/или нацеливающие модули на разветвленной основной структуре пептида. Дополнительные модули также могут быть соединены на линейной, круговой или разветвленной основной структуре пептида путем лигирования белка. Кроме того, можно ввести группы биотина, например, в пептид основной структуры в процессе синтеза пептида, а модули затем могут быть присоединены к этим группам биотина с помощью, например, стрептавидина, системы Strep метки или с помощью системы PinPoint™ (соответственно, IBA GmbH, Göttingen, Германия и Promega Biosciences Inc., San Louis Obispo, CA, США). Модули, присоединенные таким путем, затем соединяются с помощью нековалентных связей с основной структурой пептида.

В предпочтительном варианте реализации (изолированный) рекомбинантный белок, как раскрывается и заявлено в данной заявке, включает, предпочтительно состоит из, одну или более аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NOS: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23.

(Изолированные) рекомбинантные белки, как раскрывается и заявлено в данной заявке, являются особенно полезными в способе, который, в частности, относится к терапии и/или профилактике у лошадей, страдающих от гиперчувствительности к укусам насекомых (IBN) и/или крапивницы.

Гиперчувствительность на укус насекомого может быть вызвана в ином случае безвредной слюной насекомого, ядом, частями тела, выделениями или секретами, которые вызывают системные реакции у субъектов. На самом деле, IBN представляет собой аллергическое заболевание кожи лошадей, которое вызывает страдание у лошадей и проявляется как хронический рецидивирующий сезонный аллергический дерматит, который часто вызывается укусами насекомых рода *Culicoides*, которые встречаются в различных районах земного шара. Сообщается о распространении IBN по всему миру с различными наименованиями, такими как дерматоз Свита, летний зуд, летняя экзема, дерматит Кассена, дерматит Квинсленда, сезонный дерматит или гиперчувствительность к *Culicoides*. Подверженные заболеванию субъекты чешутся и находятся в состоянии тревоги, а также интенсивно чешут и кусают себя. Типичным клиническим признаком является зуд, образование волдырей на месте укуса насекомого, которые могут мокнуть, вызывать образование струпьев, корки и отшелушивание кожи. Продолжительное расчесывание и покусывание приводят, в частности, к выпадению шерсти и повреждению кожи, иногда с кровотечением открытых ран. Иногда может возникать вторичная бактериальная инфекция. Кроме того, не является редкостью для лошадей вычесывание их гривы и верхней части хвоста. В долгосрочной перспективе может произойти утолщение кожи и потеря пигментации волос. Наиболее часто поражаются грива и хвост; тем не менее, лошади с тяжелыми признаками могут иметь повреждения на больших площадях всего тела. Диагностика основывается на клиническом исследовании и типичных, сезонно возникающих симптомах.

Мало что известно о патофизиологии IBN у лошадей. Как предполагается, у этих животных существуют значительные отличия аллергии с проявлениями в коже по сравнению с другими видами. Таким образом, и их ответ на лечение отличается, например, антагонисты рецепторов гистамина не в состоянии улучшить клинические симптомы (Olsen и др. *Vet. J.* 2011, 187: 347-351). Также специфическая для аллергена иммунотерапия (SIT) безуспешно использовалась ранее для лечения лошадей с IBN (Ginel и др., *Vet. Derm.* 2014, 25: 29-e10).

Для того чтобы решить эту медицинскую проблему по крайней мере один антигенный модуль в предназначенном для лечения IBN (изолированном) рекомбинантном белке, как раскрывается и заявлено в данной заявке, выбирают из группы недавно обнаруженных аллергенов, изолированных от мошек различных видов рода *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae).

Кроме того, страдающие от IBN лошади имеют в 7,1 раз повышенный риск возникновения и страдания от крапивницы [Kehrli D. и др., *J. Vet. Intern. Med.* 2015, 29(1): 320-326]. Крапивница, которая также является известной как "уртикарная сыпь" или как "крапивная лихорадка", характеризуется дискретными вздутиями, возникающими на коже. Это могут быть круглые очаги, кольцеобразные поражения, напоминающие по форме подкову, или такие, которые имеют другие необычные формы. Большинство случаев представляют собой рецидивирующую, внезапно возникающую крапивницу, которая спонтанно разрешается в течение 24-48 ч или нескольких дней.

Существует хорошее доказательство того, что существует опосредованный IgE аллергический компонент, вовлеченный в крапивницу. Однако патофизиология до сих пор является плохо изученной. Непосредственными запускающими сигналами у предрасположенного субъекта могут быть укусы насекомых или клещей, пищевые реакции, реакции на лекарственные препараты, постельные принадлежности, химические вещества и т.д., например, у лошадей, страдающих от IBN, и/или у тех, которые иным образом предрасположены к повышенной чувствительности к экологическим кожным аллергенам. Таким образом, успешная иммунотерапия, например, направленная против IBN, может уменьшить повторное возникновение крапивницы у таких субъектов.

В дополнительном воплощении (изолированные) рекомбинантные белки, как раскрывается и заявлено в данной заявке, являются, в частности, полезными в способе для специфически направленной те-

рапии и/или профилактики у лошадей, страдающих от рецидивирующей обструкции дыхательных путей (RAO).

Рецидивирующая обструкция дыхательных путей (RAO) у лошадей, респираторное заболевание, которое является подобным астме у человека, является одним из наиболее часто диагностируемых состояний, которое затрагивает легкие лошадей среднего возраста и старых лошадей во всем мире. Оно также называется эмфиземой легких или хроническим бронхитом/бронхиолитом, или на более ранних стадиях хронической обструктивной болезнью легких. Когда они присутствуют в течение лета, когда, например, лошади находятся на пастбище, то используются термины обструктивная болезнь легких, ассоциированная с летним пастбищем, или RAO, ассоциированная с летним пастбищем.

RAO представляет собой аллергическое заболевание немедленной гиперчувствительности 1-го типа, которое вовлекает типичную последовательность событий, которые начинаются с реактивных антител, главным образом, IgE, что приводит к дегрануляции тучных клеток, приводящих к образованию гистамина и других химических медиаторов, которые, действуя вместе, вызывают воспаление дыхательных путей и обратимую обструкцию дыхательных путей. Клинические признаки, наблюдаемые в период обострения, могут быть очень серьезными и включают непереносимость физических нагрузок, кашель, выделения из носа и увеличение дыхательных усилий в состоянии покоя. Диагностические процедуры, такие как измерение функции легких, анализ газов крови или бронхоальвеолярного смыва, может предоставить дополнительную информацию о болезни. Обычное лечение включает в себя только паллиативное лечение (например, бронходилататоры и/или кортикостероиды), но в настоящее время не существует какого-либо лечения причины (Leclerc и др. *Respirology* 2011, 16: 1027-1046, Pirie, *Equine Vet. J.* 2014, 46: 276-288).

В последнее время лечение при использовании белка весом 10 кДа (CC10) клеток Clara было утверждено как эффективное для защиты или как такое, которое может быть полезным в качестве пассивной иммунотерапии у лошадей, страдающих от RAO. CC10 является одним из членов семейства противовоспалительных защитных белков, которые продуцируются преимущественно в эпителии дыхательных путей человека и животных. Изобретение описано в US 2014/0105906.

RAO представляет собой комплексное заболевание, однако воздействие переносимых по воздуху аллергенов играет ключевую роль в его этиологии. Клиническая ремиссия обычно достигается за счет устранения воздействия аэроаллергенов. Несмотря на это, главные антигены, которые принимают участие в запуске RAO, четко не определены до сих пор. Многочисленные потенциальные агенты присутствуют, например, в органической пыли, будь-то у лошадей, которых содержат в конюшне, главным образом, обычная или сенная пыль, или у лошадей, которые пребывают на пастбище при дополнительном участии пыльцы (Leclerc и др. *Respirology* 2011, 16: 1027-1046, Pirie, *Equine Vet. J.* 2014, 46: 276-288).

Антигенный модуль молекул iMAT в соответствии с настоящим изобретением может быть выбран с помощью биоинформационного подхода, как описано иллюстративно и подробно продемонстрировано в примерах 6 и 7 в данной заявке. Посредством этого молекулы iMAT могут оказаться полезными, в частности, в качестве вакцин, например, для лечения и/или профилактики RAO у субъектов, предпочтительно лошадей.

В дополнительном варианте осуществления (изолированные) рекомбинантные белки, как описано и заявлено в данной заявке, являются, в частности, полезными в способе, специфически направленном на терапию и/или профилактику у лошадей, страдающих от инфекционных заболеваний, вызванных бактериями.

Rhodococcus equi представляет собой почвенные патогенные актиномицеты, которые вызывают легочные и внелегочные пиогрануломатозные инфекции - лошадиный родококкоз. Молодые жеребята являются особенно восприимчивыми и у них развивается угрожающая жизни легочная болезнь. Также иногда наблюдается язвенный энтероколит, остеомиелит и септический артрит. Многие стратегии иммунизации были испробованы, чтобы предотвратить родококкоз в жеребят, но они имели ограниченный успех. Лечение при использовании антибиотиков является непоследовательно эффективным, а также дорогим, и недавние исследования выявили появление устойчивых к антибиотикам штаммов.

Инфекция в основном передается путем вдыхания находящейся в воздухе пыли, несущей патоген. При попадании в организм хозяина *R. equi* поглощается локальными макрофагами, в частности альвеолярными макрофагами в легких, после ингаляции. Патоген распространяется с медленным прогрессирующим снижением функции легких, что делает сложной раннюю клиническую диагностику. Ранние клинические симптомы часто заключаются только в легкой лихорадке, изредка кашле или незначительном увеличении частоты дыхания, которые могут быть не очевидными, если жеребята не подвергаются уходу и обработке. Кроме того, диагностика не так проста - в настоящее время рекомендуемый инструмент для мониторинга ферм с эндемической *R. equi* пневмонией представляет собой анализ концентраций лейкоцитов в крови и культивирование бактерий из транстрахеальных смывов с последующей идентификации *R. equi* с помощью ПЦР или цитологического исследования таких материалов (van Barger, K. and Haas, A. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009, 33: 870-891, Vazquez-Boland, J.A. и др., *Vet. Microbiol.* 2013, 167: 9-33).

Для того чтобы решить эту медицинскую проблему, по крайней мере один антигенный модуль в

предназначенном для лечения родококкоза (изолированном) рекомбинантном белке, как описано и заявлено в данном изобретении, может быть выбран из антигенов, которые имеют происхождение от *R. equi*, например ассоциированного с вирулентностью белка А (VarA), иммунодоминантного экспрессируемого на поверхности липопротейна или других поверхностных белков. Он также может представлять собой такой, который имеет происхождение от инфицированных *R. equi* фагов. Улучшенные молекулы МАТ могут быть сделаны полезными специально в качестве вакцин, например, для лечения и/или профилактики родококкоза у лошадей. Лечение может включать введение молекулы iМАТ жеребенку и/или также может включать в себя обработку беременной кобылы в соответствии с настоящим изобретением.

Мыт (удушьё) также представляет собой один из примеров инфекции у лошадей. Мыт характеризуется образованием абсцесса лимфатических узлов головы и шеи, вызванного *Streptococcus equi*, и представляет собой одно из наиболее часто диагностируемых инфекционных заболеваний у лошадей, таким образом, сохраняется значительная потребность в разработке новых профилактических вакцин.

Еще в одном варианте осуществления (изолированные) рекомбинантные белки, как описано и заявлено в данном изобретении, являются, в частности, полезными в способе, в частности, направленном на терапию и/или профилактику у лошадей, страдающих от инфекционных заболеваний, вызванных вирусами.

Африканская чума лошадей (AHS) представляет собой высокоинфекционное и смертельное заболевание. Она обычно поражает лошадей, мулов и ослов. Инфекция вызывается вирусом рода *Orbivirus*, принадлежащего к семейству *Reoviridae*. AHS непосредственно не является контагиозным, но, как известно, распространяется насекомыми-переносчиками, в основном *Culicoides*, а также *Culex*, *Anopheles* и *Aedes*, или передается клещами (например, *Hyalomma* или *Rhipicephalus*), как было описано. На сегодняшний день не существует эффективного лечения для AHS, при этом приблизительно 90% зараженных лошадей умирают, главным образом, из-за дыхательной недостаточности в течение 24 ч инфекции. Таким образом, контроль заболевания зависит от профилактической вакцинации.

Вирус Западного Нила (WNV) представляет собой вирус с положительной одноцепочечной РНК, который передается москитами и сгруппирован в пределах серокомплекса вируса японского энцефалита *Flavivirus* в семействе *Flaviviridae*. WNV является возбудителем синдрома заболевания также известного под названием лихорадки Западного Нила. Птицы являются природным источником, и WNV поддерживается в природе в цикле передачи москиты - птицы - москиты. Тем не менее, когда лошади инфицируются, то это часто остается незамеченным. Лошади умирают или подвергаются эвтаназии из-за тяжелых неврологических симптомов, в том числе пареза, атаксии, опрокидывания и мышечной фасцикуляции, другие демонстрируют легкий -тяжелый полиэнцефаломиелит. Диагностика и подтверждение WNV инфекции может быть сделана непосредственно путем идентификации вируса или опосредованно путем исследования на наличие антител в клинических образцах. Однако его идентификация, как правило, затруднена по причине короткой продолжительности и низкого уровня виремии у лошадей.

В дополнительном варианте осуществления изобретения (изолированные) рекомбинантные белки, как описано и заявлено в данном изобретении, являются, в частности, полезными в способе, специфически направленном на предотвращение передачи инфекционных заболеваний у лошадей, с помощью переносчиков, например мух, которые питаются кровью, мошек, клещей и/или комаров.

Патогены доставляются в кожу хозяина, который представляет собой млекопитающее, вместе со слюной членистоногих, которая содержит широкий спектр биологически активных молекул. Эти компоненты слюны способны изменять гемостаз и иммунные реакции и могут осуществлять свой вклад в способность патогена вызывать инфекцию. Наличие инфекционных микроорганизмов в слюнных железах членистоногих, которые питаются кровью, изменяет состав слюны, пример вызывает изменения в концентрации апиразы или антитромбиназы у инфицированных москитов. Эти антигены или другие являются хорошо приспособленными для использования в антигенном модуле молекул iМАТ в соответствии с настоящим изобретением и могут быть полезными в качестве вакцины, в частности, для активации иммунной системы хозяина, чтобы предотвратить передачу инфекционных патогенов переносчиками у лошадей.

В дополнительном варианте осуществления изобретения (изолированные) рекомбинантные белки, как раскрывается и заявлено в данной заявке, являются, в частности, полезными в способе, специфически направленном на терапию и/или профилактику у лошадей, страдающих от инфекционных заболеваний, вызванных грибами.

Дерматомироз или лишай представляет собой грибковую инфекцию волос и поверхностных слоев ороговевших клеток кожи, которая возникает у животных и человека. Несколько видов рода *Microsporum* или рода *Trichophyton*, принадлежащих к группам зоофильных и геофильных дерматофитов, могут вызывать клинические инфекции у животных. Разнообразные поверхностные антигены грибов и/или их споры являются приемлемыми для того, чтобы использоваться в антигенном модуле молекулы iМАТ в соответствии с настоящим изобретением и могут быть полезными, в частности, в качестве вакцин, например, для терапии и/или профилактики дерматомироза у лошадей.

В дополнительном варианте осуществления изобретения (изолированные) рекомбинантные белки, как раскрывается и заявлено в данной заявке, являются, в частности, полезными в способе, специфически

направленном на терапию и/или профилактику у лошадей, страдающих от инфекционных заболеваний, вызванных паразитами.

Паразиты, поражающие лошадей, являются повсеместно распространенными и клинически значимыми по всему миру. Основными паразитарными угрозами для здоровья лошадей являются *Cyathostomins*, *Parascaris equorum*, *Anoplocephala perfoliata* и *Strongylus vulgaris*. О повышении уровня устойчивости к гельминтам у паразитов лошадей сообщается во всем мире. Для простейших, например, *Cryptosporidium* несколько препаратов последовательно подавляют размножение паразита у хозяина. В основном, поражаются жеребята, и исход зависит от врожденных и адаптивных иммунных реакций.

Антигены, имеющие происхождение от взрослых паразитов, а также от паразитов в препатентной стадии развития, являются еще одним примером для использования в антигенном модуле молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением, и могут быть полезными, в частности, в качестве вакцин, например, для терапии и/или для профилактики паразитарной инфекции у лошадей.

В частности, в случае модулирования иммунного ответа у лошадей по крайней мере один нацеливающий модуль предпочтительно представляет собой инвариантную цепь лошади, более предпочтительно — одну или более аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NOS: 2, 15, 16.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения (изолированный) рекомбинантный белок, как описано и заявлено в данной заявке, присутствует в мономерной форме, поскольку, например, рекомбинантно введенные аллергены имеют тенденцию к образованию агрегатов, в частности, если получены при использовании телец включения. Путем замены по крайней мере одного, предпочтительно всех цистеиновых остатков во всей последовательности (изолированного) рекомбинантного белка, предпочтительно путем замены на серин, лейцин, изолейцин и/или аспарагиновую кислоту, можно предотвратить образование межмолекулярных дисульфидных связей, устраняя, таким образом, любую агрегацию, в частности, любое неестественное образование межмолекулярных и/или внутримолекулярных связей. То есть (изолированный) рекомбинантный белок, будучи полностью лишенным остатков цистеина, не подвергается агрегации. Следовательно, такой белок легко подвергается экспрессии и демонстрирует улучшенное нацеливание и МНС презентацию.

Кроме того, такие свободные от цистеина варианты, например аллергены, в которых остатки цистеина в аминокислотной последовательности аллергенов дикого типа были мутированы по отдельности или в комбинациях, обладают пониженной IgE реактивностью по сравнению с соответствующими аллергенами дикого типа и в то же время существенно сохраняют реакционную способность по отношению к Т-лимфоцитам и, таким образом, являются гипоаллергенными.

Таким образом, изобретение относится к таким гипоаллергенным вариантам аллергенов, вызывающим, например, IBN у лошадей, причем в таких вариантах остатки цистеина аллергенов дикого типа были подвергнуты мутации по отдельности или в комбинации.

Кроме того, наличие модуля метки для разделения белков в образце, включающем в себя молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением, например, при использовании твердого носителя на основе заряженного цинка или кобальта, дополнительно улучшает возможность получения гибридных белков без агрегации в процессе очистки. Как правило, модуль метки включает в себя полигистидиновую метку из пяти-шести последовательных остатков гистидина.

(Изолированные) рекомбинантные белки, как раскрывается и заявлено в данной заявке, являются полезными в фармацевтической композиции. Например, (изолированные) рекомбинантные белки предназначены для применения в вакцине. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает вакцинные композиции, которые содержат один или более (изолированных) рекомбинантных белков, как раскрывается и заявлено в данной заявке. Такая вакцинная композиция может использоваться с терапевтической целью и/или для профилактики у лошадей, которые страдают от гиперчувствительности на укус насекомого (IBN), крапивницы и/или рецидивирующей обструкции дыхательных путей (RAO), инфекционных заболеваний, вызванных патогенными микроорганизмами, например *Rhodococcus pneumoniae*, удушья, африканской чумы лошадей, вируса лихорадки Западного Нила, дерматомикоза и/или паразитов пищеварительного тракта или других органов, например криптоспориоза, гельминтов и/или их периода препатентной стадии. Кроме того, этот способ может быть использован не только против таких патогенных микроорганизмов, но также может активировать иммунную систему хозяина, чтобы предотвратить передачу переносчиками, например мухами, которые питаются кровью, мошками, клещами и/или комарами.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения обеспечивается вакцина для субъектов, таких как лошади, для лечения и/или предотвращения IBN, вызванного в ответ на укусы насекомых, например *Culicoides*, мошками и/или другими насекомыми, которые питаются кровью. Кроме того, успешная иммунотерапия против IBN может привести к снижению в целом гиперчувствительности к кожным аллергенам окружающей среды и, таким образом, может уменьшить возникновение рецидива крапивницы у таких предрасположенных субъектов.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения обеспечиваются вакцины для субъектов, таких как лошади, для лечения и/или профилактики RAO, которое вызвано ответом, например, на плесень (грибы и/или их споры), пыльцу, домашнюю пыль или амбарных клещей (и/или их фекалии).

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения обеспечиваются вакцины для субъектов, таких как лошади, для лечения и/или профилактики инфекционных заболеваний, которые вовлекают, например, роды *Rhodococcus*, *Streptococcus*, *Orbivirus*, *Flavivirus*, *Trichophyton*, *Microsporium*, *Cryptosporidium* и/или *Strongylus*. Кроме того, может обеспечиваться вакцина для активации иммунной системы хозяина, чтобы предотвратить передачу заболевания переносчиками, например *Culicoides*, *Culex* и/или *Ixodes* и/или другими насекомыми, которые питаются кровью.

Фармацевтическая композиция, например, в форме вакцины на основе (изолированных) рекомбинантных белков предпочтительно предназначена для сублингвального введения, подкожных и/или внутривенных инъекций, раствора для инъекций в лимфатические узлы и/или для введения через слизистые оболочки, в частности через слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта или дыхательной системы.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции вводят парентерально.

Молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением могут использоваться как фармацевтический препарат или как вакцина для модификации, например, аллергических расстройств. Например, гиперчувствительность на укус насекомого (IBH) может подвергаться лечению с помощью таких молекул iMAT.

Низкие количества (от 1 до 1000 мкг, относящиеся к весу исключительно одного или более антигенных модулей) рекомбинантно полученных молекул iMAT, включающих аллергены IBH, вызывающие аллергию на укусы насекомых, таких как из рода *Culicoides*, которые, например, вводят от 1 до 5 раз подкожно, интрадермально или непосредственно в лимфатический узел, индуцируют сильный и длительный иммунный ответ у лошадей, что ведет к улучшению клинических симптомов.

В одном предпочтительном варианте осуществления молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением вводят в комбинации, по крайней мере, с одним адъювантом. Адъювант включает в себя, но не ограничиваются такими как один или несколько из следующих: квасцы, БЦЖ, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, фосфат кальция, липидные эмульсии, липиды или полимерные нано- или микросферы, мицеллы, липосомы, сапонин, липид А или дипептид, бактериальные продукты, хемокины, цитокины и гормоны, хитозан, крахмал, альгинат, производные целлюлозы (например, этилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза), нуклеиновые кислоты или конструкции нуклеиновой кислоты. Один или более из этих компонентов могут быть добавлены для усиления или модификации иммунного ответа. В качестве альтернативы молекулу iMAT можно вводить без адъюванта, либо в водной форме.

Молекулы iMAT можно вводить в дозе от приблизительно 1 до 1000 мкг (эта и последующие дозы относятся к весу исключительно одного или более антигенного модуля) и более предпочтительно в дозе от приблизительно 10 до приблизительно 100 мкг и еще более предпочтительно в дозе от приблизительно 20 до приблизительно 50 мкг, хотя оптимальная доза может варьировать в зависимости от вводимого антигена, предпочтительно аллергена, веса субъекта, иммунной системы субъекта и так далее. Эффективное лечение во многих случаях может быть достигнуто при использовании одного введения. В некоторых вариантах осуществления обработка включает в себя от 1 до 15 введений. В предпочтительных вариантах осуществления обработка включает в себя от 1 до 5 введений и более предпочтительно от 1 до 3 введений. Для начальных этапов лечения введения могут быть периодическими, например в течение курса нескольких дней, один или два раза в месяц или год или несколько раз в год. Для поддержания иммунного ответа введения могут осуществляться с интервалом от нескольких месяцев до нескольких лет.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения (изолированные) рекомбинантные белки, как раскрывается и заявлено в данной заявке, являются предназначенными для введения в лимфатические узлы. В процессе непосредственного введения в лимфатический узел соответствующий лимфатический узел может быть визуализирован во время процедуры инъекции, например, с помощью ультразвука, для того, чтобы контролировать местоположение иглы и изменения в лимфатических узлах, такие как опухание. Инъекции в нижнечелюстные, подмышечные, паховые и/или подколенные лимфатические узлы является предпочтительными благодаря легкости ультразвукового определения местоположения и инъекции.

В данной области техники является известным, что некоторые (>20) идентифицированные белки в слюне насекомых, которые питаются кровью, вызывают IgE реактивность и патологические кожные реакции у лошадей [Schaffartzik, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2012, 147: 113-126; Allergome (www.allergome.org)]. Таким образом, ожидается, что лечение может быть успешным только, если большинство соответствующих аллергенов включены в лекарственные средства для специфической иммунотерапии. Тем не менее, неожиданно было обнаружено, что только 1, 2, 3 или 4 такие молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением, каждая из которых включает различные антигенные модули, например, слюны насекомого или мозаичной конструкции исключительно эпитопов, являются достаточными для индукции иммуномодуляции и/или клинического улучшения у пораженных субъектов, если такие молекулы iMAT вводят от 1 до 5 раз подкожно, интрадермально и/или непосредственно в лимфатический узел.

В предпочтительном варианте осуществления используется одна молекула iMAT, и она является достаточной для индукции терапевтического эффекта и/или предотвращения развития гиперчувствительности на укус насекомого (IBN), крапивницы и/или рецидивирующей обструкции дыхательных путей (RAO) у лошадей.

В другом предпочтительном варианте осуществления используется комбинация 2, 3 или 4 молекул iMAT с помощью одновременного, последовательного и/или хронологически смещенных совместных введений.

В предпочтительном варианте осуществления используется одна молекула iMAT, и она является достаточной для индукции терапевтического эффекта и/или предотвращения развития, и/или предотвращения передачи инфекционных заболеваний у лошадей, например *Rhodococcus pneumoniae*, удушья, африканской чумы лошадей, вируса лихорадки Западного Нила, дерматомикоза и/или паразитов пищеварительного тракта или других органов, например криптоспориоза, гельминтов и/или их периода препатентной стадии. Кроме того, этот способ может быть использован не только против таких патогенных микроорганизмов, но также может активировать иммунную систему хозяина, чтобы предотвратить передачу переносчиками, например мухами, которые питаются кровью, мошками, клещами и/или комарами.

В другом предпочтительном варианте осуществления используется комбинация 2, 3 или 4 молекул iMAT с помощью одновременного, последовательного и/или хронологически смещенных совместных введений.

В зависимости от термодинамической оценки (изолированного) рекомбинантного белка, как раскрыто или заявлено в данной заявке, его стабильность зависит от мутации цистеина, в частности замены различным(и) аминокислотным(и) остатком(ами). Например, это может быть замена Cys на Ser. Однако стабильность может быть выше при использовании отличного от Ser аминокислотного остатка для того, чтобы достичь желаемой стабильности и растворимости. То есть в то время как первый выбор может представлять собой замену цистеина на Ser, в случае нестабильности аминокислотный остаток, отличный от Ser, должен заменить Cys.

Для того чтобы выбрать аминокислотные остатки для стабилизации в качестве замены для остатков цистеина в целевых последовательностях, выбирают трехэтапный подход.

1. Моделирование третичной структуры целевого белка, включая терминальные гексагистидиновые метки, последовательность iMAT и первичную аминокислотную последовательность белка, который представляет интерес. Моделирование может осуществляться при использовании нативной последовательности и включать замены цистеина.

2. Итеративное определение стабильности белка на основе точечных замен, таких как замена остатка цистеина отличным аминокислотным остатком, например Ser и/или Ile, и категоризация для определения стабилизирующих замен путем анализа всех доступных трехмерных структур.

3. Повторное моделирование стабилизированной структуры и подтверждение стабильности путем повторения этапов 1 и 2.

Трехмерные белковые структуры имеют решающее значение для понимания функции белка на молекулярном уровне и представляют большой интерес для рациональной разработки многих различных типов биологических экспериментов, таких как сайт-направленный мутагенез. Тем не менее, количество структурно охарактеризованных белков является малым по сравнению с числом известных белковых последовательностей. Можно идентифицировать гомологичный белок с известной структурой (матрица) для данной последовательности белка (целевая последовательность). В этих случаях моделирование гомологии оказалось способом выбора для создания надежной 3D-модели белка из его первичной аминокислотной последовательности. Модель построения гомологии включает четыре основных этапа: (1) идентификация структурной(ых) матрицы(матриц), (2) выравнивание целевой последовательности и структуры(структур) матриц(матрицы), (3) построение модели и (4) качественная оценка модели. Эти этапы могут повторяться до достижения удовлетворительного результата моделирования. В тех случаях, когда точная модель гомологии не может быть определена, используются вычислительные подходы для определения структуры белка из первичной структуры (аминокислотные последовательности). "De novo" или "ab initio" способы основываются на физических принципах и пытаются имитировать процесс сворачивания. Такие способы должны исследовать большое количество конформаций и требуют очень точных энергетических функций для идентификации структур в глобальном минимуме свободной энергии. Многие способы используют комбинацию этих описанных принципов.

Доступность вычислительных средств обеспечивает достаточно точные оценки влияния аминокислотных замен на стабильность белков и имеет решающее значение в широком диапазоне применений. В частности, такие инструменты имеют потенциал стимулирования и поддержания белковой инженерии и конструкторских проектов, посвященных созданию модифицированных белков.

Стабильность белка можно рассматривать с точки зрения термодинамической стабильности белка, которая быстро и обратимо развертывает и свертывает белок. В этих случаях стабильность белка представляет собой разницу в свободной энергии Гиббса между свернутым и развернутым состояниями. Единственными факторами, влияющими на стабильность, являются относительные свободные энергии свернутого и развернутого состояний. Чем больше и более позитивна разница свободной энергии фол-

динга, тем более стабильным является белок для денатурации. Разница свободной энергии фолдинга, как правило, является небольшой, порядка 5-15 ккал/моль для глобулярного белка. Тем не менее, с другой стороны, стабильность белка можно рассматривать как свойство белка, чтобы выдерживать высокие температуры или условия растворения. Это связано с термодинамической стабильностью, а также с обратимостью или необратимостью свертывания/развертывания (кинетическая стабильность).

Для прогнозирования термодинамических изменений стабильности, вызванных точечными заменами в белках, несколько различных подходов могут быть применены для изучения воздействия таких замен на структуру и функции белков [Pires D.E. и др., *Bioinformatics* 2014, 30(3): 335-342]. Такие подходы могут быть широко классифицированы на те, которые стремятся понять влияние замен в аминокислотной последовательности белка самого по себе, и те, которые используют обширную структурную информацию. Подходы, основанные на структуре, как правило, пытаются спрогнозировать либо направление изменения стабильности белка при заменах, либо фактическую величину свободной энергии (AAG).

Результаты для каждого конкретного белка и его соответствующих моделей подвергаются статистическому анализу с точки зрения количества возникновений специфических замен при использовании балльной системы, которая нивелирует замену, которая основывается на возникновениях в используемых моделях и изменении свободной энергии стабильности белка (AAG), определяя тем самым наиболее дестабилизирующие остатки (если таковые имеются) в структуре, в которую они вводятся, и возможные замены. Показатель рассчитывается путем определения самой низкой AAG ($AAG < 0$) в каждом положении, которое представляет интерес, в каждой модели и назначения соответствующих линейных значений и кумулятивных значений AAG для каждого потенциального положения замены, и результаты потом оцениваются для определения согласованности между моделями.

Поскольку расчетные модели белка обладают различными свойствами (вероятность предсказания правильной трехмерной структуры), весовой коэффициент может применяться для того, чтобы установить приоритеты результатов, полученных от более точных моделей. Остаток, который имеет значимое (на основе AAG) дестабилизирующее влияние (если таковой имеется), заменяется; получают новые модели и повторно подвергают их итеративному анализу до тех пор, пока не будет достигнуто устойчивое состояние. Кроме того, генерируемые модели оцениваются путем анализа хуз координат с помощью анализа главного компонента для определения потенциальных структурных неправильных фолдингов из-за замены аминокислот в специфических положениях.

Еще в одном дополнительном аспекте задача, которая лежит в основе изобретения, была неожиданно решена путем обеспечения способа идентификации аминокислотных замен в предварительно определенной аминокислотной последовательности, позволяющего осуществлять стабилизацию такой предварительно определенной аминокислотной последовательности, который включает следующие этапы:

(i) моделирование трехмерной/третичной структуры целевой предварительно определенной аминокислотной последовательности;

(ii) итеративное определение стабильности белка на основе точечных замен, таких как замена остатков цистеина отличным аминокислотными остатками, предпочтительно остатками серина и/или изолейцина, и категоризации на основе изменений свободной энергии стабильности белка (AAG) для определения стабилизирующих замен путем анализа всех доступных трехмерных/третичных структур,

(iii) повторное моделирование замещенной трехмерной/третичной структуры аминокислотной последовательности и подсчет ее стабильности путем повторения (ii) и (iii) до тех пор, пока не будет достигнуто стабильное состояние.

Еще в одном дополнительном аспекте задача, которая лежит в основе изобретения, была неожиданно решена путем обеспечения (изолированного) рекомбинантного белка, как раскрыто или заявлено в данной заявке, где полная или частичная аминокислотная последовательность стабилизирована с помощью способа идентификации аминокислотных замен в предварительно определенной аминокислотной последовательности, как раскрыто или заявлено в данной заявке (см. пример 5 в данной заявке).

Краткое описание фигур

Фиг. 1 показывает примеры аллергенов рода *Culicoides*, идентифицирующих виды, аллерген и депозитный номер UniProt (обновление базы данных UniProt 2013_09);

фиг. 2 - SDS-ПАГЭ MAT-Fel d1 (IVN201) при восстанавливающих условиях; А) исходный SDS-ПАГЭ (10 мкг белка на дорожку, окрашивание по Кумасси) и В) SDS-ПАГЭ с полосами, которые были вырезаны из геля А и повторно загружены на SDS-ПАГЭ (окрашивание серебром);

фиг. 3 - SDS-ПАГЭ для Fel d1 при восстанавливающих условиях; NuPAGE® 4-12% Bis-Tris гель. Дорожки: 1) маркер: SeeBlue Plus2 предварительно окрашенный стандарт; 2) 5 мкг Fel d1; 3) 5 мкг Fel d1;

фиг. 4 - хроматограмму ВЭЖХ с обратной фазой, 0,1% градиент ТФК/ацетонитрил) нативный белок (MAT-Fel d1) без добавок (левая колонка); б) MAT-Fel d1, денатурированный путем прибавления хлорида гуанидина плюс DTT (правая колонка);

фиг. 5 - молекулу MAT-Fel d1 и ее диаграмму гидрофобности Кайт и Дулитл;

фиг. 6 - NuPAGE® SDS-ПАГЭ систему (4-12% Bis-Tris гели, 1×MES буфер для разгона, 35 мин, 200 В). Дорожки: 1) лизоцим, 1 мкг белка окис; 2) белок маркера PageRuler Prestained; 3) MAT-Fel d1 (5 мкг), окисленный при использовании иодацетамида (окис); 4) iMAT-Cul o4 (окис); 5) белок маркера PageRuler

Prestained; 6) MAT-Fel d1 (5 мкг) восстановленный; 7) iMAT-Cul o4 восстановленный; 8) лизоцим восстановленный;

фиг. 7 - хроматограмму ВЭЖХ с обратной фазой 0,1% градиент ТФК/ацетонитрил. Пик показывает нативный (окисленный) белок (iMAT-Cul o4) без добавок;

фиг. 8 - пример дисплея количества совпадений при локальных выравниваниях для выбранных аллергенов *Culicoides* по сравнению с измеренными сенсибилизациями (см. описание для подробностей). Фигура изображает сравнение между антигенным прогнозированием (светло-серый и правая ось Y) и результатом (темно-серый и левая ось Y) в тесте HRT с точки зрения тяжести (суммарные значения баллов на каждый аллерген) в группе IBH лошадей. Тяжесть описывает степень реакции в анализе в соответствии с полуколичественной шкалой (левая ось Y). Данные прогнозирования масштабируются путем установки высокого балла встречаемости, равного баллу самой высокой степени тяжести;

фиг. 9 - результаты следующих экспериментов: белки и Adju-Phos®, которые инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин при осторожном перемешивании. После инкубации образцы центрифугировали в течение 3 мин и последовательно подвергали анализу с помощью SDS-ПАГЭ Дорожки 1) белок маркера PageRuler Prestained; 2) супернатант iMAT-Cul o3; 3) осадок iMAT-Cul o3 в моче; 4) супернатант iMAT-Cul o3; 5) осадок iMAT-Cul o3 в моче; 6) "пустая дорожка"; 7) супернатант iMAT-Cul o2; 8) осадок iMAT-Cul o2 в моче; 9) супернатант iMAT-Cul o2; 10) осадок iMAT-Cul o3 в моче; 11) "пустая дорожка"; 12) супернатант iMAT-Cul o4; 13) осадок iMAT-Cul o4 в моче; 14) супернатант iMAT-Cul o4; 15) осадок iMAT-Cul o4 в моче; (2, 3, 7, 8, 12, 13 вес./об. замораживание/оттаивание); (4, 5, 9, 10, 14, 15 после процесса двукратного замораживания/оттаивания);

фиг. 10 - анализ высвобождения гистамина (подробности анализа приведены в примере 2) 5 концентраций iMAT-Cul o2 и iMAT-Cul o3 и соответствующие аллергены у полисенсибилизированных лошадей (лошадь 1);

фиг. 11- диаграмму гидрофобности Кайт и Дулитл для молекулы MAT против молекулы iMAT в генерической части соответствующих слитых белков [т.е. без соответствующего антигенного(ых) модуля(ей)]. Индекс гидрофобности показан на оси ординат по отношению к положению аминокислоты по оси X. Положительные числа в индексе указывают на гидрофобность. Сдвиг диаграммы молекулы iMAT в начале диаграммы гидрофобности по отношению к молекуле MAT обусловлен дополнительным присутствием N-терминальной His-метки и одного остатка метионина в молекуле iMAT, а также отсутствием какого-либо спейсерного(ых) модуля(ей);

фиг. 12 - число неслучайных совпадений для каждого пептида длиной 13 аминокислот для Cul o3 (M4X062, SEQ ID NO: 6) в канонической базе данных и их положение в пределах соответствующего белка-предшественника. Ось ординат показывает число совпадений, а ось X - положение аминокислоты в ссылке на белок-предшественник. Вертикальные пунктирные линии указывают на остатки цистеина, пунктирная линия с точками изображает скользящее среднее значение числа неслучайных найденных гомологий, а горизонтальные сплошные линии соответствуют *in silico* расщепленным пептидам.

Примеры

Приведенные ниже примеры служат для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения, но они не должны трактоваться как такие, которые ограничивают объем изобретения, которое раскрыто в данной заявке.

Пример 1. Суррогатный маркер для иммунитета/длительности иммунитета.

Введение (изолированного) рекомбинантного белка, как раскрывается и заявлено в данной заявке, лошадям вызывает иммунный ответ на аллерген и/или эпитоп, который присутствует в антигенном модуле. Кроме того, модуль C- или N-терминальной метки вместе с соседними аминокислотными остатками из соседнего модуля может быть использован для того, чтобы обнаружить уникальный иммунологический сигнал на специфический продукт (например, образование антител или Т-клеточный ответ) у целевого субъекта, который может использоваться в качестве суррогатного маркера иммунитета или длительности иммунитета. Это суррогатный маркер в качестве специфического для лечения иммунологического параметра позволяет осуществлять оценку иммунитета, или модуляции иммунитета, или длительности иммунитета, или длительности иммунной модуляции после введения. Таким образом, конкретный показатель иммунного ответа, который запускается (изолированным) рекомбинантным белком в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой индукцию терминальной метки (необязательно с соседними аминокислотными остатками) специфических антител, таких как IgG антитела. В качестве альтернативы или дополнительно к этому, этот индикатор представляет собой индукцию антител, специфических к соединению спейсера и модуля, как описано и заявлено в данной заявке, или к соединению между двумя модулями.

Пример 2. Гипоаллергенность.

Свежеполученную кровь лошадей, страдающих от IBH, можно использовать для проверки реакционной способности базофилов на (изолированный) рекомбинантный белок/молекулу iMAT, как раскрывается и заявлено в данной заявке. Это может быть определено с помощью модифицированного метода Кауля [Kaul, S., 1998. Type I allergies in the horse: Basic development of a histamine release test (HRT). Doctoral thesis. Veterinary School Hannover, Германия]. Вкратце, серийные 10-кратные разведения (например,

в пределах от 10 до 0,001 нМ конечной концентрации аллергена) молекулы iMAT и/или рекомбинантных аллергенов получали в буфере PIPES (AppliChem, Дармштадт, Германия), pH 7,4. Промытые красные и белые клетки крови, полученные из крови при ингибировании коагуляции при использовании Na-ЭДТА, инкубировали с индивидуальными разведениями в течение 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали путем инкубации на льду в течение 20 мин и супернатант, содержащий высвобожденный гистамин, собирали из каждого образца после центрифугирования.

Максимальное содержание гистамина получали путем кипячения клеток крови в течение 10 мин на водяной бане (максимальное выделение). Инкубация буфера для высвобождения с промытыми клетками крови служила в качестве отрицательного контроля (спонтанное высвобождение). Концентрацию гистамина определяли при использовании конкурентного радиоиммуноанализа (LDN Нордхорн, Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

В качестве альтернативы еще один тест активации базофилов представляет собой анализ стимуляции клеточного антигена ELISA CAST®, который также можно рассматривать как *in vitro* тест провокации аллергии. Этот анализ осуществляли в соответствии с инструкциями производителя (Bühlmann Laboratories AG, Allschwil, Швейцария). В анализе CAST® осажденные из крови лейкоциты субъектов с аллергией одновременно примиривали с помощью цитокина IL-3 и стимулировали при использовании молекул iMAT и/или рекомбинантных аллергенов. Клетки базофилов наряду с другими вырабатывают аллергический медиатор, сульфидолекотриен LTC₄, и его метаболиты LTD₄ и LTE₄. Такие свеже синтезированные сульфидолекотриены (SLT) впоследствии подвергали оценке в тесте ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

Потенциал молекул iMAT в отношении индукции неблагоприятных событий, например провокация анафилаксии как побочного эффекта введения, может быть оценен *in vitro* с помощью этих анализов путем сравнения эффектов молекулы iMAT (содержащей аллерген) по сравнению с соответствующим рекомбинантным аллергеном, взятым отдельно.

Сниженная дегрануляция базофилов, например выделение гистамина и/или сульфидолекотриенов, при использовании молекул iMAT по сравнению с рекомбинантным аллергеном указывает на более низкий потенциал для побочных эффектов, т.е. лучший профиль безопасности молекул iMAT.

Указанная HRT (или CAST®) может использоваться в качестве теста *in vitro* провокации для 1-го типа аллергических реакций у лошадей. Специфическое для аллергена высвобождение гистамина указывает на актуальность соответствующего аллергена для активации базофильных клеток и, таким образом, может быть использовано в качестве количественного параметра для специфической для аллергена сенсibilизации субъекта.

С помощью молекул MAT, описанных в известном уровне техники, гипоаллергенность может быть продемонстрирована по сравнению с соответствующим нативным аллергеном (Fel d1) [Senti G. и др., J. Allergy Clin Immunol. 2012, 129(5): 1290-1296] в анализе стимуляции клеточного аллергена (CAST), а также при использовании внутридермальной и внутрикожной пробы. Количественная разница в чувствительности между аллергеном и молекулой MAT, включающей Fel d1, была 100-, 23- и 16-кратной соответственно. Несмотря на то, что MAT-Fel d1 был явно гипоаллергенным, некоторая аллергенность все-таки сохранялась.

Что касается настоящего изобретения, то была исследована безопасность 2 молекул iMAT, полученных в соответствии с настоящим изобретением, включающих Cul o2 и Cul o3 в антигенном модуле соответственно. Свежевзятую кровь полусенсибилизированных лошадей, страдающих от IBH, использовали в тесте на высвобождение гистамина (HRT), как описано выше.

Как показано на фиг. 10, нативные аллергены вызывали сильное высвобождение гистамина, в то время как неожиданно две различные молекулы iMAT (iMAT-Cul o3 и iMAT-Cul o2) не показали практически никакого ответа вообще.

Таким образом, молекулы iMAT показали заметное превосходство в отношении безопасности по сравнению с молекулами MAT, как описано в предшествующем уровне техники (см. выше).

Можно ожидать, что никаких связанных с аллергеном побочных реакций не будет наблюдаться у лошадей, страдающих от IBH, если они будут подвергаться обработке при использовании указанных молекул iMAT.

Следствие этого удивительного свойства безопасности молекул iMAT, в отличие от молекул MAT, заключается в том, что молекулы iMAT, используемые в качестве десенсибилизирующих белков, могут применяться подобно вакцинам против патогенных микроорганизмов. Нет необходимости в высоких дозировках, как в случае с классическими терапевтическими аллергенами, так как вакцины, включающие молекулы iMAT, не демонстрируют аллергенных свойств в отношении аллергических побочных эффектов. Это не может быть осуществлено при использовании молекулы MAT, описанной в предшествующем уровне техники, так как аллергенность молекулы MAT по сравнению с нативным аллергеном только снижается до определенного уровня. Тем не менее, молекулы MAT все еще остаются аллергенами; молекулы iMAT в отличие от них таковыми не являются. Преимущество этого улучшенного свойства обеспечивает более эффективный режим лечения, который является возможным, например, при использовании трех подкожных или внутрилимфатических инъекций с высоким содержанием биофармацевтического

препарата (например, 3 раза от 20 мкг до 50 мкг iMAT белка).

Отсутствие аллергенности двух проанализированных молекул iMAT можно объяснить тем, что в отличие от молекулы MAT, описанной в предшествующем уровне техники, не используется никаких аминокислотных остатков линкера [т.е. спейсерного(ых) модуля(ей) между первым, вторым и/или третьим модулем(ями)] для разделения различных модулей в таких MAT молекулах. В предшествующем уровне техники является известным, что сконструированные слитые белки, содержащие два или более функциональных полипептидов, которые соединены с помощью пептидного или белкового линкера, имеют важное значение для функции (например, распознавание эпитопов иммунной системой) таких белков [Klein J.S. и др., Protein Eng Des Sel. 2014, 27(10): 325-330]. Расстояние разделения между функциональными единицами может оказывать влияние на доступность эпитопа и способность связываться с авидностью. Если отсутствующие аминокислотные остатки линкера между модулями, в частности между доменом нацеливания и антигенным модулем, приводят к более жесткой структуре, то конформационные эпитопы аллергенного модуля могут не сформироваться из-за неправильного сворачивания. Поперечное связывание антител на поверхности базофилов (например, IgE) с помощью своих рецепторов с высокой аффинностью является необходимым для того, чтобы вызвать активацию и высвобождение гистамина. Однако неправильно свернутые аллергены могут быть не в состоянии вызвать такое перекрестное связывание. Таким образом, молекула iMAT без линкера не может образовывать конформационные эпитопы IgE, что делает молекулы iMAT неаллергенными.

Пример 3. In silico определение аллергенов/биомаркеров.

Как подробно раскрыто в описании изобретения, основные аллергены, которые вызывают IBH, еще не были описаны - в биоинформационном инжиниринге антигенные модули iMAT для нацеливания на IBH могут быть использованы для оценки in silico релевантности определенных аллергенов (см. пример 6 в данной заявке). Например, как показано на фиг. 8, результаты in silico, а также ex vivo функциональных HRT исследований Cul o3 указывают на то, что Cul o3 представляет собой один из основных аллергенов. Большинство исследованных лошадей, хотя и не все, продемонстрировали четкую повышенную чувствительность к Cul o3. Это является удивительным, так как в других экспериментах, например, проведенных van der Meide и др. (Vet. J. 2014, 200: 31-37), различные рекомбинантные аллергены не могут быть подвергнуты дифференциации в отношении их релевантности по отношению к этой болезни: примерно от 80 до 90% лошадей, страдающих от IBH, показали повышенную чувствительность к каждому из проанализированных аллергенов.

Таким образом, неожиданно в контексте настоящего изобретения можно было бы показать, что Cul o3 (i) фактически является одним из основных аллергенов (т.е. >50% животных были сенсибилизированы) при IBH и (ii) имеет превосходную релевантность по сравнению с другими аллергенами.

Кроме использования в антигенном модуле iMAT, соответствующие аллергены могут также служить для оптимизации успеха лечения до его начала путем исследования силы гиперчувствительности против указанных аллергенов. На протяжении всего курса лечения специфическую для аллергена модуляцию различных компонентов иммунной системы можно контролировать, например изменения в специфических для аллергена титрах IgE и IgG антител может свидетельствовать о терапевтических и/или профилактических эффектах.

Таким образом, in silico обнаруженные аллергены и/или соответствующие специфические для аллергена иммуноглобулины могут быть использованы в качестве диагностических и/или лечебно-диагностических биомаркеров.

Пример 4. Терапевтическая вакцина/профилактика IBH у лошадей.

Одна молекула iMAT или комбинация молекул iMAT, содержащих различные антигенные модули в соответствии с настоящим изобретением, могут быть использованы для профилактического или терапевтического лечения лошадей, страдающих от или подвергшихся риску укусов насекомых, вызывающих IBH. Лошадям молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в подчелюстной лимфатический узел (Landholt и др., Vet. Rec. 2010, 167: 302-304). При использовании пальпации и/или под контролем УЗИ 25 G игла вводится в лимфатический узел. Инъецируемая молекула iMAT адсорбируется на адъюванте. Адъювант состоит, например, из фосфата алюминия (Adju-Phos®, Brenntag Biosector, Дания). Запасы молекулы iMAT представляли собой замороженный раствор с концентрацией 375 мкг/мл белка во флаконах, каждый из которых содержал 500 мкл, для размораживания перед использованием.

После оттаивания раствора молекулы iMAT 400 мкл раствора смешивали, например, с 200 мкл гелевой суспензии фосфата алюминия. Этот заключительный препарат оставляли при комнатной температуре в течение 60 мин перед внутрилимфатической инъекцией, чтобы обеспечить абсорбцию молекулы iMAT Adju-Phos®. Например, 200 мкл смеси, содержащей 50 мкг молекулы iMAT, переносили в шприц на 500 мкл для инъекции в лимфатический узел. Этот препарат вначале вводили, как правило, на 0-й день, 28-й день и 56-й день в дозе от 20 до 50 мкг молекулы iMAT (по отношению к весу одного или более антигенных модулей) на инъекцию.

На протяжении всего периода лечения и/или после него эффективность терапии или профилактики IBH может быть исследована клинически с помощью количественной, полуколичественной или качест-

венной оценки поражений кожи (например, сломанные волоски, алопеция, корки/расчесы и влажные участки). Интенсивность расчесывания/зуд может быть оценена в баллах.

Эти клинические параметры можно сравнить с клиническими симптомами индивидуальной лошади в предыдущих сезонах IBH и/или с тяжестью до начала терапевтического вмешательства. С другой стороны, сравнение с лошадьми, которые страдают от IBH и которые не подвергались обработке или были обработаны при использовании плацебо, может продемонстрировать эффективность лечения и/или профилактики клинических признаков IBH, опосредованных молекулой iMAT.

Свежая кровь, полученная от указанных лошадей, может быть использована в анализе *in vitro* провокации для 1-го типа аллергических реакций у лошадей, например, при использовании HRT или CAST® (подробнее см. пример 3 выше). Наблюдали уменьшенную дегрануляцию базофилов в ответ на провокацию при использовании определенных аллергенов *Culicoides*, например высвобождение гистамина и/или сульфидолеякотриенов после введения молекул iMAT по сравнению с ранее назначенной терапией и/или профилактическим эффектом.

В качестве альтернативы или в дополнение к интрадермальному провокационному анализу [Langner и др., *Vet. Immunol. Immunopathol* 2008, 122 (1-2): 126-37] определенные аллергены *Culicoides* могут быть использованы у указанных лошадей. Сниженная реакция (немедленная и/или поздняя фаза реактивности) указывает на терапевтический и/или профилактический эффект введения молекулы iMAT.

Кроме того, модуляцию различных компонентов иммунной системы можно контролировать, например изменение титров специфических для аллергена IgE и IgG антител может свидетельствовать о терапевтическом и/или профилактическом эффектах.

Помимо изменений уровня IgE, может быть неожиданно обнаружено увеличение специфического для аллергена IgG при лечении лошадей от IBH при использовании молекулы iMAT. Эти антитела могут блокировать опосредованную IgE анафилаксию *in vivo*, и, как предполагается, ингибировать не только индуцированное аллергеном высвобождение медиаторов воспаления из базофилов и тучных клеток, а также опосредованную IgE презентацию аллергена Т-клеткам. Среди индуцированных молекулами iMAT IgG антител, которые специфически связываются с аллергеном, некоторые специфические для аллергена подтипы, как предполагается, могут играть важную защитную роль, поскольку они конкурируют со специфическими для аллергена IgE антителами и могут предотвратить активацию CD4⁺ Т-клеток путем ингибирования опосредованной IgE презентации антигена. Кроме того, подмножество IgG, который секретируется, способствует значительному снижению количества тучных клеток и эозинофилов, что сопровождается уменьшением высвобождения медиаторов воспаления [Senna G. и др., *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2011, 11(4): 375-380].

Функциональный анализ "блокирования" IgG активности сыворотки, как определено путем подавления зависящего от FcεRI высвобождения гистамина базофилами [Niederberger V. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101: 14677-14682] и/или ингибирования зависящего от FcεRII (CD23) связывания комплексов IgE-аллерген с В-клетками, как оказывается, предлагает лучшее предсказание индивидуального клинического ответа [Wacholz P.A. и др., *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112: 915-922].

Специфическая для аллергена иммунотерапия может модулировать различные компоненты иммунной системы. Клеточные изменения включают в себя уменьшение индуцированной аллергеном пролиферации Т-клеток, что указывает на индукцию периферической толерантности в специфических для аллергена Т-клетках и уменьшение специфического для антигена Th2-доминирующего иммунного ответа в пользу реакции Th1 с увеличением продукции IFN-γ (Durham S.R. и др., *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996, 97: 1356-1365). Ключевой тип клеток, который отвечает за координацию этого иммунологического переключения, представляет собой гетерогенную популяцию Т-клеток, называемых регуляторными Т-клетками (T_{reg}). На клеточном уровне решающим фактором для успешной аллергенной иммунотерапии является периферическая индукция 1-го типа T_{reg} клеток. Функциональные исследования, которые проводили на T_{reg} клетках 1-го типа, специфических для узнавания антигенов, показали, что модуляция Th1 и Th2 ответов на T_{reg} клетки 1-го типа в основном зависит от секреции цитокина IL-10, который имеет иммуносупрессивные свойства. Действительно, IL-10 ингибирует пролиферативный ответ периферических Т-клеток против специфических аллергенов и играет центральную роль в индукции Т-клеточной анергии (James L.K., Durham S.R., *Clin. Exp. Allergy* 2008, 38: 1074-1088). *In vitro* IL-10 усиливает экспрессию регуляторного фактора FoxP3, модулирует функцию эозинофилов и снижает количество провоспалительных медиаторов, которые высвобождаются тучными клетками (Mobs C., и др., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2008, 147: 171-178).

Другой возможный маркер исключительно хорошей клинической эффективности указанной иммунотерапии, опосредованной молекулами iMAT, представляет собой определение изменения количества или характера специфических для аллергена Т-клеток. В соответствии с этим, например, исследование окрашивания Bet v1 тетрамера, уровней и характеристик циркулирующих специфических для пыльцы березы CD4⁺ Т-клеток может потенциально сопоставляться с таковыми до и после SIT (van Overtvelt L. и др., *J. Immunol.* 2008, 180: 4514-4522). В последнее время трансформирующий фактор роста (TGF)-β также был определен в качестве ключевого цитокина в успешном осуществлении SIT. Многие действия могут быть учтены для определения его релевантности, такие как подавление специфических Th1, Th2 и

Th17 клеток, индукция FoxP3 и супрессорной функции T_{reg} . Кроме того, TGF- β подавляет экспрессию Fc ϵ R1 на клетках Лангерганса и подавляет синтез IgE (Akdis C.A., Akdis M.J., Allergy Clin. Immunol. 2009, 123: 735-746).

Пример 5. Сравнение молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением с молекулой MAT уровня техники в соответствии с WO 2004/035793 (эквивалентная заявка США US 2005/0281816).

Для оценки чистоты белка MAT проводили электрофорез в полиакриламидном геле при использовании додецилсульфата натрия (SDS-ПАГЭ) (Thompson J. и др., J. Biol. Chem. 2002, 277: 34310-343). Способ, включающий подготовку образцов в присутствии восстанавливающего агента додецилсульфата лития (LDS) и нагревание при 75°C, приводит к получению воспроизводимых нескольких четких полос после электрофоретического разделения. Окрашивание при использовании Кумасси голубого дает линейные количественные (денситометрия) характеристики гелей, загруженных 200-1000 нг белка. При использовании моноклонального антитела, определяющего аллергенный модуль в молекуле MAT с Fel d1 в качестве аллергенного модуля (MAT-Fel d1), было показано, что основная полоса и 13 мелких полос все содержат белок MAT-Fel d1. Небольшие полосы мигрируют в том же положении, что и на исходном геле, также после повторной загрузки на гель (фиг. 2). Несколько различных методов, таких как различные режимы температуры и прописи состава буфера для подготовки образца перед началом ПАГЭ, обеспечивают получение одного и того же изображения полосы.

Во всех этих полосах наличие белка MAT-Fel d1 полной длины (цельный) и только следов белков клетки-хозяина может быть продемонстрировано после того, как каждую полосу вырезают из геля, переваренного трипсином, и затем подвергают анализу с помощью масс-спектрометрии (нано ЖХ/ЭРИ-МС). Из этих экспериментов можно сделать вывод об аномальной особенности (сдвиг геля), например, различных вариантов сворачивания MAT-Fel d1 в SDS-ПАГЭ. Это означает, что MAT-Fel d1 в анализируемом препарате не является приемлемым в качестве биофармацевтической молекулы, в частности, для клинического и/или коммерческого биофармацевтического производства, так как его чистота не может быть определена с помощью стандартных методов (например, SDS-ПАГЭ), но только с помощью модифицированной процедуры, описанной выше.

В отличие от этого явления сдвига геля MAT-Fel d1 молекулы Fel d1 как таковой не проявляет такую аномальную функцию в SDS-ПАГЭ (фиг. 3, дорожки 2 и 3). Fel d1 демонстрирует одну четкую полосу при ожидаемой молекулярной массе (19,6 кДа).

Еще одну аномальную особенность можно наблюдать при анализе при использовании ВЭЖХ с обратной фазой. Ни одного пика MAT-Fel d1 не наблюдали в данном аналитическом методе (фиг. 4), а также не наблюдали ни одного белка как в нативной конформации, так и в денатурированной форме, индуцированной хаотропными и восстанавливающими условиями. Тем не менее, для GMP сертифицированного биофармацевтического изготовления наличие одной изоформы биомолекулы в продаваемых фармацевтических препаратах является обязательным.

Эти наблюдения в SDS-ПАГЭ и анализе ВЭЖХ с обратной фазой можно объяснить физико-химическими свойствами на основе аминокислотной последовательности. Анализ диаграммы гидрофобности Кайт и Дулитл [Kyte J., Doolittle R.F., Journal of Molecular Biology 1982, 157(1), 105-132] выявил соседние крайние гидрофобные и гидрофильные домены (фиг. 5), которые могут быть ответственны за это аномальное поведение.

В частности, гидрофобный участок нацеливающего домена слитого белка является подобным трансмембранным сегментам мембранных белков, которые являются известными в данной области техники, чтобы вызвать такую аномальную функцию [Rath A. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009, 106(6): 1760-1765].

Миграция на SDS-ПАГЭ, которая не коррелирует с молекулярной массой формулы, называемая "сдвиг геля", как представляется, является общей для мембранных белков. Это означает, что предписанный метод SDS-ПАГЭ, который представляет собой разделение молекул исключительно в соответствии с их молекулярной массой, независимо от их нативной 2D- или 3D-структуры, не применяется в этих случаях. В приведенной выше работе (PNAS статья) авторы исследуют аномальную подвижность геля для спиральных мембранных белков при использовании библиотеки дикого типа и мутантных последовательностей спираль-петля-спираль ("шпилька"), которые имеют происхождение от трансмембранных сегментов 3 и 4 муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости человека (CFTR), включая связанные с болезнью фенотипические замены остатков. Они обнаружили, что эти шпильки мигрируют при скоростях от минус 10 до плюс 30% по сравнению с молекулярными массами в соответствии с фактическими формулами на основе SDS-ПАГЭ, и загружали детергент при соотношении от 3,4-10 г SDS/г белка. Кроме того, они показали, что сдвиги мутантных гелей сильно коррелируют с изменениями в грузочной способности шпильки SDS и со спиральностью шпильки, что свидетельствует о том, что поведение сдвига геля возникает при измененном связывании детергента. В некоторых случаях эта дифференциальная сольватация при использовании SDS может быть результатом замещения контактов белок-детергент контактами белок-белок, что подразумевает тот факт, что связывание детергента и свертывание являются тесно связанными друг с другом.

SDS-ПАГЭ (фиг. 6), а также анализ ВЭЖХ с обратной фазой (фиг. 4 и 7) MAT и iMAT белков вы-

явили существенные различия в модели миграции или элюирования соответственно. Окисленные формы MAT-Fel d1 не показал ни одной четкой полосы на геле SDS-ПАГЭ (дорожка 3), но продемонстрировали несколько размытых полос с большими и меньшими кажущимися молекулярными массами, чем фактическое значение 32,2 кДа для MAT-Fel d1. В отличие от этого, молекула iMAT-Cul o4 продемонстрировала одну четкую полосу ($M=41,6$ кДа) в условиях окисления. Кроме того, хроматограмма ВЭЖХ с обратной фазой показала единственный пик (фиг. 7).

При восстанавливающих условиях молекула MAT-Fel d1 в SDS-ПАГЭ выявила основную полосу, которая мигрировала при приблизительно известной молекулярной массе, но в дополнение к этому вновь возникало несколько минорных полос, описанных на фиг. 2, которые были известны как такие, которые содержат полную последовательность MAT-Fel d1 (фиг. 6, дорожка 6). Это признак, который является характерным для аномальной особенности MAT-Fel d1. В дополнение к этому хроматограмма ВЭЖХ с обратной фазой для MAT-Fel d1 при восстанавливающих условиях (фиг. 4, правый график) демонстрирует по крайней мере 3 различных изоформа MAT-Fel. В противовес этому молекулы iMAT выявляют характеристики, которые, очевидно, являются показательными для единственного изоформа в SDS-ПАГЭ (фиг. 6, дорожка 7), а также в ВЭЖХ с обратной фазой (фиг. 7).

Восстанавливающие условия приводят к расщеплению дисульфидных мостиков в молекуле MAT, и, таким образом, молекулы MAT и iMAT должны вести себя подобным образом при восстанавливающих условиях, если дисульфидные мостики являются ответственными исключительно за аномальные характеристики MAT. Тем не менее, это не так, поскольку аномальный сдвиг геля и появление изоформ в ВЭЖХ с обратной фазой при исследовании молекулы MAT по-прежнему присутствует при восстанавливающих условиях.

Тем не менее, молекула iMAT не проявляет такого сдвига геля и имеет пик в хроматограмме ВЭЖХ с обратной фазой в нативной (окисленной) форме белка. Кроме того, диаграммы гидрофобности Кайт и Дулиттл (Kyte, J. and Doolittle, R. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132) молекул MAT и iMAT практически идентичны на N-терминальном конце, охватывающем последовательность His-метки, TAT и нацеливающего домена (фиг. 11). Таким образом, специалист в данной области техники не будет мотивирован конструировать молекулу MAT в соответствии с известным уровнем техники с остатками цистеина, замещенными другими аминокислотными остатками, с тем, чтобы преодолеть недостатки известного уровня техники.

Три полученные молекулы iMAT были сконструированы в соответствии с процедурами "биоинформационного инжиниринга" в соответствии с примером 6, приведенным ниже, и получены с помощью рекомбинантной технологии экспрессии в *E.coli*. Все три молекулы iMAT были стабильными в буфере (20 mM цитрата, 1M аргинина, pH 6,0), после двукратного замораживания и оттаивания и могут быть адсорбированы на Adju-Phos® (Brenntag, Дания) в качестве адьюванта, так что молекулы iMAT могут быть использованы в качестве вакцины. Эти белки могут быть десорбированы из Adju-Phos® при отсутствии деградации в той же буферной системе (фиг. 9).

Пример 6. "Биоинформационный инжиниринг" молекулы iMAT для нацеливания на IBH у лошадей.

Для того чтобы, например, эффективно лечить лошадей с аллергической гиперчувствительностью на укусы насекомых (IBH) при использовании технологии iMAT, дополнительно является обязательным:

а) выбрать белок *Culicoides* в качестве модуля аллергена в молекуле iMAT, который представляет собой основной аллерген и, таким образом, имеет высокую распространенность, чтобы вызывать гиперчувствительность у пораженных лошадей и, таким образом, также может быть мишенью для индукции толерантности, и

б) сконструировать молекулу iMAT с указанными основными аллергенами, которая является термодинамически стабильной и может быть эффективно получена при использовании белкового инжиниринга и может подвергаться дополнительному анализу с помощью стандартных способов для того, чтобы обеспечить достаточно высокое качество (то есть, идентичность, чистоту и эффективность).

Для выполнения этих требований был выбран биоинформационный подход к выбору аллергена, подлежащего включению в молекулу iMAT в соответствии с настоящим изобретением. Целью отбора было (i) выбрать один или более аллергенов, которые предполагаются как релевантные для IBH, т.е. чтобы большинство лошадей, страдающих от IBH, подвергалось сенсибилизации в отношении соответствующего аллергена, и (ii) выбрать аллерген с наибольшей вероятностью включения характеристик линейных эпитопов аллергена, т.е. включения большого числа коротких пептидных последовательностей (от 7 до 13 аминокислотных остатков), гомологичных таковым для опубликованных аллергенов.

В настоящее время около 230 белков из *Culicoides* (*Culicoides sonorensis*, *Culicoides nubeculosus*, *Culicoides obsoletus*), обнаруженные в слюне, являются известными как такие, которые могут потенциально вызвать аллергию у субъектов, например лошадей. Для того чтобы выбрать соответствующие антигены для фармацевтических препаратов, было выбрано сравнение гомологии на основе локальных выравниваний с последовательностями известных аллергенов, отличных от таковых *Culicoides*. Часто обнаружение эпитопа для распознавания антителом (в основном конформационные эпитопы) достигается за счет функционального анализа (например, микрочипы), а для эпитопов Т-клеток (линейные эпитопы) путем подсчета вероятности связывания пептида с МНС молекулами. Терапевтический принцип iMAT техно-

логии, среди прочих, основывается на эндоцитозе и деградации под действием кислотно-зависимых протеаз в эндосомах с последующим связыванием классом II МНС и презентацией антигена.

У лошадей характеристики таких систем в настоящее время не полностью изучены, так как разнообразие аллелей лошадиных МНС генов гораздо меньше исследованы по сравнению с системой человека и, таким образом, не являются легко доступными для экспериментов. Кроме того, исследование IBH в качестве аллергии типа I и каузальных аллергенов, которые вызывают симптомы, только недавно началось. Первый белок, охарактеризованный как такой, который обладает активностью аллергена в эффекторных клетках (т.е. базофилах, гранулоцитах) не был описан до 2008 года [Langner и др., *Vet Immunol Immunopathol* 2008, 122(1-2): 126-137].

Таким образом, другой - не экспериментальный, но биоинформационный - подход был выбран для отбора аллергена, который основывается на локальных поисках гомологии пептидов, которые имеют происхождение от белков *Culicoides*, по отношению к известным аллергенным белкам, которые не относятся к *Culicoides*, большинство из которых, как известно, вызывают аллергию у людей. Аминокислотные последовательности белков, которые предполагаются как такие, которые имеют аллергенные свойства, были экспортированы из общедоступных баз данных (например, UNIPROT) и избыточность была определена путем анализа гомологии последовательностей в экспортируемом наборе данных. Высоко гомологичные аналоги последовательности были устранены, и полученные оставшиеся последовательности служили в качестве канонической базы данных последовательностей вероятных допустимых антигенов для последующего анализа. Для определения белков *Culicoides* с путативно высоким аллергенным потенциалом, белки *in silico* подвергали расщеплению на пептиды с длиной от 6 до 15 аминокислот со смещением одной аминокислоты.

Проводили последующее попарное выравнивание для каждого белка *Culicoides* и соответствующих пептидов с базой данных канонических последовательностей. После этого проводили масштабирование полученных при выравнивании совпадений путем установки балла самовыравнивания данного белка *Culicoides* на уровне единицы и совпадений при выравнивании соответствующих пептидов соответственно. Далее количество соответствий при выравнивании, которые превышали заданный порог, подсчитывали для каждого, и сравнивали пептид путем локального попарного выравнивания для случайно сгенерированных баз данных белковых последовательностей без известных аллергенных свойств, а затем подвергали масштабированию и подсчету. Полученные значения для "неаллергического белка" вычитали из таких результатов для аллергена, и подсчитывали кумулятивные баллы совпадений для каждого белка *Culicoides* на основе количества совпадений для всех соответствующих пептидов (фиг. 12). Белки с самыми высокими значениями были выбраны в качестве кандидатов для антигенного модуля iMAT.

Для валидации биоинформационного метода отбора антигена измеряли наличие сенсибилизации против пяти аллергенов *Culicoides* у 13 лошадей, страдающих от клинически диагностированной IBH. Все отобранные антигены были исследованы при использовании полуколичественного функционального *ex vivo* эксперимента на основе не специфического для аллергена высвобождения гистамина из базофилов лошади, изолированных из образцов крови (тест высвобождения гистамина = HRT, подробная информация о тесте: смотри пример 2). Рекомбинантные аллергены исследовали в 3 концентрациях, и значение балла для каждого аллергена колебалась от 0 (отсутствие сенсибилизации) до 6 (самый высокий уровень сенсибилизации). Данные, полученные от всех 13 лошадей, были сопоставлены с результатами биоинформационных расчетов (фиг. 8).

Этот анализ демонстрирует превосходную общую корреляцию ($r=0,97$) между сенсибилизацией (суммарные значения баллов для каждого аллергена группы) и прогнозируемым баллом. Из этого корреляционного анализа мы приходим к выводу, что биоинформационный метод выбора антигена является приемлемым для того, чтобы выбрать соответствующие аллергены *Culicoides* для антигенного модуля в молекуле iMAT. Таким образом, подверженных IBH лошадей можно лечить с помощью молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением, включающей выбранные аллергены, для того, чтобы вызвать толерантность в отношении этих аллергенов с высокой вероятностью у значительной части подгруппы больных субъектов.

Три аллергена были выбраны на основе биоинформационного анализа как такие, которые подлежат включению в три различные молекулы iMAT, т.е. Cul o3, Cul o2 и Cul o4.

Каждый из отобранных аллергенов интегрировали в отдельную iMAT молекулу в качестве антигенного модуля и после этого оптимизировали для термодинамической устойчивости путем итеративного моделирования трехмерной структуры белков и вычисление изменений свободных энергий после замены единичных аминокислот. Физико-химические свойства и стабильность подвергались влиянию путем замены различных аминокислотных остатков в пределах первичной аминокислотной последовательности.

Результаты описанных в данной заявке анализов (поиск антигена и моделирование) были трансформированы в аминокислотные последовательности iMAT, приемлемые для фармакологического производства и применения у лошадей для лечения, например, IBH.

Пример 7. Конструирование мозаичной молекулы iMAT в соответствии с изобретением.

Предполагается, что молекула iMAT в соответствии с изобретением может быть дополнительно

улучшена, если компонент более чем одного аллергена является включенным в антигенный модуль. Для этой цели можно применять основной принцип описанного выше биоинформационного подхода к отбору (пример 6) иным образом. Вместо отбора полных аллергенов на основе подсчета совпадений пептидов аллергенов, обнаруженных в базе данных аллергенов, только наиболее часто встречающиеся пептиды нескольких из таких аллергенов используются для конструирования антигенного модуля iMAT. Таким образом, такая iMAT молекула состоит из пептидов антигенного модуля, которые имеют происхождение от нескольких аллергенов. Это позволяет расширить спектр одной молекулы iMAT по отношению к ее целевому аллергическому профилю и, таким образом, это является полезным для разработки фармакологического препарата.

Для того чтобы найти короткие пептидные последовательности, которые соответствуют критериям для такого мозаичного iMAT белка, 230 белков из видов *Culicoides* (*Culicoides sonorensis*, *Culicoides nubiculosus*, *Culicoides obsoletus*), обнаруженные в слюне, были проанализированы путем сравнения гомологии, как описано выше (см. пример 6). Вкратце, *in silico* расщепленные белки из *Culicoides* с длиной пептида 6-15 аминокислотных остатков были локально подвергнуты выравниванию с базой данных канонических последовательностей связанных с аллергенами белков и случайным образом сгенерированной базой данных, не связанных с аллергией белков. Определяли ряд отличий существенных гомологий для каждого пептида, найденного в канонической базе данных. Впоследствии каждый пептид подвергали локальному выравниванию со случайным образом сгенерированной базой данных увеличивает втрое размер канонической базы данных, чтобы уменьшить число ложных положительных совпадений. Верхняя часть (например, десятый процентиль) оставшихся гомологий для каждой длины пептида является особенно приемлемой для того, чтобы служить в качестве основы для проведения конструирования мозаичных или гибридных молекул iMAT, которые несут аллерген. Для конструирования мозаичной молекулы iMAT белка выбирали предшественника (например, из списка белков-предшественников, занимающих верхние позиции рейтинга) в качестве каркасного белка для введения пептидов топ рейтинга. При этом удаляется сигнальная пептидная последовательность из каркасного белка, и пептиды топ рейтинга с дополнительными смежными N- или C-терминальными аминокислотами могут встраиваться в исходную последовательность каркасного белка или могут заменять части исходной последовательности каркасного белка. Положение для вставки или замены определяется при использовании подобия или референтного положения пептида в соответствующем белке предшественника. В качестве следующего шага, добавляются His-метка, ТАТ и домен нацеливания. В завершение, остатки цистеина заменяются наиболее стабилизирующими остатками, как описано выше.

В типичном случае этого подхода белок слюны *Culicoides sonorensis* (номер доступа базы данных UniProt "Q66U13") был использован в качестве каркасного белка. Наиболее аллергенная структура внутри белка была определена для того, чтобы сохранить эту часть последовательности. Сигнальный пептид последовательности удаляется, и далее прибавляются последовательности из базы данных UniProt с номерами доступа "Q5QB19", "Q5QVK6", "Q5QBL6", "Q5QBJ4" и "Q5QBI2". После этого мозаичный аллерген интегрируют в общую структуру молекулы iMAT. В завершение, остатки цистеина заменяют другими аминокислотными остатками, предпочтительно остатками серина, лейцина, изолейцина и/или аспарагиновой кислоты, которые не снижают стабильности сконструированной молекулы iMAT (слитый белок).

SEQ ID NO: 17 показывает полную последовательность типичной мозаичной (гибридной) молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением [аминокислотный остаток 1: N-терминальный метионин, аминокислотные остатки 2-7: His-метка, аминокислотные остатки 8-18: ТАТ последовательность, аминокислотные остатки 19-128: домен нацеливания, аминокислотные остатки 129-333: гибридный аллерген (каркасный белок Q66U13 без сигнального пептида и встроенных/замененных последовательностей; встроенные/замененные последовательности: аминокислотные остатки 137-151: Q5QB19; аминокислотные остатки 155-166: Q66U13; аминокислотные остатки 185-200: Q5QVK6; аминокислотные остатки 215-229: Q5QBL6; аминокислотные остатки 235-250: Q5QBL6; аминокислотные остатки 265-278: Q5QBJ4; аминокислотные остатки 318-333: Q5QBI2; замененные цистеины (серин): 46, 146, 158, 173, 222, 225, 246, 273, 283, 329; замененные цистеины (лейцин): 295; замененные цистеины (изолейцин): 299; замененные цистеины (аспарагиновая кислота): 181].

Пример 8. Терапевтическая вакцина/профилактика рецидивирующей обструкции дыхательных путей (RAO) у лошадей.

Одна молекула iMAT или комбинация молекул iMAT, содержащих различные антигенные модули в соответствии с настоящим изобретением, могут быть использованы для профилактического или терапевтического лечения лошадей, страдающих от или подвергшихся риску RAO и/или от RAO, связанного с летним пастбищем. Лошадям молекулу iMAT в соответствии с настоящим изобретением можно вводить так, как описано в примере 4.

Будут использоваться взрослые лошади с известной историей RAO. До начала лечения лошадей подготавливают, например приучают стоять в стойле в маске, чтобы иметь возможность осуществлять полный медицинский осмотр дыхательных путей, в том числе измерения с помощью пневмотахографа, эндоскопию дыхательных путей и бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) для анализа, например, процент

нейтрофилов в жидкости БАЛ. Осуществляют полный анализ крови и исследуют биохимический профиль, чтобы исключить наличие сопутствующих заболеваний.

Следующие параметры могут быть исследованы для изучения дыхательной системы и для измерения эффективности терапевтического и/или профилактического лечения при использовании молекулы iMAT: изменение переменных функции легких, например частоты дыхания, максимального транспульмонального давления, сопротивления легких, эластичности легких. Кроме того, параметр может быть включен во взвешенную систему клинических показателей, например, также оцениваются клинические баллы дыхательного усилия/подъема живота, выделения из носа и/или раздувание крыльев носа, кашель и/или патологические звуки легких, бронхов и/или трахей.

Таким образом, на протяжении всего периода лечения и/или после него эффективность терапии или профилактики RAO может быть исследована клинически при использовании количественных, полуколичественных или качественных оценок.

Эти клинические параметры можно сравнить с клиническими признаками индивидуальной лошади в предыдущие сезоны и/или с тяжестью до начала терапевтического вмешательства. Альтернативно, сравнение со страдающими от RAO лошадьми, которые не подвергались обработке или были обработаны при использовании плацебо, может продемонстрировать эффективность опосредованного молекулой iMAT лечения и/или профилактики клинических признаков RAO.

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) и/или свежая кровь, полученная от указанных лошадей, могут быть использованы в *in vitro* провокационном тесте для 1-го типа аллергических реакций у лошадей, например, при использовании HRT или CAST® (подробнее см. пример 2 и/или Hare и др., *Can. J. Vet. Res.* 1998; 62: 133-139). Снижение количества легочных тучных клеток и/или дегрануляции базофилов в ответ на провокацию при использовании определенных аллергенов, например, высвобождение гистамина и/или сульфидолеякотриена после лечения с помощью молекулы iMAT, по сравнению с таковым до лечения указывает на терапевтический и/или профилактический эффект.

Альтернативно или дополнительно, применение определенных рекомбинантных аллергенов в интрадермальном провокационном тесте, инъекционной кожной пробе или также специфических для аллергена IgE и/или IgG определений в БАЛ жидкости или сыворотке можно подвергать мониторингу у указанных лошадей (Tilley P. и др., *J. Equine Vet. Sci.* 2012, 32: 719-727). Сниженный ответ (немедленная и/или замедленная реактивность) и/или изменение титров антитела свидетельствуют о терапевтическом и/или профилактическом эффектах молекулы iMAT, используемой для лечения.

Ссылки.

- (1) Akdis CA, Akdis MJ, *Allergy Clin Immunol* 2009, 123: 735–746
- (2) Allergome (www.allergome.org)
- (3) Durham SR и др., *J Allergy Clin Immunol* 1996, 97: 1356–1365
- (4) Gadermaier G и др., *Molecular Immunology* 2010, 47: 1292–1298
- (5) Ginel PJ и др., *Vet. Dermatol.* 2014, 25(1): 29-e10
- (6) Hare JE и др., *Can J Vet Res* 1998, 62: 133–139
- (7) James LK, Durham SR, *Clin Exp Allergy* 2008, 38: 1074–1088
- (8) Kaul, S., Type I allergies in the horse: Basic development of a histamine release test (HRT). Doctoral thesis. Veterinary School Hannover 1998, Germany
- (9) Kehrli D et al, *J Vet Intern Med* 2015, 29(1): 320–326
- (10) Kelley J и др., *Immunogenetics* 2005, 56: 683–695
- (11) Klein JS и др., *Protein Eng Des Sel* 2014, 27(10): 325–330
- (12) Kyte J, Doolittle RF, *Journal of Molecular Biology* 1982, 157(1): 105–132
- (13) Landholt GA и др., *Vet Rec* 2010, 167: 302–304
- (14) Langner K и др., *Vet Immunol Immunopathol* 2008, 122(1–2):126–137
- (15) Leclerc M и др., *Respirology* 2011, 16: 1027–1046
- (16) Martínez-Gómez JM и др., *Allergy* 2009, 64(1): 172–178
- (17) Mobs C, и др., *Int Arch Allergy Immunol* 2008, 147: 171–178
- (18) Niederberger V и др., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101: 14677–14682
- (19) Olsen L и др., *Vet.J.* 2011, 187: 347–351
- (20) Pires DE и др. *Bioinformatics* 2014,30(3): 335–342
- (21) Pirie RS, *Equine Vet J* 2014, 46: 276–288
- (22) Rath A и др., *PNAS* 2009, 106(6): 1760–1765
- (23) Report of the 3rd Havemeyer workshop on allergenic diseases of the Horse, Hólar, Iceland, June 2007, *Veterinary Immunology and Immunotherapy* 2008, 126: 351–361
- (24) Rose H, Arb Paul Ehrlich Inst Bundesinstitut Impfstoffe Biomed Arzneimittel Langen Hess 2009, 96: 319–327
- (25) Schaffartzik A и др., *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2012, 147: 113–126
- (26) Senna G и др., *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2011, 11(4): 375–380
- (27) Senti G и др., *J Allergy Clin Immunol.* 2012, 129(5): 1290–1296
- (28) SIAF Annual Report 2010
- (29) SIAF Annual Report 2011
- (30) Tilley P и др., *J Equine Vet Sci* 2012, 32: 719–727
- (31) US 2005/0281816
- (32) US 2014/0105906
- (33) US 7,653,866
- (34) van Barges, K and Haas, A. *FEMS Microbiol Rev* 2009, 33: 870–891
- (35) van der Meide N и др., *Vet J* 2014, 200: 31–37
- (36) van Overtvelt L и др., *J Immunol* 2008, 180: 4514–4522
- (37) Vazquez-Boland, JA и др., *Vet Microbiol* 2013, 167: 9–33
- (38) Wacholz PA и др., *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 915–922
- (39) WO 2004/035793

В списке последовательностей

SEQ ID NO: 1 относится к приемлемой минимальной аминокислотной последовательности для одного транслокационного модуля в соответствии с настоящим изобретением, который все еще остается функциональным, т.е. является способным эффективно способствовать поступлению в клетку;

SEQ ID NO: 2 относится к полной аминокислотной последовательности инвариантной цепи лошадей;

SEQ ID NO: 3 относится к полной аминокислотной последовательности Cul n4 аллергена;

SEQ ID NO: 4 относится к полной аминокислотной последовательности Cul o1 аллергена;

SEQ ID NO: 5 относится к полной аминокислотной последовательности Cul o2 аллергена;

SEQ ID NO: 6 относится к полной аминокислотной последовательности Cul o3 аллергена;

SEQ ID NO: 7 относится к Cul n4 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 8 относится к Cul n4 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 9 относится к Cul o1 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 10 относится к Cul o1 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 11 относится к Cul o2 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 12 относится к Cul o2 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 13 относится к Cul o3 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 14 относится к Cul o3 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 15 относится к специфическому фрагменту аминокислотной последовательности инвариантной цепи лошадей с поддерживаемой функцией внутриклеточного транспорта;

SEQ ID NO: 16 относится к специфическому фрагменту аминокислотной последовательности инвариантной цепи лошадей с поддерживаемой функцией внутриклеточного транспорта;

SEQ ID NO: 17 относится к цельной последовательности типичной мозаичной молекулы iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 18 относится к полной аминокислотной последовательности Cul o4 аллергена;

SEQ ID NO: 19 относится к полной аминокислотной последовательности Cul o7 аллергена;

SEQ ID NO: 20 относится к Cul o4 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 21 относится к Cul o4 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 22 относится к Cul o7 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением;

SEQ ID NO: 23 относится к Cul o7 молекуле iMAT в соответствии с настоящим изобретением.

Все ссылки на документы уровня техники, представленные в данной заявке, а также список последовательностей, сопровождающих данную заявку, являются введенными в данную заявку независимо друг от друга в качестве ссылки во всей своей полноте.

1. Изолированный рекомбинантный белок, содержащий, по крайней мере, первый модуль, который позволяет осуществлять транспорт рекомбинантного белка из внеклеточного пространства внутрь клетки, по крайней мере, второй модуль, который позволяет осуществлять транспорт рекомбинантного белка внутриклеточно к органеллам, которые являются вовлеченными в процессинг антигенов или нагрузку МНС молекул антигенами, и, по крайней мере, антигенный модуль, который определяет специфичность иммунного ответа, модулированного с помощью рекомбинантного белка у индивидуума, посредством чего эти модули являются связанными ковалентно друг с другом и необязательно содержат спейсерные модули между по крайней мере одним из указанных модулей, где

а) первый модуль представляет собой аминокислотную последовательность, которая позволяет осуществлять транслокацию из внеклеточного пространства внутрь клеток,

б) второй модуль представляет собой аминокислотную последовательность, которая позволяет осуществлять специфическое для видов нацеливание рекомбинантного белка внутриклеточно на органеллы, которые являются вовлеченными в процессинг антигенов или нагрузку МНС молекул антигенами,

в) антигенный модуль представляет собой аминокислотную последовательность, которая имеет происхождение по крайней мере от одного эпитопа антигена, который является аллергеном,

в соответствии с чем, по крайней мере, в этом антигенном модуле по крайней мере один остаток цистеина является замененным на серин или отличный аминокислотный остаток в указанном изолированном рекомбинантном белке.

2. Изолированный рекомбинантный белок в соответствии с п.1, где в указанном антигенном модуле или в целом изолированном рекомбинантном белке все остатки цистеина являются замененными с помощью отличного аминокислотного остатка.

3. Изолированный рекомбинантный белок в соответствии с п.1 или 2, где остатки цистеина являются замененными с помощью остатков серина.

4. Изолированный рекомбинантный белок в соответствии с п.1 или 2, где второй модуль представляет собой инвариантную цепь лошади, подобной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 15, 16, и/или антигенный модуль содержит эпитоп, который имеет происхождение от аллергена, который вызывает аллергию у лошадей.

5. Изолированный рекомбинантный белок в соответствии с п.1 или 2, где антигенный модуль со-

держит по крайней мере один эпитоп аллергена, который имеет происхождение от насекомых, которые питаются кровью, в частности от подрода *Culicoides*.

6. Изолированный рекомбинантный белок в соответствии с одним из предыдущих пунктов, где аллерген представляет собой по крайней мере один из Cul n4, Cul o1, Cul o2 или Cul o3 аллергенов.

7. Рекомбинантный белок в соответствии с одним из предыдущих пунктов, который дополнительно содержит модуль метки, подобный His-метке, где модуль метки может присутствовать на N-терминальном конце и/или C-терминальном конце.

8. Изолированный рекомбинантный белок в соответствии с одним из предыдущих пунктов, где первый модуль представляет собой HIV-tat, VP22 или Antennapedia или их частичную последовательность, которая является функциональной в качестве модуля для транслокации.

9. Изолированный рекомбинантный белок в соответствии с одним из предыдущих пунктов, который находится в форме мономера.

10. Изолированный рекомбинантный белок в соответствии с одним из предыдущих пунктов, который является представленным в линейной форме.

11. Изолированный рекомбинантный белок в соответствии с одним из предыдущих пунктов, включающий или состоящий из любой из последовательностей SEQ ID NO: 7-14.

12. Изолированный рекомбинантный белок в соответствии с одним из предыдущих пунктов для применения в качестве фармацевтической композиции.

13. Изолированный предложенный белок для применения в соответствии с п.12, где указанная фармацевтическая композиция представляет собой вакцину.

14. Изолированный рекомбинантный белок для применения в соответствии с любым из пп.12, 13, предназначенный для сублингвального применения, подкожной или интрадермальной инъекции, инъекции в лимфатический узел или для введения через слизистую оболочку, в частности через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта или респираторной системы.

15. Нуклеиновая кислота, которая кодирует изолированный рекомбинантный белок в соответствии с любым из пп.1-11.

16. Вектор, который включает, по крайней мере, последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с п.15.

17. Первичные клетки или линия клеток, включающая, по крайней мере, вектор, как заявлено в п.16, или нуклеиновую кислоту в соответствии с п.15.

18. Способ идентификации аминокислотных замен в предварительно определенной аминокислотной последовательности, позволяющих осуществить стабилизацию указанной предварительно определенной аминокислотной последовательности, включающий этапы:

- i) моделирование третичной структуры целевого белка;
- ii) итеративное определение стабильности на основе точечных мутаций, подобных замене цистеина на отличный аминокислотный остаток, и классификации для определения стабилизирующих замен путем анализа доступных трехмерных структур;
- iii) повторного моделирования новой структуры и подтверждение стабильности путем повторения этапа i) и ii).

19. Способ в соответствии с п.18, где на этапе ii) оценивают изменение свободной энергии свертывания.

20. Способ в соответствии с п.18 или 19, где на этапе ii) количество возникновений специфических замен использует систему подсчета, которая классифицирует замену на основе возникновений в используемых моделях и изменения свободной энергии стабильности белка AAG.

21. Рекомбинантный белок в соответствии с любым из пп.1-11, который получен с помощью способа в соответствии с любым из пп.18-20.

22. Рекомбинантный белок в соответствии с любым из пп.1-14 для предотвращения и/или терапии гиперчувствительности на укус насекомого у животных, которые представляют собой лошадей.

Перечень последовательностей

<110> БЕРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДИКА ГМХХ

<120> УЛУЧШЕННЫЕ ТРАНСПОРТНЫЕ МОЛЕКУЛЫ МОДУЛЯРНОГО
АНТИГЕНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

<130> P01-3045 PCT+FF

<150> EP14162575.6

<151> 2014-03-31

<160> 23

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> Белок

<213> Синтетический пептид

<400> 1

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 2

<211> 208

<212> Белок

<213> Equus caballus

<400> 2

Met Glu Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val Pro Ile
1 5 10 15

Leu Gly Gln Arg Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Cys Ser Arg Gly Ala
20 25 30
Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln
35 40 45

Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys
50 55 60

Leu Thr Val Thr Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg Met Lys
65 70 75 80

Leu Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala Thr Pro
85 90 95

Met Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly Pro Met
100 105 110

Gln Asn Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Thr Thr Gln Asp His Val Met His
115 120 125

Leu Leu Leu Arg Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Gln Leu Lys Gly
130 135 140

Ser Phe Gln Glu Asn Leu Lys His Leu Lys Ser Thr Met Asp Gly Leu
145 150 155 160

Asp Trp Lys Val Phe Glu Asn Trp Met His Gln Trp Leu Leu Phe Glu
165 170 175

Met Ser Arg Asn Ser Leu Glu Glu Lys Pro Thr Gln Gly Pro Thr Lys
180 185 190

Glu Pro Leu Glu Ile Glu Asp Leu Ser Ser Gly Val Gly Met Ala Lys
 195 200 205

<210> 3
 <211> 152
 <212> Белок
 <213> Culicoides spec.

<400> 3

Met Lys Phe Pro Thr Phe Leu Ile Leu Ala Phe Phe Leu Ser Leu Tyr
 1 5 10 15

Ile Ser Ser Thr Ala Ser Arg Arg Lys His Phe Arg His Leu Lys Arg
 20 25 30

Ile Glu Ala Ala Asn Asp Cys Pro Ala Lys Asn Ser Gly Thr Tyr Gln
 35 40 45

Lys Val Cys Lys Gln Leu Gln Lys Tyr Tyr Val Leu Thr Pro Asp Asp
 50 55 60

Lys Leu Gly Ser Tyr Leu Lys Gly Gly Leu Gln Glu Ala Ala Asn Arg
 65 70 75 80

Val Leu Thr Pro Val Ser Lys Ser Asp Lys Ile Thr Phe Asp Ile Val
 85 90 95

Gln Asn Cys Leu Lys Asn Phe Gln Val Met Val Asn Lys His Asn Lys
 100 105 110

Glu Ala Leu Arg Lys Tyr Arg Glu Cys Lys Lys Glu Cys Phe Thr Glu
 115 120 125

Val Gly Lys Glu Phe Ser Ser Ala Leu Asp Lys Thr Gly Val Gln Ile
 130 135 140

Ala Glu Cys Leu Asn Glu Ser Leu
 145 150

<210> 4
 <211> 205
 <212> Белок
 <213> Culicoides spec.

<400> 4

Met Arg Phe Ala Thr Ile Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Glu Ala Leu Ala Lys Lys Lys Lys Lys Ile Asp Lys Ser
 20 25 30

Met Pro Pro Glu Cys Leu Pro Leu Pro Pro Lys Lys Arg Ala Ser Glu
 35 40 45

Cys Thr Asn Gln Ser Gly Phe Lys Tyr Tyr Pro Lys Thr Asn Gln Cys
 50 55 60

Gly Pro Val Arg Asn Gln Leu Cys Gln Gly His Gly Gly Phe Thr Thr
 65 70 75 80

Leu Asp Glu Cys Val Tyr Lys Cys Tyr Asp Tyr Arg Lys Met Ser Thr
 85 90 95

Thr Lys Asn Val Asp Gly Cys Asn Lys Ser Ile Lys Glu Glu Glu Met
 100 105 110

Thr Glu Ala Ile Arg Val Val Ser Arg Gly Asp Ser Pro Asp Leu Ile
 115 120 125

Lys Asp Asn Arg Cys Arg Glu Pro Asn Glu Leu Ser Leu Lys Asn Gly
 130 135 140

Ser Ala Arg Val Lys Pro Ala Tyr Lys Phe Asn Lys Asp Thr Asn Glu
 145 150 155 160

Cys Val Ala Met Met Asp Lys Val Cys Leu Gly Arg Asn Arg Phe Lys
 165 170 175

Thr Lys Glu Glu Cys Val His Val Cys Asn Trp Asn Leu Ser Ser Gly
 180 185 190

Arg His Arg His Ile Val Arg Glu Ser Asn Ala Lys Gln
 195 200 205

<210> 5
 <211> 388
 <212> Бeлoк
 <213> Culicoides spec.

<400> 5

Met Trp Ser Ser Val Val Asn Ile Ser His Ile Met Ala Val Val Thr
 1 5 10 15

Thr Ala His Leu Ile Ser Ala Gln His Leu Ile Gln Ala Glu Leu Pro
 20 25 30

Asp Ser Pro Leu Asn Ile Val Lys Glu Phe Asp Asp Asp Gly Arg Asn
 35 40 45

Asn Asn Asn Gln Asn Asp Phe Asn Phe Tyr Trp Asn Ile Pro Ser Phe
 50 55 60

Met Cys Ala Gln His Asn Ile Thr Phe Thr Asp Met Thr Ser Ser Tyr
 65 70 75 80

Asn Ile Val Gln Asn Lys Asp Asp Lys Trp Arg Gly Asp Lys Ile Val
 85 90 95

Ile Leu Tyr Asp Pro Gly Lys Phe Pro Ala Leu Leu Glu His Gln Gly
 100 105 110

Gln Leu Tyr Arg Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Leu Gln
 115 120 125

Glu His Ile Asp Ile Leu Ala Glu His Ile Asn Lys Leu Ile Pro Asp
 130 135 140

Thr Gln Phe Ser Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Ser Trp Arg Pro
 145 150 155 160

Ile Phe Arg Gln Asn Ser Gly Val Leu Gln Pro Tyr Lys Asp Leu Ser
 165 170 175

Tyr Lys Leu Val His Arg Asp His Lys Leu Trp Asn Arg Lys Arg Val
 180 185 190

Glu Ile Glu Ala Ala Arg Leu Phe Glu Ala Ala Gly Arg Thr Phe Val
195 200 205

Glu Glu Thr Ile Asn Val Ala Lys Ile Leu Arg Pro Lys Ala Lys Trp
210 215 220

Gly Tyr Tyr Gly Phe Pro Tyr Cys Phe Asn Met Asn Gly Gly Ala Asn
225 230 235 240

Met Asn Glu Asp Cys Pro Ala Asn Val Lys Glu Glu Asn Asp Gln Ile
245 250 255

Lys Trp Leu Trp Asp Ile Val Asp Val Val Leu Pro Ser Val Tyr Leu
260 265 270

Asn Asn Lys Ile Thr Ser Ala Gln Arg Val Gln Phe Val Arg Gly Arg
275 280 285

Met Arg Glu Gly Tyr Arg Val Ala Lys Met Ser Lys Lys Ser Pro Lys
290 295 300

Pro Pro Val Leu Ala Tyr Leu Arg Tyr Val Tyr Thr Asp Thr Leu Lys
305 310 315 320

Phe Leu Ser Asn Glu Asp Leu Lys Gln Ala Ile Lys Val Ser Lys Glu
325 330 335

Gln Lys Ser Lys Gly Met Ile Phe Trp Gly Ser Ser Tyr Asp Val Lys
340 345 350

Thr Lys Glu Gln Cys Ile Asp Phe Arg Lys Tyr Val Asp Asn Asn Leu
355 360 365

Gly Pro Ile Val Leu Leu Ala Asn Asn Lys Ser Pro Lys Val Leu Thr
370 375 380

Pro Asn Leu Ala
385

<210> 6
<211> 261
<212> Бeлoк
<213> Culicoides spec.

<400> 6

Met Phe Arg Ile Cys Leu Phe Thr Val Leu Cys Val Asn Phe Val Val
1 5 10 15

Ala Thr Asp Phe Cys Asp Arg Lys Leu Cys Arg Arg Gln Ile Glu Pro
20 25 30

Asn Val Tyr Gln Asn Ile Pro His Ile Gly Cys Asn His Asp Gly Arg
35 40 45

Asn Ser Pro Ala Cys Pro Ser Asp Ala Lys Ile Leu Pro Met Ser Thr
50 55 60

Lys Arg Lys Asn Leu Ile Leu Arg Val His Asn Arg Leu Arg Asn Lys
65 70 75 80

Val Ala Leu Gly Gln Leu Pro Gly Tyr Pro Lys Ala Val Arg Met Pro
85 90 95

Ile Leu Arg Trp Asp Asp Glu Leu Ala Tyr Leu Ala Glu Leu Asn Val
100 105 110

Lys Gln Cys Glu Met Lys His Asp Gln Cys Arg Asn Thr Asp Lys Phe
115 120 125

Arg Tyr Ala Gly Gln Asn Leu Ala Tyr Ile Gly Gly Gly Lys Glu Pro
130 135 140

Asn Ala Val Arg Ile Lys Thr Leu Val Arg Ala Trp Phe Asp Glu Tyr
145 150 155 160

Lys Asp Ala Asn Ser Ser Phe Ile Asp Lys Tyr Arg Ser His Pro Asn
165 170 175

Gly Lys Ala Ile Gly His Phe Thr Ala Met Val Gln Asp Arg Thr Asp
180 185 190

Thr Val Gly Cys Ala Ile Leu Arg His Thr Lys Asn Thr Tyr Phe Phe
195 200 205

Leu Ala Cys Asn Tyr Ser Phe Thr Asn Met Val Lys Asp Lys Val Tyr
210 215 220

Thr Arg Gly Ala Lys Ser Cys Ser Lys Cys Arg Thr Gly Cys Ser Pro
225 230 235 240

Val Tyr Lys Gly Leu Cys Lys Pro His Glu Tyr Val Asn Pro Asp Pro
245 250 255
Asp Glu Asp Leu Asp
260

<210> 7
<211> 258
<212> Белок
<213> Синтетический пептид

<400> 7

Met His His His His His His Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
1 5 10 15

Arg Arg Met Glu Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val
20 25 30

Pro Ile Leu Gly Gln Arg Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg
35 40 45

Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala
50 55 60

Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu
65 70 75 80

Asp Lys Leu Thr Val Thr Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg
85 90 95

Met Lys Leu Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala
100 105 110

Thr Pro Met Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly

034692

```

115              120              125

Arg Arg Lys His Phe Arg His Leu Lys Arg Ile Glu Ala Ala Asn Asp
130              135              140

Ser Pro Ala Lys Asn Ser Gly Thr Tyr Gln Lys Val Ser Lys Gln Leu
145              150              155              160

Gln Lys Tyr Tyr Val Leu Thr Pro Asp Asp Lys Leu Gly Ser Tyr Leu
165              170              175

Lys Gly Gly Leu Gln Glu Ala Ala Asn Arg Val Leu Thr Pro Val Ser
180              185              190

Lys Ser Asp Lys Ile Thr Phe Asp Ile Val Gln Asn Ser Leu Lys Asn
195              200              205

Phe Gln Val Met Val Asn Lys His Asn Lys Glu Ala Leu Arg Lys Tyr
210              215              220

Arg Glu Ser Lys Lys Glu Ser Phe Thr Glu Val Gly Lys Glu Phe Ser
225              230              235              240

Ser Ala Leu Asp Lys Thr Gly Val Gln Ile Ala Glu Ser Leu Asn Glu
245              250              255

Ser Leu

<210> 8
<211> 258
<212> Белок
<213> Синтетический пептид

<400> 8

Met Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Met Glu Asp Gln
1              5              10              15

Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val Pro Ile Leu Gly Gln Arg
20              25              30

Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr Gly
35              40              45

Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr Ala
50              55              60

Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val Thr
65              70              75              80

Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys Ser
85              90              95

Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala Thr Pro Met Leu Met Gln
100             105             110

Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly Arg Arg Lys His Phe Arg
115             120             125

His Leu Lys Arg Ile Glu Ala Ala Asn Asp Ser Pro Ala Lys Asn Ser
130             135             140
```

Gly Thr Tyr Gln Lys Val Ser Lys Gln Leu Gln Lys Tyr Tyr Val Leu
145 150 155 160

Thr Pro Asp Asp Lys Leu Gly Ser Tyr Leu Lys Gly Gly Leu Gln Glu
165 170 175

Ala Ala Asn Arg Val Leu Thr Pro Val Ser Lys Ser Asp Lys Ile Thr
180 185 190

Phe Asp Ile Val Gln Asn Ser Leu Lys Asn Phe Gln Val Met Val Asn
195 200 205

Lys His Asn Lys Glu Ala Leu Arg Lys Tyr Arg Glu Ser Lys Lys Glu
210 215 220

Ser Phe Thr Glu Val Gly Lys Glu Phe Ser Ser Ala Leu Asp Lys Thr
225 230 235 240

Gly Val Gln Ile Ala Glu Ser Leu Asn Glu Ser Leu His His His His
245 250 255

His His

<210> 9

<211> 310

<212> Бeлoк

<213> Синтетический пептид

<400> 9

Met His His His His His His Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
1 5 10 15

Arg Arg Met Glu Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val
20 25 30

Pro Ile Leu Gly Gln Arg Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg
35 40 45

Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Ala
50 55 60

Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu
65 70 75 80

Asp Lys Leu Thr Val Thr Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg
85 90 95

Met Lys Leu Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala
100 105 110

Thr Pro Met Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly
115 120 125

Lys Lys Lys Lys Lys Ile Asp Lys Ser Met Pro Pro Glu Ser Leu Pro
130 135 140

Leu Pro Pro Lys Lys Arg Ala Ser Glu Ser Thr Asn Gln Ser Gly Phe
145 150 155 160

Lys Tyr Tyr Pro Lys Thr Asn Gln Ser Gly Pro Val Arg Asn Gln Leu
165 170 175

Ser Gln Gly His Gly Gly Phe Thr Thr Leu Asp Glu Ser Val Tyr Lys
180 185 190

Ser Tyr Asp Tyr Arg Lys Met Ser Thr Thr Lys Asn Val Asp Gly Ser
195 200 205

Asn Lys Ser Ile Lys Glu Glu Glu Met Thr Glu Ala Ile Arg Val Val
210 215 220

Ser Arg Gly Asp Ser Pro Asp Leu Ile Lys Asp Asn Arg Ser Arg Glu
225 230 235 240

Pro Asn Glu Leu Ser Leu Lys Asn Gly Ser Ala Arg Val Lys Pro Ala
245 250 255

Tyr Lys Phe Asn Lys Asp Thr Asn Glu Ser Val Ala Met Met Asp Lys
260 265 270

Val Ser Leu Gly Arg Asn Arg Phe Lys Thr Lys Glu Glu Ser Val His
275 280 285

Val Ser Asn Trp Asn Leu Ser Ser Gly Arg His Arg His Ile Val Arg
290 295 300

Glu Ser Asn Ala Lys Gln
305 310

<210> 10
<211> 310
<212> Блок
<213> Синтетический пептид
<400> 10

Met Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Glu Asp Gln
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val Pro Ile Leu Gly Gln Arg
20 25 30

Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr Gly
35 40 45

Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr Ala
50 55 60

Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val Thr
65 70 75 80

Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys Ser
85 90 95

Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala Thr Pro Met Leu Met Gln
100 105 110

Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly Lys Lys Lys Lys Lys Ile
115 120 125

Asp Lys Ser Met Pro Pro Glu Ser Leu Pro Leu Pro Pro Lys Lys Arg
130 135 140

Ala Ser Glu Ser Thr Asn Gln Ser Gly Phe Lys Tyr Tyr Pro Lys Thr
145 150 155 160

Asn Gln Ser Gly Pro Val Arg Asn Gln Leu Ser Gln Gly His Gly Gly
165 170 175

Phe Thr Thr Leu Asp Glu Ser Val Tyr Lys Ser Tyr Asp Tyr Arg Lys
180 185 190

Met Ser Thr Thr Lys Asn Val Asp Gly Ser Asn Lys Ser Ile Lys Glu
195 200 205

Glu Glu Met Thr Glu Ala Ile Arg Val Val Ser Arg Gly Asp Ser Pro
210 215 220

Asp Leu Ile Lys Asp Asn Arg Ser Arg Glu Pro Asn Glu Leu Ser Leu
225 230 235 240

Lys Asn Gly Ser Ala Arg Val Lys Pro Ala Tyr Lys Phe Asn Lys Asp
245 250 255

Thr Asn Glu Ser Val Ala Met Met Asp Lys Val Ser Leu Gly Arg Asn
260 265 270

Arg Phe Lys Thr Lys Glu Glu Ser Val His Val Ser Asn Trp Asn Leu
275 280 285

Ser Ser Gly Arg His Arg His Ile Val Arg Glu Ser Asn Ala Lys Gln
290 295 300

His His His His His His
305 310

<210> 11

<211> 493

<212> Белок

<213> Синтетический пептид

<400> 11

Met His His His His His His Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
1 5 10 15

Arg Arg Met Glu Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val
20 25 30

Pro Ile Leu Gly Gln Arg Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg
35 40 45

Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Ala
50 55 60

Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu
65 70 75 80

Asp Lys Leu Thr Val Thr Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg
85 90 95

Met Lys Leu Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala
100 105 110

Thr Pro Met Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly
115 120 125

Gln His Leu Ile Gln Ala Glu Leu Pro Asp Ser Pro Leu Asn Ile Val

130	135	140
Lys Glu Phe Asp Asp Asp Gly Arg Asn Asn Asn Asn Gln Asn Asp Phe		
145	150	155
Asn Phe Tyr Trp Asn Ile Pro Ser Phe Met Ser Ala Gln His Asn Ile		
	165	170
Thr Phe Thr Asp Met Thr Ser Ser Tyr Asn Ile Val Gln Asn Lys Asp		
	180	185
Asp Lys Trp Arg Gly Asp Lys Ile Val Ile Leu Tyr Asp Pro Gly Lys		
	195	200
Phe Pro Ala Leu Leu Glu His Gln Gly Gln Leu Tyr Arg Arg Asn Gly		
	210	215
Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Leu Gln Glu His Ile Asp Ile Leu Ala		
225	230	235
Glu His Ile Asn Lys Leu Ile Pro Asp Thr Gln Phe Ser Gly Ile Gly		
	245	250
Val Ile Asp Phe Glu Ser Trp Arg Pro Ile Phe Arg Gln Asn Ser Gly		
	260	265
Val Leu Gln Pro Tyr Lys Asp Leu Ser Tyr Lys Leu Val His Arg Asp		
	275	280
His Lys Leu Trp Asn Arg Lys Arg Val Glu Ile Glu Ala Ala Arg Leu		
	290	295
Phe Glu Ala Ala Gly Arg Thr Phe Val Glu Glu Thr Ile Asn Val Ala		
305	310	315
Lys Ile Leu Arg Pro Lys Ala Lys Trp Gly Tyr Tyr Gly Phe Pro Tyr		
	325	330
Ser Phe Asn Met Asn Gly Gly Ala Asn Met Asn Glu Asp Ser Pro Ala		
	340	345
Asn Val Lys Glu Glu Asn Asp Gln Ile Lys Trp Leu Trp Asp Ile Val		
	355	360
Asp Val Val Leu Pro Ser Val Tyr Leu Asn Asn Lys Ile Thr Ser Ala		
	370	375
Gln Arg Val Gln Phe Val Arg Gly Arg Met Arg Glu Gly Tyr Arg Val		
385	390	395
Ala Lys Met Ser Lys Lys Ser Pro Lys Pro Pro Val Leu Ala Tyr Leu		
	405	410
Arg Tyr Val Tyr Thr Asp Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asn Glu Asp Leu		
	420	425
Lys Gln Ala Ile Lys Val Ser Lys Glu Gln Lys Ser Lys Gly Met Ile		
	435	440
Phe Trp Gly Ser Ser Tyr Asp Val Lys Thr Lys Glu Gln Ser Ile Asp		
	450	455

Phe Arg Lys Tyr Val Asp Asn Asn Leu Gly Pro Ile Val Leu Leu Ala
465 470 475 480

Asn Asn Lys Ser Pro Lys Val Leu Thr Pro Asn Leu Ala
485 490

<210> 12
<211> 493
<212> Белок
<213> Синтетический пептид

<400> 12

Met Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Met Glu Asp Gln
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val Pro Ile Leu Gly Gln Arg
20 25 30

Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr Gly
35 40 45

Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr Ala
50 55 60

Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val Thr
65 70 75 80

Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys Ser
85 90 95

Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala Thr Pro Met Leu Met Gln
100 105 110

Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly Gln His Leu Ile Gln Ala
115 120 125

Glu Leu Pro Asp Ser Pro Leu Asn Ile Val Lys Glu Phe Asp Asp Asp
130 135 140

Gly Arg Asn Asn Asn Gln Asn Asp Phe Asn Phe Tyr Trp Asn Ile
145 150 155 160

Pro Ser Phe Met Ser Ala Gln His Asn Ile Thr Phe Thr Asp Met Thr
165 170 175

Ser Ser Tyr Asn Ile Val Gln Asn Lys Asp Asp Lys Trp Arg Gly Asp
180 185 190

Lys Ile Val Ile Leu Tyr Asp Pro Gly Lys Phe Pro Ala Leu Leu Glu
195 200 205

His Gln Gly Gln Leu Tyr Arg Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly
210 215 220

Asn Leu Gln Glu His Ile Asp Ile Leu Ala Glu His Ile Asn Lys Leu
225 230 235 240

Ile Pro Asp Thr Gln Phe Ser Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Ser
245 250 255

Trp Arg Pro Ile Phe Arg Gln Asn Ser Gly Val Leu Gln Pro Tyr Lys
260 265 270

Asp Leu Ser Tyr Lys Leu Val His Arg Asp His Lys Leu Trp Asn Arg
275 280 285

Lys Arg Val Glu Ile Glu Ala Ala Arg Leu Phe Glu Ala Ala Gly Arg
290 295 300

Thr Phe Val Glu Glu Thr Ile Asn Val Ala Lys Ile Leu Arg Pro Lys
305 310 315 320

Ala Lys Trp Gly Tyr Tyr Gly Phe Pro Tyr Ser Phe Asn Met Asn Gly
325 330 335

Gly Ala Asn Met Asn Glu Asp Ser Pro Ala Asn Val Lys Glu Glu Asn
340 345 350

Asp Gln Ile Lys Trp Leu Trp Asp Ile Val Asp Val Val Leu Pro Ser
355 360 365

Val Tyr Leu Asn Asn Lys Ile Thr Ser Ala Gln Arg Val Gln Phe Val
370 375 380

Arg Gly Arg Met Arg Glu Gly Tyr Arg Val Ala Lys Met Ser Lys Lys
385 390 395 400

Ser Pro Lys Pro Pro Val Leu Ala Tyr Leu Arg Tyr Val Tyr Thr Asp
405 410 415

Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asn Glu Asp Leu Lys Gln Ala Ile Lys Val
420 425 430

Ser Lys Glu Gln Lys Ser Lys Gly Met Ile Phe Trp Gly Ser Ser Tyr
435 440 445

Asp Val Lys Thr Lys Glu Gln Ser Ile Asp Phe Arg Lys Tyr Val Asp
450 455 460

Asn Asn Leu Gly Pro Ile Val Leu Leu Ala Asn Asn Lys Ser Pro Lys
465 470 475 480

Val Leu Thr Pro Asn Leu Ala His His His His His His
485 490

<210> 13

<211> 372

<212> Белок

<213> Синтетический пептид

<400> 13

Met His His His His His His Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
1 5 10 15

Arg Arg Met Glu Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val
20 25 30

Pro Ile Leu Gly Gln Arg Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg
35 40 45

Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Ala
50 55 60

Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu

034692

```

65              70              75              80

Asp Lys Leu Thr Val Thr Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg
      85              90              95

Met Lys Leu Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala
      100             105             110

Thr Pro Met Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly
      115             120             125

Thr Asp Phe Ser Asp Arg Lys Leu Ser Arg Arg Gln Ile Glu Pro Asn
      130             135             140

Val Tyr Gln Asn Ile Pro His Ile Gly Ser Asn His Asp Gly Arg Asn
      145             150             155             160

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

Arg Lys Asn Leu Ile Leu Arg Val His Asn Arg Leu Arg Asn Lys Val
      180             185             190

Ala Leu Gly Gln Leu Pro Gly Tyr Pro Lys Ala Val Arg Met Pro Ile
      195             200             205

Leu Arg Trp Asp Asp Glu Leu Ala Tyr Leu Ala Glu Leu Asn Val Lys
      210             215             220

Gln Ser Glu Met Lys His Asp Gln Ser Arg Asn Thr Asp Lys Phe Arg
      225             230             235             240

Tyr Ala Gly Gln Asn Leu Ala Tyr Ile Gly Gly Gly Lys Glu Pro Asn
      245             250             255

Ala Val Arg Ile Lys Thr Leu Val Arg Ala Trp Phe Asp Glu Tyr Lys
      260             265             270

Asp Ala Asn Ser Ser Phe Ile Asp Lys Tyr Arg Ser His Pro Asn Gly
      275             280             285

Lys Ala Ile Gly His Phe Thr Ala Met Val Gln Asp Arg Thr Asp Thr
      290             295             300

Val Gly Ile Ala Ile Leu Arg His Thr Lys Asn Thr Tyr Phe Phe Leu
      305             310             315             320

Ala Ile Asn Tyr Ser Phe Thr Asn Met Val Lys Asp Lys Val Tyr Thr
      325             330             335

Arg Gly Ala Lys Ser Ser Ser Lys Ser Arg Thr Gly Ser Ser Pro Val
      340             345             350

Tyr Lys Gly Leu Ser Lys Pro His Glu Tyr Val Asn Pro Asp Pro Asp
      355             360             365

Glu Asp Leu Asp
      370

<210> 14
<211> 372
<212> Белок
```

<213> Синтетический пептид

<400> 14

Met Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Met Glu Asp Gln
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val Pro Ile Leu Gly Gln Arg
 20 25 30

Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr Gly
 35 40 45

Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr Ala
 50 55 60

Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val Thr
 65 70 75 80

Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys Ser
 85 90 95

Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala Thr Pro Met Leu Met Gln
 100 105 110

Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly Thr Asp Phe Ser Asp Arg
 115 120 125

Lys Leu Ser Arg Arg Gln Ile Glu Pro Asn Val Tyr Gln Asn Ile Pro
 130 135 140

His Ile Gly Ser Asn His Asp Gly Arg Asn Ser Pro Ala Ser Pro Ser
 145 150 155 160

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

Arg Val His Asn Arg Leu Arg Asn Lys Val Ala Leu Gly Gln Leu Pro
 180 185 190

Gly Tyr Pro Lys Ala Val Arg Met Pro Ile Leu Arg Trp Asp Asp Glu
 195 200 205

Leu Ala Tyr Leu Ala Glu Leu Asn Val Lys Gln Ser Glu Met Lys His
 210 215 220

Asp Gln Ser Arg Asn Thr Asp Lys Phe Arg Tyr Ala Gly Gln Asn Leu
 225 230 235 240

Ala Tyr Ile Gly Gly Gly Lys Glu Pro Asn Ala Val Arg Ile Lys Thr
 245 250 255

Leu Val Arg Ala Trp Phe Asp Glu Tyr Lys Asp Ala Asn Ser Ser Phe
 260 265 270

Ile Asp Lys Tyr Arg Ser His Pro Asn Gly Lys Ala Ile Gly His Phe
 275 280 285

Thr Ala Met Val Gln Asp Arg Thr Asp Thr Val Gly Ile Ala Ile Leu
 290 295 300

Arg His Thr Lys Asn Thr Tyr Phe Phe Leu Ala Ile Asn Tyr Ser Phe
 305 310 315 320

Thr Asn Met Val Lys Asp Lys Val Tyr Thr Arg Gly Ala Lys Ser Ser
325 330 335

Ser Lys Ser Arg Thr Gly Ser Ser Pro Val Tyr Lys Gly Leu Ser Lys
340 345 350

Pro His Glu Tyr Val Asn Pro Asp Pro Asp Glu Asp Leu Asp His His
355 360 365

His His His His
370

<210> 15
<211> 110
<212> Белок
<213> Equus caballus

<400> 15

Met Glu Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val Pro Ile
1 5 10 15

Leu Gly Gln Arg Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Cys Ser Arg Gly Ala
20 25 30

Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln
35 40 45

Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys
50 55 60
Leu Thr Val Thr Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg Met Lys
65 70 75 80

Leu Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala Thr Pro
85 90 95

Met Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly
100 105 110

<210> 16
<211> 110
<212> Белок
<213> Синтетический пептид

<400> 16

Met Glu Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val Pro Ile
1 5 10 15

Leu Gly Gln Arg Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg Gly Ala
20 25 30

Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln
35 40 45

Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys
50 55 60

Leu Thr Val Thr Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg Met Lys
65 70 75 80

Leu Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala Thr Pro
85 90 95

```

Met Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly
      100              105              110

<210>  17
<211> 333
<212>  Блок
<213>  Синтетический пептид

<400>  17

Met His His His His His His Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
1      5              10              15

Arg Arg Met Glu Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val
      20              25              30

Pro Ile Leu Gly Gln Arg Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg
      35              40              45

Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala
      50              55              60

Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu
      65              70              75              80

Asp Lys Leu Thr Val Thr Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg
      85              90              95

Met Lys Leu Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala
      100              105              110
Thr Pro Met Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly
      115              120              125

Ala Arg Val Lys Lys Asn Asp Pro Leu Pro Gly Ala Thr Val Gly Gly
      130              135              140

Tyr Ser Gly Gly Asp Leu Val Ser Glu Arg Ala Ser Val Ser Val Lys
      145              150              155              160

Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asn Ala Gln Ala Asn Arg Ser Val Tyr Asp
      165              170              175

Ser Arg Asn Phe Asp Pro Gly Lys Glu Phe Leu Lys Leu Val Leu Tyr
      180              185              190

Phe Lys Ser Lys Asp Phe Lys Asn Arg Lys Trp Asp Glu Arg Glu Lys
      195              200              205

Asn Asn Lys Asn Met Asp Pro Val Lys Asn Gln Ala Gln Ser Gly Ser
      210              215              220

Ser Trp Ala Phe Ala Pro Val Pro Ser Arg Ser Tyr Thr Leu Ala Glu
      225              230              235              240

Gln Glu Leu Val Asp Ser Glu Thr Thr Ser Ile Lys Gly Leu Lys Met
      245              250              255

Ser Ala Arg Arg Ser Leu Asn Pro Arg Leu Gly Phe Arg Gly Gly Trp
      260              265              270

Ser Thr Thr Gly Asn Thr Leu Ser Asn Val Ser Leu Gly Arg Asn Arg

```

034692

```

275                280                285

Phe Ser Ser Gln Asp Glu Leu Ile His Val Ile Val Trp Asn Lys Gly
290                295                300

Ser Gly Arg Val Arg His Val Ala Arg Ala Glu Asn Ala Ala Glu Asn
305                310                315                320

Lys Ile Lys Ala Ala Gly Gly Ala Ser Val Leu Arg Ala
325                330

<210>  18
<211>  273
<212>  Белок
<213>  Culicoides spec.

<400>  18

Met Asn Ile Lys Ser Thr Ile Ile Val Ile Ala Ile Ile Ser Ala Val
1                5                10                15

Tyr Ala Ala Asp His Gln Ser Gln Lys Ala Val Ala Val Pro Ser Tyr
20                25                30

Thr Tyr Arg Arg Pro Ser Thr Lys Ile Ile Gly Gly Ala Pro Ala Phe
35                40                45

Ser His Gln Phe Pro Trp Gln Ala Ser Ile Thr Val Thr Ala Cys Ser
50                55                60

Gly Asp Trp Cys Ser Leu Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Arg Lys His
65                70                75                80
Val Leu Thr Ala Ala His Cys Thr Lys Gly Leu Ser Ser Phe Thr Ile
85                90                95

Gly Leu Gly Ser Asn Thr Arg Asn Arg Pro Ala Val Thr Val Val Ala
100               105               110

Lys Ser Lys Thr Glu His Pro Lys Tyr Asn Pro Glu Ser Leu Ala Asn
115               120               125

Asp Val Ser Ile Ile Thr Leu Ser Leu Asn Val Asn Leu Asn Asn Asn
130               135               140

Ile Lys Val Ile Ser Leu Ala Asn Ser Gly Ile Gly Thr Leu Val Asn
145               150               155               160

Arg Asn Ala Phe Val Ser Gly Tyr Gly Lys Thr Ser Ser Ser Ser Glu
165               170               175

Gly Ser Asn Thr Leu Asn Tyr Leu Ser Met Arg Leu Ile Ser Asn Ser
180               185               190

Asp Cys Tyr Lys Val Phe Gly Pro Gln Ile Tyr Ser Thr Thr Leu Cys
195               200               205

Ala Val Ala Arg Ser Ser Val His Lys Asn Val Cys Ser Gly Asp Ser
210               215               220

Gly Gly Pro Leu Val Ile Lys Arg Asn Gly Asn Tyr Val Gln Val Gly
225               230               235               240

```

Ile Val Ser Phe Val Ala Lys Val Gly Cys Asp Ala Gly Phe Pro Ser
245 250 255

Gly Tyr Ala Arg Val Ser Ser Phe Arg Asn Trp Ile Thr Gln Asn Met
260 265 270

Asn

<210> 19
<211> 159
<212> Белок
<213> Culicoides spec.

<400> 19

Met Lys Phe Ser Val Ser Lys Leu Ser Leu Leu Leu Cys Ile Thr Ile
1 5 10 15

Leu Cys Ile Cys Phe Ala Thr Ala Ala Pro Gln Trp Gln Ile Ser Glu
20 25 30

Leu Ser Glu Gln Ser Asn Val Ile Lys Cys Ser Asn Glu Asn Asn Phe
35 40 45

Gly Ile Tyr Lys Glu Leu Cys Gln Phe Leu Lys Lys Ile Tyr Ile Lys
50 55 60

Ala Pro Asp Glu Asp Leu Gly Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Gln Ser
65 70 75 80

Ala Ala Asn Arg Leu Leu Asp Pro Thr Val Thr Leu Pro Lys Asn Thr
85 90 95
Leu Lys Asn Val Glu Asp Cys Met Lys Asn Phe Gln Ala Val Ile Asn
100 105 110

Glu Tyr Asn Val Val Ala Leu Lys Lys Tyr Gln Glu Cys Asp Gly Gln
115 120 125

Cys Ala Lys Gln Ala Gly Gln Leu Phe Glu Asn Asp Ala Ser Lys Thr
130 135 140

Ala Gly Arg Met Gly Asp Cys Ile Val Ser Leu Ala Ala Leu His
145 150 155

<210> 20
<211> 383
<212> Белок
<213> Синтетический пептид

<400> 20

Met His His His His His His Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
1 5 10 15

Arg Arg Met Glu Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val
20 25 30

Pro Ile Leu Gly Gln Arg Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg
35 40 45

Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala
50 55 60

034692

Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu
65 70 75 80

Asp Lys Leu Thr Val Thr Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg
85 90 95

Met Lys Leu Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala
100 105 110

Thr Pro Met Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly
115 120 125

Ala Asp His Gln Ser Gln Lys Ala Val Ala Val Pro Ser Tyr Thr Tyr
130 135 140

Arg Arg Pro Ser Thr Lys Ile Ile Gly Gly Ala Pro Ala Phe Ser His
145 150 155 160

Gln Phe Pro Trp Gln Ala Ser Ile Thr Val Thr Ala Ser Ser Gly Asp
165 170 175

Trp Ser Ser Leu Ser Gly Gly Ser Leu Ile Ser Arg Lys His Val Leu
180 185 190

Thr Ala Ala His Ser Thr Lys Gly Leu Ser Ser Phe Thr Ile Gly Leu
195 200 205

Gly Ser Asn Thr Arg Asn Arg Pro Ala Val Thr Val Val Ala Lys Ser
210 215 220

Lys Thr Glu His Pro Lys Tyr Asn Pro Glu Ser Leu Ala Asn Asp Val
225 230 235 240

Ser Ile Ile Thr Leu Ser Leu Asn Val Asn Leu Asn Asn Asn Ile Lys
245 250 255

Val Ile Ser Leu Ala Asn Ser Gly Ile Gly Thr Leu Val Asn Arg Asn
260 265 270

Ala Phe Val Ser Gly Tyr Gly Lys Thr Ser Ser Ser Ser Glu Gly Ser
275 280 285

Asn Thr Leu Asn Tyr Leu Ser Met Arg Leu Ile Ser Asn Ser Asp Ser
290 295 300

Tyr Lys Val Phe Gly Pro Gln Ile Tyr Ser Thr Thr Leu Ser Ala Val
305 310 315 320

Ala Arg Ser Ser Val His Lys Asn Val Ser Ser Gly Asp Ser Gly Gly
325 330 335

Pro Leu Val Ile Lys Arg Asn Gly Asn Tyr Val Gln Val Gly Ile Val
340 345 350

Ser Phe Val Ala Lys Val Gly Ser Asp Ala Gly Phe Pro Ser Gly Tyr
355 360 365

Ala Arg Val Ser Ser Phe Arg Asn Trp Ile Thr Gln Asn Met Asn
370 375 380

<210> 21
<211> 383

034692

<212> Белок

<213> Синтетический пептид

<400> 21

Met Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Glu Asp Gln
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val Pro Ile Leu Gly Gln Arg
20 25 30

Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr Gly
35 40 45

Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr Ala
50 55 60

Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val Thr
65 70 75 80

Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys Ser
85 90 95

Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala Thr Pro Met Leu Met Gln
100 105 110

Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly Ala Asp His Gln Ser Gln
115 120 125

Lys Ala Val Ala Val Pro Ser Tyr Thr Tyr Arg Arg Pro Ser Thr Lys
130 135 140

Ile Ile Gly Gly Ala Pro Ala Phe Ser His Gln Phe Pro Trp Gln Ala
145 150 155 160

Ser Ile Thr Val Thr Ala Ser Ser Gly Asp Trp Ser Ser Leu Ser Gly
165 170 175

Gly Ser Leu Ile Ser Arg Lys His Val Leu Thr Ala Ala His Ser Thr
180 185 190

Lys Gly Leu Ser Ser Phe Thr Ile Gly Leu Gly Ser Asn Thr Arg Asn
195 200 205

Arg Pro Ala Val Thr Val Val Ala Lys Ser Lys Thr Glu His Pro Lys
210 215 220

Tyr Asn Pro Glu Ser Leu Ala Asn Asp Val Ser Ile Ile Thr Leu Ser
225 230 235 240

Leu Asn Val Asn Leu Asn Asn Ile Lys Val Ile Ser Leu Ala Asn
245 250 255

Ser Gly Ile Gly Thr Leu Val Asn Arg Asn Ala Phe Val Ser Gly Tyr
260 265 270

Gly Lys Thr Ser Ser Ser Ser Glu Gly Ser Asn Thr Leu Asn Tyr Leu
275 280 285

Ser Met Arg Leu Ile Ser Asn Ser Asp Ser Tyr Lys Val Phe Gly Pro
290 295 300

Gln Ile Tyr Ser Thr Thr Leu Ser Ala Val Ala Arg Ser Ser Val His

034692

```

305              310              315              320

Lys Asn Val Ser Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Ile Lys Arg
              325              330              335

Asn Gly Asn Tyr Val Gln Val Gly Ile Val Ser Phe Val Ala Lys Val
              340              345              350

Gly Ser Asp Ala Gly Phe Pro Ser Gly Tyr Ala Arg Val Ser Ser Phe
              355              360              365

Arg Asn Trp Ile Thr Gln Asn Met Asn His His His His His His
              370              375              380

<210>  22
<211> 263
<212>  Белок
<213>  Синтетический пептид

<400>  22

Met His His His His His His Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
 1              5              10              15

Arg Arg Met Glu Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val
              20              25              30

Pro Ile Leu Gly Gln Arg Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg
              35              40              45

Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala
 50              55              60
Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu
65              70              75              80

Asp Lys Leu Thr Val Thr Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg
              85              90              95

Met Lys Leu Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala
              100              105              110

Thr Pro Met Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly
              115              120              125

Ala Pro Gln Trp Gln Ile Ser Glu Leu Ser Glu Gln Ser Asn Val Ile
              130              135              140

Lys Ser Ser Asn Glu Asn Asn Phe Gly Ile Tyr Lys Glu Leu Ser Gln
145              150              155              160

Phe Leu Lys Lys Ile Tyr Ile Lys Ala Pro Asp Glu Asp Leu Gly Ser
              165              170              175

Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Gln Ser Ala Ala Asn Arg Leu Leu Asp Pro
              180              185              190

Thr Val Thr Leu Pro Lys Asn Thr Leu Lys Asn Val Glu Asp Ser Met
              195              200              205

Lys Asn Phe Gln Ala Val Ile Asn Glu Tyr Asn Val Val Ala Leu Lys
              210              215              220

```

Lys Tyr Gln Glu Ser Asp Gly Gln Ser Ala Lys Gln Ala Gly Gln Leu
225 230 235 240

Phe Glu Asn Asp Ala Ser Lys Thr Ala Gly Arg Met Gly Asp Ser Ile
245 250 255

Val Ser Leu Ala Ala Leu His
260

<210> 23
<211> 263
<212> Белок
<213> Синтетический пептид

<400> 23

Met Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Glu Asp Gln
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Val Pro Ile Leu Gly Gln Arg
20 25 30

Pro Ala Ala Pro Glu Arg Lys Ser Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr Gly
35 40 45

Phe Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr Ala
50 55 60

Tyr Phe Leu Phe Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val Thr
65 70 75 80

Ala Gln Asn Leu Gln Leu Glu Lys Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys Ser
85 90 95
Ala Lys Pro Val Ser Lys Ile Arg Val Ala Thr Pro Met Leu Met Gln
100 105 110

Ala Leu Pro Met Glu Gly Leu Ser His Gly Ala Pro Gln Trp Gln Ile
115 120 125

Ser Glu Leu Ser Glu Gln Ser Asn Val Ile Lys Ser Ser Asn Glu Asn
130 135 140

Asn Phe Gly Ile Tyr Lys Glu Leu Ser Gln Phe Leu Lys Lys Ile Tyr
145 150 155 160

Ile Lys Ala Pro Asp Glu Asp Leu Gly Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu
165 170 175

Gln Ser Ala Ala Asn Arg Leu Leu Asp Pro Thr Val Thr Leu Pro Lys
180 185 190

Asn Thr Leu Lys Asn Val Glu Asp Ser Met Lys Asn Phe Gln Ala Val
195 200 205

Ile Asn Glu Tyr Asn Val Val Ala Leu Lys Lys Tyr Gln Glu Ser Asp
210 215 220

Gly Gln Ser Ala Lys Gln Ala Gly Gln Leu Phe Glu Asn Asp Ala Ser
225 230 235 240

Lys Thr Ala Gly Arg Met Gly Asp Ser Ile Val Ser Leu Ala Ala Leu
245 250 255

His His His His His His His
260

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Улучшенная транспортная молекула модулярного антигена MAT (iMAT), включающая:

(i) по крайней мере один первый модуль, который имеет аминокислотную последовательность, которая позволяет осуществлять транслокацию молекулы iMAT из внеклеточного пространства внутрь клеток, где по меньшей мере один первый модуль выбран из группы, состоящей из i) аминокислотной последовательности HIV-tat (белок активатора транскрипции HIV), VP22 и/или Antennapedia или их частичной последовательности, при условии, что такой по меньшей мере один первый модуль является функциональным в качестве модуля для транслокации молекулы iMAT из внеклеточного пространства внутрь клеток, ii) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1;

(ii) по крайней мере один второй модуль, который имеет аминокислотную последовательность, которая позволяет осуществлять специфическое для вида внутриклеточное нацеливание молекулы iMAT на органеллы клетки, которые являются вовлеченными в процессинг антигенов и/или нагрузку МНС молекулы антигенами, где такой по меньшей мере один второй модуль выбран из группы, состоящей из i) инвариантной цепи, выбранной из видов, у которых иммунный ответ должен подвергаться модулированию, и/или из видов, у которых молекула iMAT должна быть нацеленной на внутриклеточное пространство, ii) инвариантной цепи молекул МНС класса II (также известной как инвариантной цепи Ii или МНС II гамма-цепи), iii) лошадиной инвариантной цепи, содержащей аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2 или ее фрагментов, при условии, что такие фрагменты сохраняют их внутриклеточную транспортную функцию; и

(iii) по крайней мере один третий модуль в качестве антигенного модуля, который имеет аминокислотную последовательность, которая имеет происхождение по крайней мере от одного полного или частичного эпитопа по крайней мере одного антигена, предпочтительно по крайней мере одного аллергена, который определяет специфичность иммунного ответа, модулируемого с помощью такой молекулы iMAT, который отличается тем, что в цельной молекуле iMAT все остатки цистеина являются замещенными с помощью отличного аминокислотного остатка, предпочтительно серина, лейцина, изолейцина и/или аспарагиновой кислоты.

2. Молекула iMAT по п.1, где все такие модули являются ковалентно связанными друг с другом с помощью дополнительного(ых) спейсерного(ых) модуля(ей) между двумя или более соседними модулями, такими как первый, второй и/или третий модуль.

3. Молекула iMAT по п.1, где все такие модули являются ковалентно связанными друг с другом и где никакого(никаких) дополнительного(ых) спейсерного(ых) модуля(ей) между двумя или более соседними модулями, такими как первый, второй и/или третий модули, не присутствует вообще.

4. Молекула iMAT по любому из пп.1-3, где по крайней мере один второй модуль включает инвариантную цепь лошади и предпочтительно состоит из одной или более аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, 15, 16.

5. Молекула iMAT по любому из пп.1-4, где по крайней мере один антигенный модуль включает по крайней мере один полный или частичный эпитоп, который имеет происхождение по крайней мере от одного аллергена, который вызывает аллергию у лошадей, предпочтительно по крайней мере одного полного или частичного эпитопа по крайней мере одного аллергена, который имеет происхождение от насекомых, которые питаются кровью, более предпочтительно из рода *Culicoides*, и/или по крайней мере одного полного или частичного эпитопа по крайней мере одного аллергена, который имеет происхождение от плесени (грибы и/или их споры), пыльцы, домашней пыли или амбарных клещей (и/или их фекалий), предпочтительно от пыльцы деревьев, трав, травянистых растений, амброзии и/или пыльцы растений крестоцветных *Brassicaceae*, и/или грибов и/или их спор из родов *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Eurotium*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Erysiphe*, *Fusarium*, *Lichtheimia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Periconia*, *Peronospora*, *Polythrincium*, *Saccharopolyspora* (ранее также назывались *Faenia* или *Micropolyspora*), *Thermoactinomyces*, *Stemphylium*, *Torula*, и/или клещей (или их фекалий) рода *Acarus*, *Glycophagus*, *Tyrophagus*, *Dermatophagoides*.

6. Молекула iMAT по п.5, где такой по крайней мере один антиген, предпочтительно по крайней мере один аллерген представляет собой Cul n4, Cul o1, Cul o2, Cul o3, Cul o4 и/или Cul o7 аллерген.

7. Молекула iMAT по любому из пп.1-4, где по крайней мере один антигенный модуль включает по крайней мере один полный или частичный эпитоп, который имеет происхождение по крайней мере от одного антигена патогена, который вызывает одно или более инфекционное(ых) заболевание(ий) у лошадей, предпочтительно по крайней мере одного полного или частичного эпитопа по крайней мере одного антигена, который имеет происхождение от рода *Rhodococcus*, *Streptococcus*, *Oorbivirus*, *Flavivirus*, *Trichophyton*, *Microsporium*, *Cryptosporidium* и/или *Sstrongylus*, где предпочтительно по крайней мере один антигенный модуль может также представлять собой антиген переносчика, который является вовлеченным в передачу одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий) у лошадей, более предпочтительно компоненты слюны *Culicoides*, *Culex* и/или *Ixodes*.

8. Молекула iMAT по любому из пп.1-7, которая дополнительно включает по крайней мере один модуль метки, предпочтительно по крайней мере одну His-метку, где такой по крайней мере один модуль

метки предпочтительно присутствует на N-терминальном конце и/или C-терминальном конце, более предпочтительно один модуль метки, предпочтительно одной His-метки, присутствует на N-терминальном конце после одного остатка метионина.

9. Молекула iMAT по любому из пп.1-8, которая присутствует в мономерной форме и/или в линейной форме.

10. Молекула iMAT по любому из пп.1-9, которая включает, предпочтительно состоит из одной или более аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23.

11. Вакцина, которая включает молекулу iMAT по любому из пп.1-10.

12. Иммуногенная композиция, которая включает молекулу iMAT по любому из пп.1-10.

13. Фармацевтическая композиция, которая включает молекулу iMAT по любому из пп.1-10.

14. Применение молекулы iMAT по любому из пп.1-10 в способе профилактики и/или терапии одной или более аллергии(ий) у лошадей, предпочтительно гиперчувствительности на укус насекомого (IBH), крапивницы и/или рецидивирующей обструкции дыхательных путей (RAO).

15. Применение вакцины по п.11 в способе профилактики и/или терапии одной или более аллергии(ий) у лошадей, предпочтительно гиперчувствительности на укус насекомого (IBH), крапивницы и/или рецидивирующей обструкции дыхательных путей (RAO).

16. Применение иммуногенной композиции по п.12 в способе профилактики и/или терапии одной или более аллергии(ий) у лошадей, предпочтительно гиперчувствительности на укус насекомого (IBH), крапивницы и/или рецидивирующей обструкции дыхательных путей (RAO).

17. Применение фармацевтической композиции по п.13 в способе профилактики и/или терапии одной или более аллергии(ий) у лошадей, предпочтительно гиперчувствительности на укус насекомого (IBH), крапивницы и/или рецидивирующей обструкции дыхательных путей (RAO).

18. Применение молекулы iMAT по любому из пп.1-10 в способе профилактики и/или терапии одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий) у лошадей и/или предотвращения передачи одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий) у лошадей и/или предотвращение передачи одним или более переносчиками, предпочтительно питающимися кровью мухами, мошками, клещами и/или комарами, более предпочтительно *Rhodococcus pneumonia*, удушения, африканской чумы лошадей, вируса лихорадки Западного Нила, дерматофитии и/или паразитов пищеварительного тракта и/или других органов и/или криптоспориоза, гельминтов и/или их препатентных стадий развития.

19. Применение вакцины по п.11 в способе профилактики и/или терапии одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий) у лошадей и/или предотвращения передачи одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий) у лошадей и/или предотвращение передачи одним или более переносчиками, предпочтительно питающимися кровью мухами, мошками, клещами и/или комарами, более предпочтительно *Rhodococcus pneumonia*, удушения, африканской чумы лошадей, вируса лихорадки Западного Нила, дерматофитии и/или паразитов пищеварительного тракта и/или других органов и/или криптоспориоза, гельминтов и/или их препатентных стадий развития.

20. Применение иммуногенной композиции по п.12 в способе профилактики и/или терапии одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий) у лошадей и/или предотвращения передачи одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий) у лошадей и/или предотвращение передачи одним или более переносчиками, предпочтительно питающимися кровью мухами, мошками, клещами и/или комарами, более предпочтительно *Rhodococcus pneumonia*, удушения, африканской чумы лошадей, вируса лихорадки Западного Нила, дерматофитии и/или паразитов пищеварительного тракта и/или других органов и/или криптоспориоза, гельминтов и/или их препатентных стадий развития.

21. Применение фармацевтической композиции по п.13 в способе профилактики и/или терапии одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий) у лошадей и/или предотвращения передачи одного или более инфекционного(ых) заболевания(ий) у лошадей и/или предотвращение передачи одним или более переносчиками, предпочтительно питающимися кровью мухами, мошками, клещами и/или комарами, более предпочтительно *Rhodococcus pneumonia*, удушения, африканской чумы лошадей, вируса лихорадки Западного Нила, дерматофитии и/или паразитов пищеварительного тракта и/или других органов и/или криптоспориоза, гельминтов и/или их препатентных стадий развития.

22. Нуклеиновая кислота, которая кодирует изолированную молекулу по любому из пп.1-10.

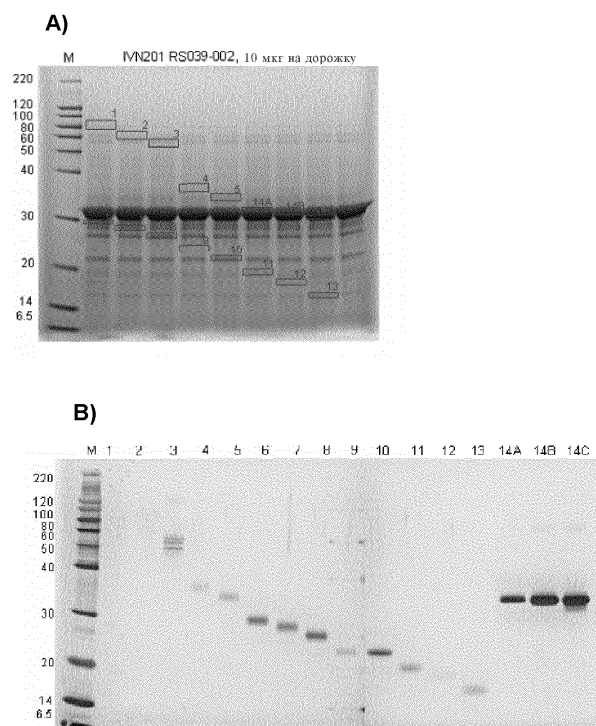
23. Вектор, который включает по крайней мере одну нуклеиновую кислоту по п.22.

24. Первичная клетка или линия клеток, которая включает по крайней мере одну нуклеиновую кислоту по п.22.

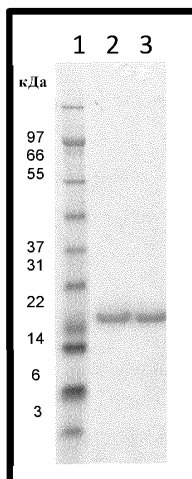
25. Первичная клетка или линия клеток, которая включает по крайней мере один вектор по п.23.

Culicoides nubeculosus			
Аллергом	Uniprot	Предоставленное Uniprot наименование	Номер доступа Uniprot
Cul n 1	http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BMP6	Рибосомальный P0 белок	Q9BMP6
Cul n 2	http://www.uniprot.org/uniprot/B9URL8	Гиалуронидаза	B9URL8
Cul n 3	http://www.uniprot.org/uniprot/D9IL13	Cul n 3 аллерген	D9IL13
Cul n 4	http://www.uniprot.org/uniprot/D9IL14 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URH7	Cul n 4 аллерген Секретируемый белок слюны	D9IL14 B9URH7
Cul n 5	http://www.uniprot.org/uniprot/D9IL15	Cul n 5 аллерген	D9IL15
Cul n 6	http://www.uniprot.org/uniprot/D9IL16 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URK8 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URK2 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URJ2 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URH2	Cul n 6 аллерген Секретируемый белок слюны Секретируемый белок слюны Секретируемый белок слюны Секретируемый белок слюны	D9IL15 B9URK8 B9URK2 B9URJ2 9URH2
Cul n 7	http://www.uniprot.org/uniprot/D9IL17	Cul n 7 аллерген	D9IL17
Cul n 8	http://www.uniprot.org/uniprot/B9URL7 http://www.uniprot.org/uniprot/D9IL18	Мальтаза Cul n 8 аллерген	B9URL7 D9IL18
Cul n 9	http://www.uniprot.org/uniprot/B9URI1 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URII5 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URJ9 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URK5 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URK7 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URL5	Cul n 9 аллерген Родственный D7 белок слюны Родственный D7 белок слюны Родственный D7 белок слюны Родственный D7 белок слюны Родственный D7 белок слюны	B9URL7 B9URII5 B9URJ9 B9URK5 B9URK7 B9URL5
Cul n 10	http://www.uniprot.org/uniprot/D9IL20 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URK6	Cul n 10 аллерген Секретируемый белок слюны	D9IL20 B9URK6
Cul n 11	http://www.uniprot.org/uniprot/D9IL21 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URH8	Cul n 11 аллерген Трипсин	D9IL21 B9URH8
Cul n 12	http://www.uniprot.org/uniprot/B9URJ1 http://www.uniprot.org/uniprot/B9URL2	Родственный антигену-5 белок слюны Родственный антигену-5 белок слюны	B9URJ1 B9URL2
Cul n HSP70			
Culicoides absoletus			
Cul ob 2	http://www.uniprot.org/uniprot/M4WGZ3	Cul o2 аллерген	M4WGZ3
Cul ob 4	http://www.uniprot.org/uniprot/M4WGZ8	Cul o7 аллерген	M4WGZ8
Cul ob 7	http://www.uniprot.org/uniprot/M4WkK63	Cul o5 аллерген	M4WkK63
Cul ob 8	http://www.uniprot.org/uniprot/M4WGA6	Cul o1 аллерген	M4WGA6
Cul ob 9	http://www.uniprot.org/uniprot/M4WGB0	Cul o6 аллерген	M4WGB0
Cul ob 11	http://www.uniprot.org/uniprot/M4WIP76	Cul o4 аллерген	M4WIP76
Cul ob 12	http://www.uniprot.org/uniprot/M4X062 http://www.uniprot.org/uniprot/K9P0U1 http://www.uniprot.org/uniprot/K9PIW5	Cul o3 аллерген Аллерген Cul o1 Cul o2 аллерген	M4X062 K9P0U1 K9PIW5
Cul so 11	http://www.uniprot.org/uniprot/Q66UC8 http://www.uniprot.org/uniprot/Q66UD0	Поздний трипсин Поздний трипсин	Q66UC8 Q66UD0
Cul so 12	http://www.uniprot.org/uniprot/Q66UE5	Родственный антигену-5 белок слюны	Q66UE5
Cul so 4	http://www.uniprot.org/uniprot/Q66TZ2 http://www.uniprot.org/uniprot/Q66TZ4	Путативный неохарактеризованный белок Путативный неохарактеризованный белок	Q66TZ2 Q66TZ4
Cul so 6	http://www.uniprot.org/uniprot/Q66U95	Путативный секретируемый белок слюны	Q66U95
Cul so 7	http://www.uniprot.org/uniprot/Q66U31 http://www.uniprot.org/uniprot/Q66U33	Путативный неохарактеризованный белок Путативный неохарактеризованный белок	Q66U31 Q66U33
Cul so 8	http://www.uniprot.org/uniprot/Q66UC5	Мальтаза	Q66UC5
Cul so 9	http://www.uniprot.org/uniprot/K9PIW5 http://www.uniprot.org/uniprot/Q66TY7 http://www.uniprot.org/uniprot/Q66TY9 http://www.uniprot.org/uniprot/Q66U59 http://www.uniprot.org/uniprot/Q66U77 http://www.uniprot.org/uniprot/Q66UB7	Cul o2 аллерген Путативный неохарактеризованный белок Путативный неохарактеризованный белок Родственный D7 белок Путативный секретируемый белок слюны Родственный D7 белок	K9PIW5 Q66TY7 Q66TY9 Q66U59 Q66U77 Q66UB7

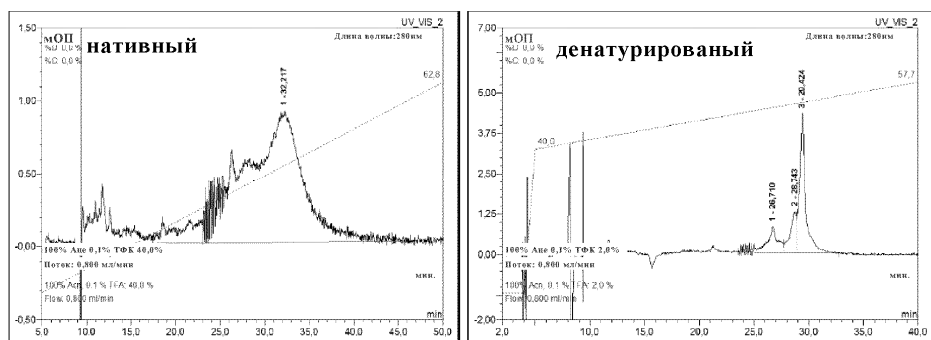
Фиг. 1



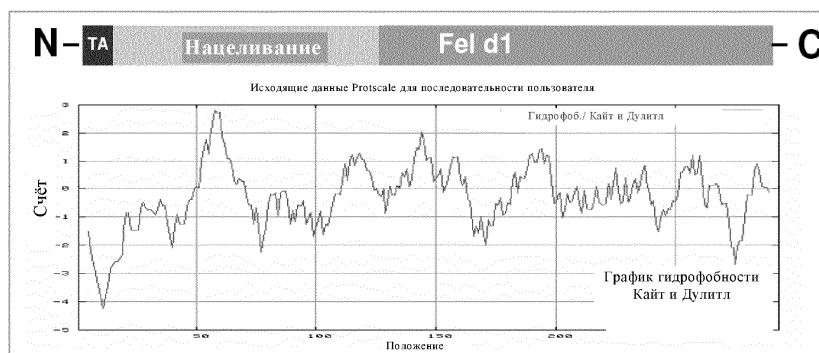
Фиг. 2



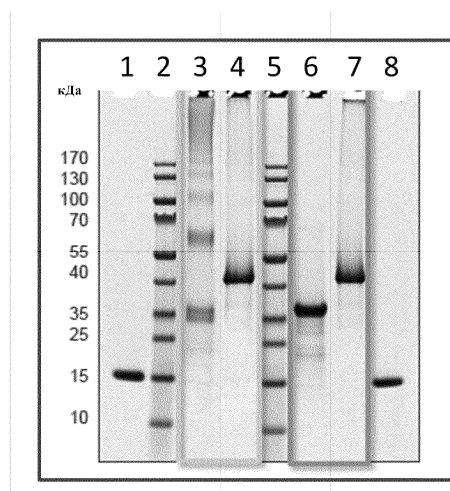
Фиг. 3



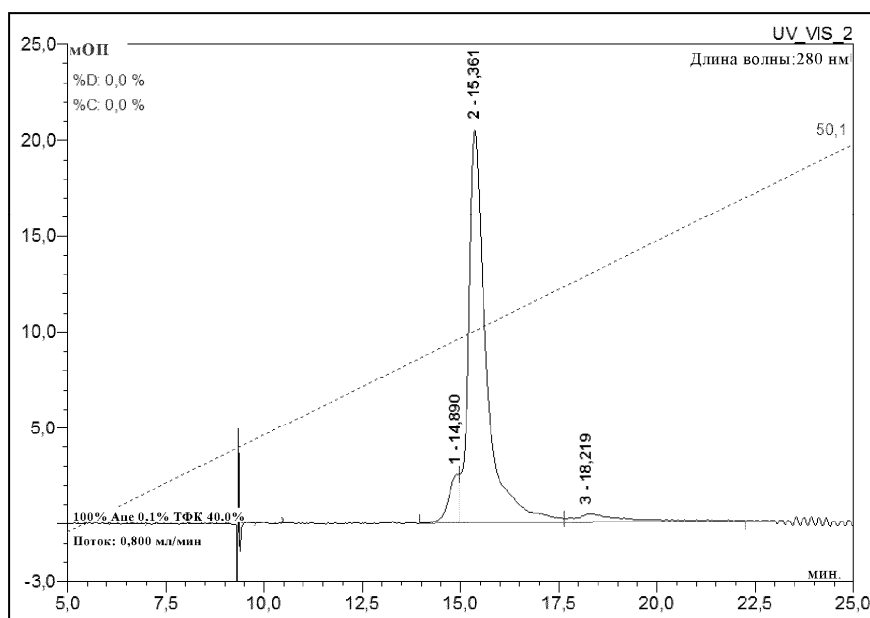
Фиг. 4



Фиг. 5

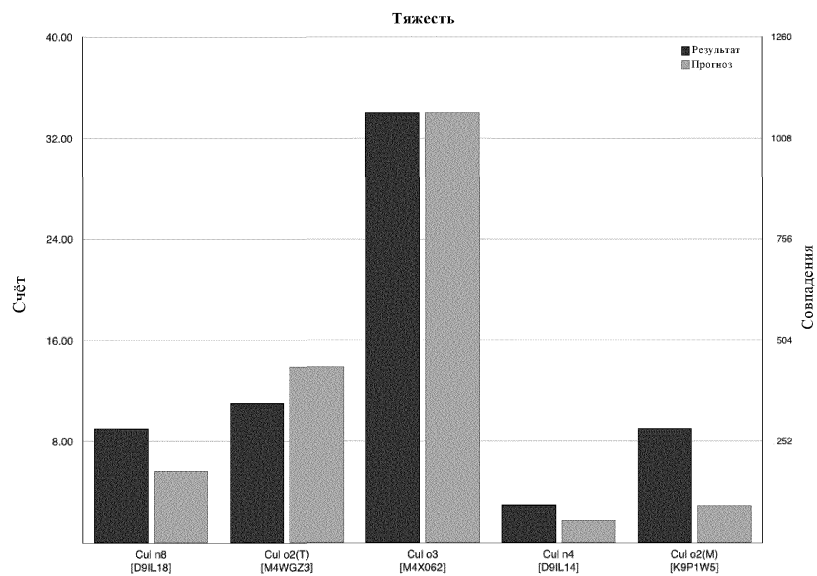


Фиг. 6

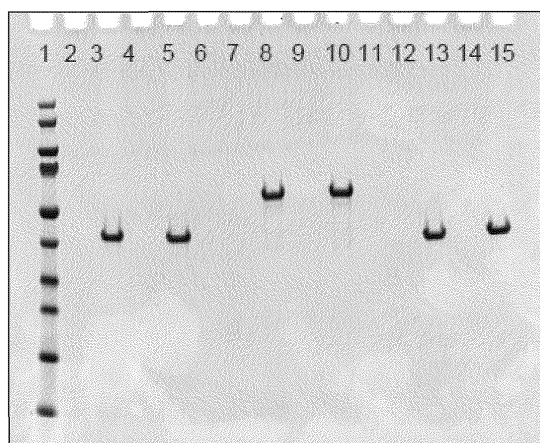


Фиг. 7

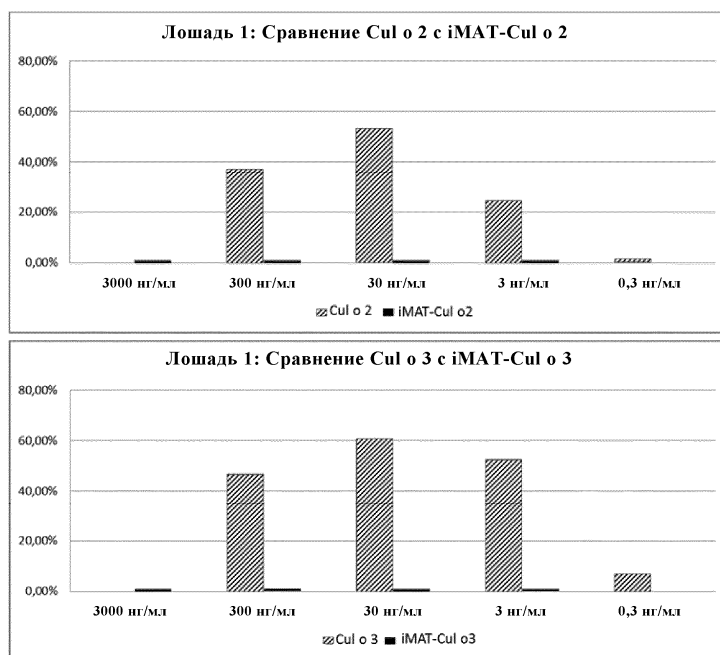
034692



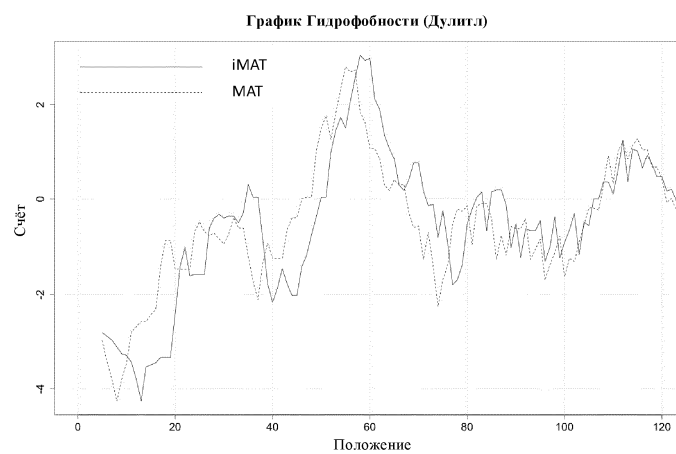
Фиг. 8



Фиг. 9

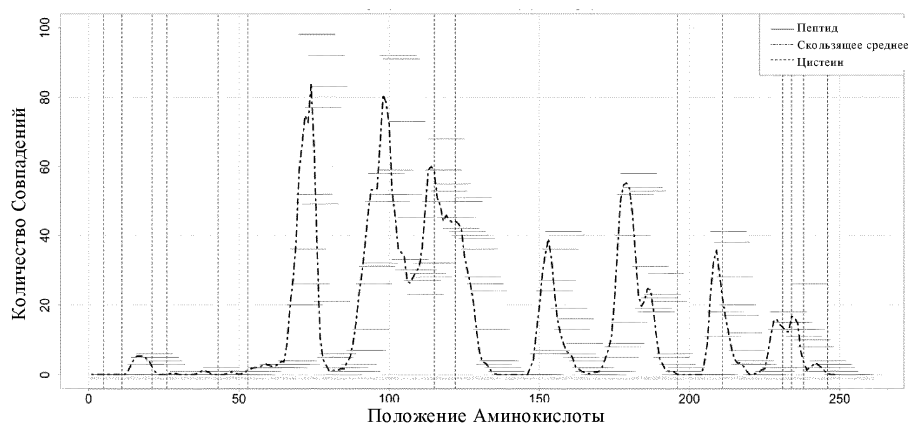


Фиг. 10



Фиг. 11

M4X062 аллерген CuI o 3 (суммарных совпадений: 3610 при длине пептида в 10 а.к.) *Culicoides obsoletus*



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2