

**(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)**

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро
(43) Дата международной публикации
05 мая 2022 (05.05.2022)



(10) Номер международной публикации
WO 2022/093065 A1

(51) Международная патентная классификация:

*A61K 39/35 (2006.01) C07K 14/02 (2006.01)
A61K 39/36 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)*

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2021/000437

(22) Дата международной подачи:

14 октября 2021 (14.10.2021)

(25) Язык подачи:

Русский

(26) Язык публикации:

Русский

(30) Данные о приоритете:

2020135032 26 октября 2020 (26.10.2020) RU

(71) Заявитель: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ГОСУ-

ДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР "ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ" ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА (NATIONAL RESEARCH CENTER INSTITUTE OF IMMUNOLOGY FEDERAL MEDICAL-BIOLOGICAL AGENCY OF RUSSIA) [RU/RU]; Каширское шоссе, 24 Москва, 115522, Moscow (RU).

(72) Изобретатели: ХАИТОВ, Муса Рахимович (KHAITOV, Musa Rakhimovich); ул. Большая Грузинская, 39, кв. 120 Москва, 123056, Moscow (RU). ВАЛЕНТА, Рудольф (VALENTA, Rudolf); Бетховенштрассе, 18 Терезиенфельд, А-2604, Theresienfeld (AT). ВЕБЕР, Милене (WEBER, Milena); Бильротштрассе, 2B/33 Вена, А-1190, Vienna (AT). КАМПАНА, Раффаэла (CAMPANA, Raffaele); Шейбенбергштрассе, 20/4 Вена, А-1180, Vienna (AT). ШИЛОВСКИЙ,

(54) Title: RECOMBINANT POLYPEPTIDE BASED ON BIRCH POLLEN ALLERGEN AND APPLE ALLERGEN

(54) Название изобретения: РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПОЛИПЕПТИД НА ОСНОВЕ АЛЛЕРГЕНА ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ И АЛЛЕРГЕНА ЯБЛОКА

A-PreS



B-PreS



AB-PreS



ФИГ. 2.

(57) Abstract: The invention relates to medicine, specifically to biotechnology, immunology and allergology, and concerns the production of a recombinant polypeptide for allergen-specific immunotherapy, said peptide being capable of inducing blocking IgG-antibodies to birch pollen allergen and cross-reactive food allergens. A recombinant polypeptide for treating or preventing allergies to birch pollen and apple allergen contains peptide fragments of wild-type allergen of birch pollen and apple joined with the surface polypeptide PreS of the hepatitis B virus, and has the amino acid sequence SEQ ID NO 2. A recombinant peptide is produced that contains epitopes necessary to activate protective antibodies against Bet v 1 and Mal d 1 in a single protein, which makes it possible to produce a single-component vaccine instead of using a vaccine containing two or more allergen derivatives.

(57) Реферат: Изобретение относится к медицине, а именно к биотехнологии, иммунологии и аллергологии, и касается получения рекомбинантного полипептида для аллерген-специфической иммунотерапии, способного индуцировать блокирующие IgG-антитела к аллергену пыльцы бересклета и к перекрестным пищевым аллергенам. Рекомбинантный полипептид для лечения или профилактики аллергии на аллерген пыльцы бересклета и яблока содержит пептидные фрагменты аллергена дикого типа

WO 2022/093065 A1



Игорь Петрович (SHILOVSKIY, Igor Petrovich); Пропспект Ленинского Комсомола, 13, кв. 37 Московская область, г. Видное, 142701, Moscow region, g. Vidnoe (RU). **СМИРНОВ, Валерий Валерьевич (SMIRNOV, Valerii Valerievich);** ул. Циолковского, 36, кв. 27 Московская область, г. Долгопрудный, 141700, Moscow region, g. Dolgoprudny (RU). **ЖЕРНОВ, Юрий Владимирович (ZHERNOV, Yurii Vladimirovich);** Волков переулок, 9, строение 1, кв. 64 Москва, 123242, Moscow (RU). **АНДРЕЕВ, Сергей Михайлович (ANDREEV, Sergei Mihailovich);** ул. Кировоградская, 24, к. 1, кв. 125 Москва, 117519, Moscow (RU). **ШАТИЛОВ, Артем Андреевич (SHATILOV, Artem Andreevich);** к. 402, кв. 63 Москва, г. Зеленоград, 124498, Moscow, g. Zelenograd (RU). **ТИМОФЕЕВА, Анастасия Витальевна (TIMOFEEVA, Anastasiya Vitalievsna);** к. 402, кв. 63 Москва, г. Зеленоград, 124498, Moscow, g. Zelenograd (RU). **ИЛЬИНА, Наталья Ивановна (ILINA, Nataliya Ivanovna);** 1-ый Нагатинский проезд, 14, кв. 66 Москва, 115230, Moscow (RU). **ФЕДЕНКО, Елена Сергеевна (FEDENKO, Elena Sergeevna);** Бульвар Андрея Тарковского, 4, кв. 472 Москва, п. Внуковское, 108850, Moscow, р. Vnukovskoe (RU). **ЕЛИСЮТИНА, Ольга Гурьевна (ELISYUTINA, Olga Gurievna);** ул. Бирюлёвская, 44/6, кв. 127 Москва, 115547, Moscow (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- с перечнем последовательностей в соответствии с Правилом 5.2(a)

пыльцы березы, и яблока, соединенные с поверхностным полипептидом PreS вируса гепатита B, и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO 2. Получен рекомбинантный полипептид, содержащий эпигенотипы, необходимые для активации защитных антител против Bet v 1 и Mal d 1 в одном белке, что позволяет получить однокомпонентную вакцину, вместо того, чтобы использовать вакцины, содержащие два или более производных аллергенов.

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПОЛИПЕПТИД НА ОСНОВЕ АЛЛЕРГЕНА
ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ И АЛЛЕРГЕНА ЯБЛОКА**

Область техники

Изобретение относится к медицине, а именно к биотехнологии, иммунологии и аллергологии, и касается получения рекомбинантного полипептида для аллерген-специфической иммунотерапии, способного индуцировать блокирующие IgG-антитела к аллергену пыльцы березы и к перекрестным пищевым аллергенам.

Предшествующий уровень техники

Основной механизм в аллерген-специфической иммунотерапии (AIT) — индукция аллерген-специфических антител класса IgG, которые блокируют связывание антител класса IgE с сенсибилизирующим агентом у пациентов [1]. Аллерген-специфические блокирующие IgG-антитела, индуцированные в ходе AIT, уменьшают симптомы аллергии, блокируя перекрестное связывание IgE-антител на тучных клетках и базофилах [2]. К тому же, индуцированные в ходе AIT аллерген-специфические IgG-антитела способны ингибировать IgE-обусловленную презентацию аллергена Т-клетками и, таким образом, уменьшать позднюю стадию аллергической реакции [3]. Наконец, аллерген-специфические IgG-антитела способны связывать аллерген, предотвращая усиление аллерген-специфического IgE-ответа, у пациентов с аллергией при контакте с аллергеном. Предположительно этот механизм, приводит к долгосрочному снижению уровня аллерген-специфических IgE-антител у пациентов, проходящих долговременный курс AIT [4].

Аллергия на пыльцу березы часто встречается у людей на территории России и других северных стран. Она зачастую ассоциирована с оральным аллергическим синдромом (OAS) и возникает при употреблении пищи растительного происхождения, поскольку IgE-антитела, направленные против основного аллергена березы – Bet v 1, также перекрестно реагируют со структурно родственными аллергенами других растений [5]. В частности, такая кросс-реактивность Bet v 1 имеет место с аллергеном яблока – Mal d 1, что приводит к появлению OAS у пациентов с аллергией на березу при употреблении в пищу яблок. В ходе аллерген-специфической иммунотерапии с применением экстрактов, содержащих Bet v 1 или рекомбинантных производных аллергена Bet v 1 происходит индукция не только протективных IgG-антител к Bet v 1, но также блокирующих IgG-антител к аллергену яблока Mal d 1 [6]. Поэтому AIT, направленная на терапию аллергии на пыльцу березы, частично защищает от появления OAS, но эта защита не стойкая [7].

Следовательно, существует потребность в разработке вакцин для АИТ, способных индуцировать блокирующие IgG-антитела не только к аллергену пыльцы березы Bet v 1, но и к перекрестным пищевым аллергенам.

Разработана фармацевтическая композиция для специфической иммунотерапии аллергий, в инициацию которых вовлечен основной аллерген пыльцы березы Bet v 1, включающая гипоаллергенный основной аллерген пыльцы березы Bet v 1 и/или его фармацевтически приемлемые производные. Гипоаллергенные основные аллергены пыльцы березы отличаются отсутствием или снижением связывания иммуноглобулина Е с одновременным сохранением терапевтически релевантной стимуляции Т-клеток (WO 03/072601 (МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ), 04.09.2003).

Известны рекомбинантные аллергены Bet v 1, использование которых позволяет снизить специфическую IgE-связывающую способность по сравнению с IgE-связывающей способностью аллергена природного происхождения. Рекомбинантный аллерген Bet v 1 является мутантом аллергена Bet v 1 природного происхождения, где мутантный аллерген Bet v 1 имеет по меньшей мере четыре мутации, где каждая мутация является заменой одного экспонированного на поверхности аминокислотного остатка другим остатком, который не встречается в том же положении в аминокислотной последовательности любого известного гомологичного белка в пределах таксономического вида (WO 02/40676 (АЛЬК-АБЕЛЛО), 23.05.2002).

Согласно WO 2013/017591 (LOFARMA SPA), 07.02.2013 получен гибридный белок для применения в иммунотерапии пациентов, подверженных аллергии к пыльце *Malus domestica* и/или *Betula verrucosa*, содержащий белок, который представляет собой гипоаллергенный мутант главного аллергена *Malus domestica*, и белок, который представляет собой гипоаллергенный мутант главного аллергена Bet v 1 из пыльцы *Betula verrucosa*, разделенные линкером. Данная технология создания гипоаллергенных вакцин примечательна тем, что в последовательность ДНК аллергенов вводиться сайт-направленные мутации. В результате чего полипептидная последовательность аллергена также меняется, приводя к снижению аллергенности. Такой подход позволил авторам изобретения снизить IgE-реактивность химерного мутантного белка. Недостатком полученного химерного мутантного белка является его остаточная IgE-реактивность. Кроме того, он содержит в своем составе Т-клеточные эпитопы. т.е. имеется возможность активации Т-клеток, производящих провоспалительные факторы, что в свою очередь снижает безопасность данного белка.

В настоящее время создано новое поколение молекулярных вакцин для АИТ, способных связать IgG-антитела с сайтами IgE-антител на аллергенах [8].

Показано, что связывание IgG-антитела с сайтами IgE-антител на аллергенах достигается путем слияния не аллергенных пептидов, полученных из участков IgE-связывания аллергенов с PreS-белком вируса гепатита В, выступающего в качестве носителя. Этот новый тип молекулярных аллерговакцин обладает множеством преимуществ перед традиционными вакцинами на основе экстрактов аллергенов, как по способу производства, безопасности и удобству клинического применения [9]. Технология на основе белка-носителя PreS, так же используется для создания гипоаллергенных вакцин для лечения пациентов с аллергией на пыльцу березы [10]. В частности, один из кандидатов, названный 2PAPB-PreS, обозначаемый также как B-Pres, при иммунизации кроликов лучше индуцирует протективные IgG-антитела, чем нативный рекомбинантный аллерген rBet v 1 [10].

Известно получение гипоаллергенного белка, который состоит из одной гипоаллергенной молекулы, происходящей из аллергена, слитой со вторым не аллергенным белком, происходящим из патогена. Аллерген выбран из группы, состоящий из основных аллергенов пыльцы березы, в частности Bet v 1 и Bet v 4, основные аллергенов пыльцы тимофеевки луговой, основных аллергенов клеща домашней пыли, основных аллергенов кошек Fel d 1 и Fel d 2, основных аллергенов пчел, основных аллергенов ос, аллергенов амброзии (WO 2007/140505 (BIOMAY AG), 13.12.2007).

Наиболее близким аналогом изобретения является вакцинальная композиция, предназначенная для лечения или предотвращении аллергии на аллерген пыльцы березы Bet v 1, содержащая эффективное количество аллергена, в частности, аллерген пыльцы березы Bet v 1, и белок-носитель, который является полипептидом PreS вируса гепатита В (WO 2012/168487 (BIOMAY AG), 13.12.2012). Оказалось, что аллерген-специфические IgG антитела, индуцированные иммунизацией подобранными, происходящими от аллергена пептидными фрагментами, соединенными с полипептидом PreS вируса гепатита В, лучше нацеливаются на IgE эпитопы аллергена, в то время как иммунизация аллергеном дикого типа дает в результате IgG, направленный на все части аллергена - также и те, которые не являются IgE-реактивными.

Однако, данная вакцинальная композиция не обладает индуцированием блокирующими IgG-антител перекрестным пищевым аллергенам.

Целью, лежащей в основе данного изобретения, является получение вакцины для аллерген-специфической иммунотерапии, способной индуцировать блокирующие IgG-

антитела к аллергену пыльцы березы и к перекрестным пищевым аллергенам, в частности, к аллергену яблока Mal d 1.

Решение этой проблемы обеспечено получением рекомбинантного полипептида для лечения или профилактики аллергии на аллерген пыльцы березы и аллерген яблока, содержащего пептидные фрагменты аллергена дикого типа пыльцы березы, и яблока, соединенные с поверхностным полипептидом PreS вируса гепатита В, и имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 2.

Рекомбинантный полипептид содержит, по меньшей мере, четыре пептидных фрагмента аллергена дикого типа пыльцы березы Bet v 1, и, по меньшей мере, два пептидных фрагмента аллергена дикого типа яблока Mal d 1.

Аллерген дикого типа выбирают из группы, состоящей из основных аллергенов пыльцы березы, в частности Bet v 1, где два пептидных фрагмента имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO 5 и другие два пептидных фрагмента имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO 6.

Также аллерген дикого типа выбирают из группы, состоящей из основных аллергенов яблока, в частности Mal d 1, имеющих один пептидный фрагмент с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 3 и другой пептидный фрагмент с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 4.

Композиция вакцины для лечения или профилактики аллергии на аллерген пыльцы березы и яблока содержит эффективное количество рекомбинантного полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO 2 и фармацевтически приемлемый наполнитель. Композиция дополнительно содержит по меньшей мере один адьювант и / или консервант. Адьювант представляет собой гидроксид алюминия.

Техническими результатами заявленного изобретения является получение рекомбинантного полипептида AB-PreS (SEQ ID NO 2), содержащего эпитопы, необходимые для активации защитных антител против Bet v 1 и Mal d 1 в одном белке, что позволяет получить однокомпонентную вакцину, вместо того, чтобы использовать вакцины, содержащие два или более производных аллергенов.

У полученного рекомбинантного полипептида AB-PreS, который содержит пептиды из аллергена яблока и березы, слитые с белком PreS, полностью отсутствует IgE-реактивность, что свидетельствует о большей безопасности данного белка. Кроме того, в состав AB-PreS входят пептиды аллергена яблока и березы, имитирующие В-, но не Т-клеточные эпитопы указанных аллергенов. Элиминация Т-клеточных эпитопов из состава

AB-PreS позволяет добиться более существенной безопасности конструкта, т.к. исключена возможность активации Т-клеток, производящих провоспалительные факторы.

Согласно настоящему изобретению, полученный рекомбинантный полипептид AB-PreS (SEQ ID NO 2), кроме пептидных производных от аллергена дикого типа бересы Bet v 1 (SEQ ID NO 5 и SEQ ID NO 6) содержит пептидные производные от аллергена яблока Mal d 1 (SEQ ID NO 3 и SEQ ID NO 4), которые находятся между пептидами аллергена бересы и поверхностным полипептидом PreS гепатита В (SEQ ID NO 7), что позволяет данной рекомбинантной конструкции вызвать повышенный иммунный ответ против аллергенных молекул, и индуцировать блокирующие IgG-антитела к аллергену пыльцы бересы Bet v 1 и к аллергену яблока Mal d 1.

Таким образом, полученный рекомбинантный белок, представленный SEQ ID NO 2, ингибирует IgE-связывание с Mal d 1 значительно более выраженное, чем ингибирование такими же дозами B-PreS полипептида. В итоге вакцина от аллергии на пыльцу бересы на основе AB-PreS полипептида индуцирует более высокий уровень проективных антител, блокирующих IgE-связывание с Bet v 1 и Mal d 1 по сравнению с другими протестированными вакцинами.

Краткое описание графических материалов/фигур.

ФИГ. 1. Множественное выравнивание последовательностей аллергена Bet v 1 и сходных аллергенов.

Аминокислотную последовательность Bet v 1 выравнивали совместно с родственными аллергенами из фруктов, овощей и пыльцы. Идентичные аминокислоты обозначены точками, пробелы обозначены как тире, количество аминокислот указано в правой части поля.

ФИГ. 2. Схематичное изображение полипептидов на основе PreS-белка.

Конструкция A-PreS состоит из двух копий каждого из двух пептидов, производных от Mal d 1 (A-P1 и A-P2), объединенных с PreS-белком. Конструкции B-PreS состоят из двух копий каждого из двух пептидов, производных от Bet v 1 (B-P1 и B-P2), объединенных с PreS-белком. Конструкция AB-PreS сходна по общей конструкции B-PreS, с каждым из двух пептидов от производных Mal d 1, помещённых между последовательностями PreS-белка и пептидов из аллергена бересы.

ФИГ. 3. Последовательность ДНК, кодирующая полипептид AB-PreS и схематическое изображение регионов, кодирующих основные элементы полипептида.

ФИГ. 4. Последовательность аминокислот полипептида AB-PreS и схематическое изображение основных элементов.

ФИГ. 5. Протокол иммунизации кроликов рекомбинантными вакцинами на основе PreS-белка и коммерческими вакцинами на основе экстрактов аллергенов.

Заключительный отбор образцов сыворотки крови отмечен красным квадратом.

ФИГ. 6. Характеристика рекомбинантных белков.

SDS-PAGE, окрашенные раствором кумасси, на котором видны очищенные PreS-белки (B-PreS, A-PreS и AB-PreS) и маркер молекулярной массы (M).

ФИГ. 7. IgE-связывающая способность PreS-белков.

Рекомбинантный Bet v 1 (A) и PreS-белки A-PreS (B), B-PreS (C) и AB-PreS (D) абсорбировались на ИФА-плейте с дальнейшей инкубацией с сыворотками пациентов с аллергией на пыльцу березы (BPA), без аллергии на пыльцу березы (non-BPA) и здоровых добровольцев (HC) в качестве контроля.

Данные представлены как среднее значение оптической плотности (OD) при длине волны 405 нм ± стандартная ошибка. Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 8.0 в соответствии с U-критерием Манна-Уитни.

* - статистически значимо отличается от «HC».

- статистически значимо по сравнению с «non-BPA».

ФИГ. 8. Сравнение A-PreS, B-PreS и AB-PreS с rBet v 1 и rMal d 1 по способности активировать базофилы крови.

Показаны процентные содержания активированных базофилов в крови у четырех пациентов с аллергией на пыльцу березы (B1-B4) после стимуляции различными концентрациями (0,05-5 Нм) Bet v 1 и Mal d 1, эквимолярными концентрациями B-PreS, A-PreS и AB-PreS (A), антитела против IgE использованы в качестве положительного контроля (Pos C), буферный раствор в качестве отрицательного контроля (Neg C) (B).

Данные представлены в виде среднего значения процента активированных базофилов ± стандартная ошибка ($N = 4$).

Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 8.0 в соответствии с U-критерием Манна-Уитни.

* - статистически значимо отличается от «Neg C»

× - статистически значимо отличается от «Bet v 1» и «Mal d 1».

ФИГ. 9. Ингибирование связывания IgE-антител пациентов с аллергеном Bet v 1 с использованием сыворотки кроликов, иммунизированных различными дозами рекомбинантных вакцин на основе PreS-белка.

Процент ингибиования IgE-связывания с rBet v 1 определяли для сывороток от 10 пациентов с аллергией на пыльцу березы.

Предварительная инкубация Bet v 1 с PBS была принята за 0% ингибиования. Данные отображены в виде диаграмм, для которых 50% значений находятся внутри прямоугольной фигуры; горизонтальные линии обозначают медианные значения. Показаны существенные различия в ингибиции, рассчитанные с использованием t-критерия Стьюдента.

* - статистически значимо по сравнению с сывороткой не иммунизированных кроликов «Normal».

* - статистически значимо по сравнению с сывороткой от кроликов, иммунизированных A-PreS.

ФИГ. 10. Ингибиование IgE-связывания с Bet v 1 сыворотками кроликов, иммунизированных коммерческими вакцинами на основе экстрактов аллергенов, через один месяц после последней иммунизации.

Процент ингибиования IgE-связывания с rBet v 1 определяли для сывороток от 10 пациентов с аллергией на пыльцу березы. Предварительная инкубация Bet v 1 с PBS принята за 0% ингибиции. Данные отображены в виде диаграмм, для которых 50% значений находятся внутри прямоугольной фигуры; горизонтальные линии обозначают медианные значения. Показаны существенные различия в ингибиции, рассчитанные с использованием t-критерия Стьюдента.

* - статистически значимо по сравнению с сывороткой не иммунизированных кроликов «Normal».

ФИГ. 11. Ингибиование связывания IgE-антител пациентов с Bet v 1 с использованием сывороток кроли кроликов, иммунизированных рекомбинантными вакцинами на основе PreS-белка, по сравнению с Allergovit.

Процент ингибиования IgE-связывания с rBet v 1 определяли для сывороток от 10 пациентов с аллергией на пыльцу березы. Предварительная инкубация Bet v 1 с PBS принята за 0% ингибиции. Данные отображены в виде диаграмм, для которых 50% значений находятся внутри прямоугольной фигуры; горизонтальные линии обозначают медианные значения. Показаны существенные различия в ингибиции, рассчитанные с использованием t-критерия Стьюдента.

* - статистически значимо по сравнению с сывороткой кроликов, иммунизированных кроликов «Allergovit».

ФИГ. 12. Ингибиование IgE-связывания с аллергеном Mal d 1 с использованием сывороток кроликов, получавших курс АІТ различными дозами PreS-белков.

Процент ингибиования IgE-связывания с rMal d 1 определяли для сывороток от 10 пациентов с аллергией на пыльцу березы. Предварительная инкубация Bet v 1 с PBS принята за 0% ингибиования. Данные отображены в виде диаграмм, для которых 50% значений находятся внутри прямоугольной фигуры; горизонтальные линии обозначают медианные значения. Показаны существенные различия в ингибиовании, рассчитанные с использованием t-критерия Стьюдента.

× - статистически значимо по сравнению с сывороткой кроликов, иммунизированных кроликов «Allergovit».

Подробное описание изобретения

Чтобы исследовать, может ли включение в вакцину B-PreS пептидов из аллергена Mal d 1 иметь преимущество в части индукции протективных IgG-антител к аллергену яблока дополнительно разработано две вакцины на основе PreS-белка. Вакцина, содержащая пептиды, производные от Mal d 1, (A-PreS) и пептиды производные от Bet v 1 и Mal d 1 (AB-PreS), и сравнили их действие с B-PreS и несколькими другими коммерческими вакцинами на основе экстрактов аллергена пыльцы березы. При этом оценивали способность вакцин индуцировать антитела классе IgG, ингибирующих связывание IgE-антител пациентов с аллергенами Bet v 1 и Mal d 1.

ПРИМЕР 1. Проектирование вакцинных конструкций.

На рисунке 1 изображено множественное выравнивание последовательности Bet v 1 с родственными PR10-аллергенами из пыльцы, фруктов, овощей, в которых можно выделить два пептида размером 45 аминокислотных остатков (P1, P2). Эти два пептида представляют собой производные от Bet v 1 из ранее описанной рекомбинантной вакцины, созданной на основе PreS-белка, которая способна индуцировать IgG-антитела, блокирующие IgE пациентов с аллергией на пыльцу березы эффективнее в сравнении с рекомбинантным аллергеном Bet v 1 дикого типа [10].

Были спроектированы три рекомбинантных конструкции на основе PreS-белка. B-PreS (Рисунок 2) был идентичен ранее описанной конструкции 2PAPB-PreS, которая, как было обнаружено, активирует антитела IgG, способные блокировать IgE пациентов с аллергией на пыльцу березы, эффективнее чем рекомбинантный Bet v 1 дикого типа [10]. Так же, были подготовлены две дополнительные конструкции, одна из которых

напоминает конструкцию B-PreS, но вместо пептидных производных от Bet v 1, в нее были добавлены пептиды из Mal d 1 (Рисунок 2). Третья конструкция AB-PreS кроме пептидных производных от Bet v 1 содержит вставленный в B-PreS копию двух пептидных производных от Mal d 1, A-P1 и A-P2, которые находятся между пептидами аллергена березы и PreS последовательностью (Рисунок 2).

Конструкции для экспрессии рекомбинантных антигенов были сделаны следующим образом: ДНК, кодирующие His-меченные фьюжн-белки (рисунок 3) состоящие из PreS-белка, (SEQ ID NO 7) объединенного с пептидами, производными Bet v 1 или Mal d 1, или объединенные с пептидами производных Bet v 1 или Mal d 1 (Mal d 1: A-P1(30-74): LIPKIAAPQAIKQAEILEGGNGPGTIKKITFGEGSQYGYVKHRIDS (SEQ ID NO 3), A-P2 (60-104): GEGSQYGYVKHRIDSIDEASYSYSYTLIEGDALTDTIEKISYETK (SEQ ID NO 4) Bet v 1: B-P1 (aa 30-74): LFPKVAPQAISSEVENIEGGNGPGTIKKISFPEGFPFKYVKDRVDE (SEQ ID NO 5), B-P2 (aa 60-104): PEGFPFKYVKDRVDEVDTNFKNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK (SEQ ID NO 6)) были оптимизированы для экспрессии в *Escherichia coli*, синтезированы (конструкция Mal d 1 – PreS / A-P2-PreS; конструкция Bet v 1 / конструкция Mal d 1-PreS: 2B-P1 / B-P2+1A-P1 / A-P2-PreS – PreS) (ATG:biosynthetics GmbH, Merzhausen, Германия) (Рисунок 2) и вставлены по сайтам рестрикции NdeI / XhoI плазмида pET-27b (Novagen, Darmstadt, Германия). Правильность последовательности ДНК подтверждали секвенированием обеих цепей рекомбинантной плазмида (ATG:biosynthetics GmbH, Merzhausen, Германия).

Разработан дизайн рекомбинантных слитых PreS-белков, содержащих неаллергенные пептиды из участков связывания IgE основного аллергена пыльцы березы Bet v 1 и основного аллергена яблока Mal d 1.

На рисунке 1 было показано выравнивание пептидных последовательностей Bet v 1, использованных для создания вакцин, с гомологичными PR10-аллергенами из растительной пищи и пыльцы. Пептиды P1 и P2, производные от Bet v 1, были идентичны ранее описанной конструкции 2PAPB-PreS, которая, как было установлено, активирует антитела IgG, блокирующие IgE пациентов с аллергией на пыльцу березы эффективнее, чем рекомбинантный Bet v 1 дикого типа [10]. Однако, эта вакцина не сравнивалась с вакцинами на основе экстрактов аллергенов в отношении способности индуцировать IgG-антитела, блокирующих связывание IgE пациентов с аллергией к аллергену Bet v 1 и Mal d 1, последний из которых является одним из наиболее важных перекрестно-реактивных пищевых аллергенов для пациентов с аллергией на пыльцу березы. Таким образом, A-PreS был разработан аналогично B-PreS на основе гомологичных пептидов A-P1 и A-P2

(рисунок 2). В химерную конструкцию AB-PreS были включены пептиды из аллергена березы и яблока A-P1 и A-P2 (конечный белковый продукт имел прогнозируемый размер около 50 кДа). Белковая последовательность AB-PreS представлена на рисунке 4.

Таким образом, в состав AB-PreS входят пептиды аллергена яблока и березы, имитирующие В-, но не Т-клеточные эпитопы указанных аллергенов.

ПРИМЕР 2. Экспрессия, очистка и биохимическая характеристика рекомбинантных полипептидов.

Рекомбинантные PreS-фьюжн-белки, A-PreS, B-PreS и AB-PreS экспрессировали в штамме *E. Coli* BL21 (DE3) (Stratogene, La Jolla, CA). Трансформированные клетки наращивали в жидкой среде Луция-Бертани (Luria-Bertani), в состав которой входило 25 мг/мл канамицина до оптической плотности OD = 0.6-0.8. Индукцию экспрессии белка осуществляли путем добавления изопропил-β-D-тиогалактопиорозид до конечной концентрации 1 ммоль/л, клетки культивировали в течении 3 часов при температуре 37 С, после центрифугировали при 4000 об/мин в течении 20 минут.

Получившиеся бактериальные осадки были ресуспендированы в 8 М мочевине, 10 Мм NaH₂PO₄ и 10 Мм Трис (8 Рн), содержащей в себе смесь ингибиторов протеаз (Sigma, Aldrich) и 5 мкг/мл ДНКазы I (Sigma, Aldrich), после гомогенизированы в Ultra Turrax 3 раза по 5 минут (IKA, Stauffen, Германия). Осадок гомогенизированных клеток лизировали путем перемешивания в течение 2 часов при 4С. Лизаты клеток очищали центрифугированием при 14000 об/мин в течение 15 минут при 4С, после чего рекомбинантные белки очищали с помощью аффинной хроматографии с никелем (Qiagen, Hilden, Германия). Очищенные фьюжн-белки элюировали с помощью 8 М мочевины, 100Мм NaH₂PO₄ и 10 Мм Трис (Рн 4.5), диализовали 10 Мм NaH₂PO₄, для A-PreS Ph 4.8 Ph 7.8, AB-PreS Ph и для B-PreS Ph 7.4, после чего концентрировали ультрафильтрацией (Amicon Ultra 15; Merck KgaA, Darmstadt, Германия) до значений 0.75-10 мг/мл. Значение определяли с помощью набора BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, IL).

На рисунке 6, показан окрашенный красителем Кумасси синим SDS-PAGE, который содержит очищенные рекомбинантные белки B-PreS, A-PreS и AB-PreS. Белки хорошо очищены примерно на 95%, содержатся в значительном для детекции количестве, примерно 10 мг/л культуры, без каких-либо признаков распада. Очистка проводилась по протоколу, описанному в разделе методы. Наблюдаемая молекулярная масса для трех белков в SDS-PAGE соответствовала прогнозируемой, которая была рассчитана в

соответствии с их аминокислотной последовательностью и наблюдаемыми массами, которые мы определяли с помощью масс-спектрометрии (Рисунок 6). Анализ методом кругового дихроизма (КД) показал, что белки не были свернуты.

ПРИМЕР 3. Получение вакцинной композиции.

Каждый из рекомбинантных очищенных белков был растворен в изотоническом буфере, содержащем 0,9% хлорид натрия и 10 mM фосфат натрия, и к каждому раствору белка было добавлено соответствующее количество гидроксида алюминия. Была приготовлена смесь, содержащая равные части четырех полученных суспензий, и поделена на аликвоты в стерильных условиях в запаянные флаконы. Инъекционная композиция, полученная с помощью этого метода, содержала 0,16 мг/мл каждого A-PreS, B-PreS и AB-PreS.

Состав вакцин с адсорбированным гидроксидом алюминия, содержащих A-PreS, B-PreS и AB-PreS, выполняли, как описано в публикации [11].

Состав вакцинной композиции на 1 мл стерильной воды:

1. AB-PreS – 0,16 мг.
2. Al(OH)₃ – 1,25 мг.
3. NaH₂PO₄ – 1,2 мг (конечная концентрация 10 mM).
4. NaCl – 9 мг (конечная концентрация 0,9%).

Данный состав необходим для достижения максимальной дозы 80 мкг AB-PreS на особь в объеме 0,5 мл/особь. Остальные дозы готовились путем разбавления исходной максимальной дозы соответствующим объемом буфера (10 mM NaH₂PO₄ + 0,9% NaCl).

ПРИМЕР 4. Иммунологическая характеристика рекомбинантных белковых вакцин *in vitro*.

Для оценки способности белков слитых с PreS взаимодействовать с аллерген-специфическими IgE использовали тест ИФА. Планшеты покрывали рекомбинантными аллергенами rBet v1 и rMal d1 или PreS-гибридными белками (A-PreS, B-PreS или AB-PreS) в концентрации 2 мкг/мл при 4С в течение ночи. Затем промывали и блокировали в течение ночи с помощью 2% раствора BSA. После чего планшет инкубировали в течение ночи при 4С с разведёнными 1:10 сыворотками пациентов с аллергией на пыльцу бересклета (группа «ВРА»), пациентов, не страдающих аллергией на пыльцу бересклета (группа «без ВРА»), или здоровых добровольцев (группа «НС»). Связавшиеся IgE-антитела человека детектировали с помощью AP-меченных козьих антител против человеческого IgE

(Invitrogen, USA) в разведении 1:2500. После стадии промывки вносили раствор субстрата ABTS (10 мг/мл). Оптическую плотность измеряли при 405 нм.

4.1. Оценка гипоаллергенных свойств рекомбинантных белков B-PreS, A-PreS и AB-PreS.

Возможная аллергенная активность трех рекомбинантных PreS-белков была исследована в экспериментах по связыванию IgE и в экспериментах по активации базофилов. В первую серию экспериментов было включено 84 добровольца (таблица 2). IgE-связывающая способность B-PreS, A-PreS и AB-PreS сравнивалась с таковой для rBet v 1 с помощью теста ИФА с использованием сывороток от 70 пациентов с аллергией на пыльцу березы (рисунок 7). Мы обнаружили, что ни один из трех рекомбинантных белков не продемонстрировал какой-либо реактивности с IgE-антителами из сывороток пациентов с аллергией на пыльцу березы. В то же время сыворотки этих пациентов значительно реагировали с нативным аллергеном rBet v 1. Также для B-PreS, A-PreS и AB-PreS не выявлено IgE-реактивности с сыворотками пациентов с аллергией на другие аллергены (не пыльцу березы) ($n = 7$) и здоровых добровольцев ($n = 7$) (рисунок 7).

4.2. Тест на активацию базофилов крови (BAT-тест).

Процентное содержание активных базофилов в образцах цельной крови оценивали с помощью набора для определения аллергенности (BAT-тест) (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) в соответствии с инструкцией производителя. BAT-тест выполняли с использованием двух очищенных рекомбинантных аллергенов Bet v 1 и Mal d 1 в трех концентрациях для каждого аллергена: 1 нг / мл, 10 нг/мл, 100 нг/мл и с эквимолярными концентрациями белковых конструкций B-PreS и A-PreS (2,1 нг/мл, 21 нг/мл, 210 нг/мл) и AB-PreS (2,7 нг/мл, 26,6 нг/мл, 266 нг/мл), что соответствует молярной концентрации 0,05, 0,5 и 5 Нм. Положительным контролем были анти-IgE-антитела (0,01 мг / мл), а отрицательным контролем (растворитель PBS). Контроли готовили для каждого пациента.

Образцы крови собирали в полипропиленовые пробирки, содержащие K3 EDTA (S-Monovette, Sarstedt, Германия), и использовали для BAT-теста сразу после сбора. Использовали 100 мкл цельной крови, 20 мкл тестируемого аллергена / контроля и 20 мкл трехцветных антител (CRTH2-FITC, CD203c-PE, CD3-PC7) и 100 мкл раствора для активации. Смешивали указанные компоненты в пластиковых пробирках и инкубировали в течение 15 минут при 37 ° С на водяной бане. После инкубации, реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-раствора и 2 мл раствора для фиксации и лизиса. После

остановки реакции образцы инкубировали при комнатной температуре, в темном месте, в течение 10 минут и центрифугировали 5 минут при 200 g. После удаления супернатанта добавляли по 3 мл PBS в каждую пробирку и центрифугировали образцы в течение 5 мин при 200 g. Эритроциты лизировали, а лейкоциты фиксировали добавлением 0,5 мл 0,1% раствора формальдегида в PBS.

Проточную цитометрию проводили на приборе BD FACS Canto II (BD Biosciences, США). Компенсация была установлена в BD FACSDiva Software (BD Biosciences). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo™ версии 10.6.2 (Tree Star). Результаты представлены в виде процентного содержания активированных базофилов. Активированные базофилы были идентифицированы как CTRH2 pos CD203c pos CD3 neg. Изотипические контроли (крысиный IgG2a, изотипический контроль каппа (Ebr2a), FITC, eBioscience™, мышиный IgG1, (PE-Cy7), MG112, ThermoFisher) отрицательный (PBS) и положительный контроль (антитела анти-IgE) использовали для гейтирования активированных базофилов.

Затем, мы провели эксперименты с участием четырех пациентов с аллергией на пыльцу березы в teste активации базофилов крови. Полученные данные показали, что активация базофилов с помощью rBet v 1 в концентрации 5 Мм была выраженной, тогда как ни один из трех рекомбинантных PreS-белков не индуцировал активацию этих клеток (Рисунок 8А). rMal d 1 также индуцировал активацию базофилов в концентрации 5 Мм у двух пациентов с аллергией на пыльцу березы (В1, В4) (Рисунок 8А). Так же были проведены эксперименты по активации базофилов положительным контролем (антителами против IgE), при этом не было обнаружено активации базофилов при использовании только буферного раствора (отрицательный контроль) (Рисунок 8В).

ПРИМЕР 5. Ингибирование связывания IgE-антител пациентов с рекомбинантными аллергенами rBet v 1 и rMal d 1 с использованием антител кроликов.

Животные

Сорок кроликов (линия Новозеландские белые кролики, самки) массой 2,2-2,5 кг, приобретены в компании «КроЛИнфо» (Россия). Перед первой иммунизацией у каждого кролика собирали образцы сыворотки объемом 0,5-1,0 мл и анализировали с помощью метода ИФА, для определения фонового уровня IgG-антител против Bet v 1 и Mal d 1. В исследование включали кроликов с низким естественным фоновым уровнем этих антител.

Протокол вакцинации

Тридцать кроликов с низким уровнем IgG-антител к Bet v 1 и Mal d 1 были включены в исследование после рандомизированы на 15 групп по 2 кролика в каждой. Каждую группу кроликов индивидуально иммунизировали 3 рекомбинантными вакцинами (A-PreS, B-PreS, AB-PreS) в трех дозах каждая и 6 другими коммерческими вакцинами на основе экстрактов аллергенов:

1. Pollinex Quattro – Bencard
2. Clustoid – Roxall
3. Alutard SQ – ALK
4. Purethal – HAL Allergy
5. Allergovit- Allergopharma
6. Экстракт аллергена из пыльцы березы – Birch Pollen Allergen Extract (Микроген), Россия.

Иммунизация коммерческими вакцинами на основе экстрактов аллергенов проводилась в соответствии рекомендациями производителей для пациентов с аллергией. Порядок инъекций и время отбора образцов крови показаны на Рисунке 5 и в Таблице 1, также в них представлена дополнительная информация о введенных дозах и количестве взятой крови.

Рекомбинантные вакцины получали путем адсорбции трех доз (20, 40, 80 мкг каждого из рекомбинантных белков (Apple-Pres: A-Pres; Birch-Pres: B-Pres; Birch / Apple-Pres: AB-Pres) на гидроксида алюминия, как описано для рекомбинантной вакцины против аллергии на пыльцу трав BM32, созданной также на основе PreS-белка [11]. Каждому кролику делали 5 подкожных инъекций, общим объемом введения 0.5 мл, с 4-недельными интервалами времени (Таблица 1, Рисунок 5).

Выполняли отбор образцов сыворотки крови (примерно 2 мл от каждого кролика) в день первой иммунизации и с 4-недельными интервалами, как указано в таблице 1. Сыворотки хранили при -20 °C до анализа.

Ингибирование связывания IgE пациентов с аллергией на аллерген пыльцы березы rBet v 1 и яблока rMal d 1 определяли с помощью конкурентного ингибирования ИФА. Планшеты сорбировали rBet v 1 или rMal d 1 в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали ночь при 4 °C. После промывки и блокирования в течение ночи 2% BSA, планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37 °C после чего в течение 1 часа при 4 °C с сывороткой кроликов, получавших курсыAIT, в разведении 1:10. Для контроля использовали сыворотку от не иммунизированных кроликов и сравнивали ее с сывороткой, полученной от кроликов через 1 месяц после окончания курса AIT.

Сыворотку кроликов предварительно инкубировали в течение 1 ч при 56 °C, чтобы инактивировать IgE, но сохранить другие изотипы антител, в частности IgG-антитела. Так же использовали дополнительный отрицательный контроль с помощью фосфатно-солевого буфера (PBS), который вносили в лунки планшета вместо сыворотки кроликов. После стадии отмычки, добавляли сыворотку пациентов с аллергией на пыльцу березы в разведении 1:5 и инкубировали ночь при 4 °C, затем детектировали связавшиеся IgE-антитела человека с помощью меченых козьих антител против человеческого IgE, конъюгированных с HRP (Invitrogen, США) в разведении 1:2000. Ингибирование связывания IgE с аллергенами rBet v 1 или rMal d 1 после предварительной инкубации с сывороткой иммунизированных кроликов в процентном отношении рассчитывали для каждой сыворотки пациента следующим образом:

$$\text{процент ингибирования} = 100 - (\text{Odi}/\text{ODPBS} \times 100),$$

где Odi – оптическая плотность после предварительной инкубации с сывороткой от иммунизированных кроликов, OD_{PBS} – оптическая плотность после предварительной инкубации с PBS.

T-критерий Стьюдента (STATISTICA 8.0 StatSoft Inc) использовался для сравнения степени ингибирования после различных курсов иммунизации. Значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым.

ПРИМЕР 6. Определение ингибирования связывания IgE с Bet v 1 при иммунизации B-Pres и AB-PreS.

Пример 6.1. Сравнительный анализ ингибирования связывания IgE с Bet v 1 при иммунизации AB-PreS, B-Pres и A-PreS.

Степень ингибирования связывания IgE-антител пациентов с аллергеном Bet v 1 сыворотками кроликов, получивших курсы АІТ рекомбинантными вакцинами B-PreS, A-PreS и AB-PreS (в трех дозах 20 мкг, 40 мкг или 80 мкг) по сравнению с сывороткой не иммунизированных кроликов и кроликов показаны на рисунке 10. Среднее ингибирование IgE-связывания с Bet v 1 с помощью антител кроликов, получавших A-Pres, всегда было менее 50%, тогда как сыворотка кроликов, иммунизированных B-PreS- и AB-PreS приводила к ингибированию приблизительно на 75%, более того, все три дозы значительно лучше ингибировали IgE-связывание, чем A-PreS (Рисунок 9). Не было выявлено значимых отличий в степени ингибирования IgE-связывания сыворотками кроликов, получавших курсы АІТ вакцинами B-PreS- и AB-PreS (Рисунок 9).

Таким образом, иммунизация B-Pres и AB-PreS индуцирует антитела, которые, ингибируют связывание IgE с Bet v 1 значительно сильнее, чем антитела, индуцированные A-PreS.

Пример 6.2. Сравнительный анализ связывания IgE с Bet v 1 при иммунизации AB-PreS, B-Pres и коммерческих вакцин на основе экстрактов аллергенов березы.

На рисунке 10 представлены данные, демонстрирующие, что антитела, индуцированные у кроликов всеми вакцинами (кроме Purethal), значительно ингибировали связывание IgE-антител пациентов с аллергеном Bet v 1. Самая высокая степень ингибирования IgE-связывания была получена с антителами кроликов, индуцированными вакциной на основе экстрактов аллергенов Allergovit.

Стоит отметить, что рекомбинантные вакцины B-PreS и AB-PreS индуцируют более значимый протективный эффект в сравнении с коммерческой Allergovit (рисунок 10). Таким образом, иммунотерапевтические вакцины на основе B-PreS и AB-PreS превосходят все существующие коммерческие вакцины на основе экстрактов аллергенов в отношении активации антител, блокирующих связывание IgE-антител пациентов с аллергеном Bet v 1.

Для большинства коммерческих вакцин, на основе экстрактов аллергенов было проведено большее количество инъекций, чем для рекомбинантных вакцин на основе PreS-белка (Allergovit: 7 инъекций; Alutard: 15 инъекций; экстракт аллергена из пыльцы березы (Микроген): 30 инъекций; Purethal: 7 инъекций) (Рисунок 5, Таблица 1). Только для вакцин Pollinex и Clustoid, было сделано сопоставимое количество инъекций, четыре и пять, соответственно (рисунок 5, таблица 1). Однако, антитела активируемые двумя последними вакцинами, только в незначительной степени ингибировали связывание IgE-антител пациентов с аллергенов пыльцы березы Bet v 1 (рисунок 10).

Что касается режима введения тестируемых коммерческих вакцин, необходимо иметь в виду, что вакцины Pollinex, Clustoid, Purethal и экстракт аллергена из пыльцы березы компании Микроген должны рассматриваться, как способ предсезонного лечения, что означает необходимость каждый год делать одинаковое количество инъекций перед сезоном цветения березы. В итоге, для полного курса лечения вакциной Allergovit потребуется ввести 14 инъекций в течение 2 лет. Вакцину Alutard также можно вводить каждый год, в качестве предсезонного лечения, которое сводится к 30 инъекциям в течение двухлетнего периода лечения. Кроме того, существует возможность осуществлять ежемесячные инъекции, для которых также потребуется 15 инъекций, из которых 9

инъекций осуществляются в первый год с момента начала лечения и 12 инъекций в дополнительный год лечения.

Еще большим затруднением является лечение с помощью сублингвальной иммунотерапии (SLIT), требующей ежедневного введения экстракта аллергена, что является одной из причин низкого спроса такой терапии. Кроме того, SLIT индуцирует очень низкие уровни аллерген-специфических IgG-антител, и пока неясно, достаточно ли активируется IgG-антител после такой терапии, чтобы блокировать связывание IgE у пациентов с аллергией.

В отличие от приведенных выше особенностей применения вакцин на основе экстрактов аллергенов, схема лечения рекомбинантными вакцинами на основе PreS-белка, будет представлять собой предсезонный курс из 3-5 инъекций с последующими 1 или 2 предсезонными инъекциями в следующем году. Таким образом максимальный курс будет составлять 7 инъекций на два года лечения. Предположение о том, что для повышения уровня аллерген-специфических IgG-антител после базового курса иммунизации необходимы только 1 или 2 дополнительные инъекции, подтверждается результатами, полученными в клинических испытаниях вакцины против аллергии на пыльцу трав BM32, созданной на основе PreS-белка. В проведенном клиническом исследовании было обнаружено, что одной инъекции достаточно, для восстановления аллерген-специфических антител IgG до уровней, полученных через месяц после основного курса иммунизации [12,13]. Таким образом, лечение вакцинами на основе рекомбинантных PreS-белков будет намного удобнее, чем любая существующая в настоящее время форма АИТ.

Иммунизация B-Pres и AB-PreS индуцирует протективные антитела, которые ингибируют связывание IgE с аллергеном Bet v 1 значительно сильнее, чем антитела, индуцированные коммерческими вакцинами на основе экстрактов аллергенов.

Пример 6.3. Сравнительный анализ связывания IgE с аллергеном яблока Mal d 1 при иммунизации AB-PreS и B-Pres.

Иммунизации двумя рекомбинантными вакцинами на основе PreS, B-Pres и AB-Pres, индуцировали сходный уровень протективных антител, которые ингибировали IgE-связывание с аллергеном Bet v 1 (рисунок 11). Обе эти вакцины, в отношении активации антител, блокирующих связывание IgE с Bet v 1, оказались эффективнее остальных вакцин, что мы протестировали (Рисунок 9 и 11). Поэтому B-PreS и AB-PreS сравнивали по их способности индуцировать протективные антитела, блокирующие IgE-связывание с

одним из наиболее важных перекрестно-реактивных пищевых аллергенов – аллергеном яблока Mal d 1. На рисунке 12 показано, что после иммунизации тремя дозами (20 мкг, 40 мкг, 80 мкг) AB-PreS, ингибирование IgE-связывания с Mal d 1 было значительно выраженнее, чем ингибирование такими же дозами B-PreS. В итоге рекомбинантная вакцина AB-PreS от аллергии на пыльцу березы на основе PreS-белка, индуцирует более высокий уровень проективных антител, блокирующих IgE-связывание с Bet v 1 и Mal d 1 по сравнению с другими протестированными вакцинами.

Антитела, индуцированные иммунизацией AB-Pres, значительно лучше ингибируют IgE-связывание с аллергеном яблока Mal d 1, в сравнении с B-Pres.

Таким образом, получение рекомбинантного полипептида AB-PreS (SEQ ID NO 2), содержащего эпитопы, необходимые для активации защитных антител против Bet v 1 и Mal d 1 в одном белке, позволяет получить однокомпонентную вакцину, вместо того, чтобы использовать вакцины, содержащие два или более производных аллергенов.

У полученного рекомбинантного полипептида AB-PreS, который содержит пептиды из аллергена яблока и березы, слитые с белком PreS, полностью отсутствует IgE-реактивность, что свидетельствует о большей безопасности данного белка. Кроме того, в состав AB-PreS входят пептиды аллергена яблока и березы, имитирующие B-, но не Т-клеточные эпитопы указанных аллергенов. Элиминация Т-клеточных эпитопов из состава AB-PreS позволяет добиться более существенной безопасности конструкта, т.к. исключена возможность активации Т-клеток, продуцирующих провоспалительные факторы.

Данная конструкция полипептида AB-PreS вызывает повышенный иммунный ответ против аллергенных молекул, и индуцирует блокирующие IgG-антитела к аллергену пыльцы березы Bet v 1 и к аллергену яблока Mal d 1. При этом ингибирует IgE-связывание с Mal d 1 значительно сильнее, чем ингибирование такими же дозами B-PreS полипептида. В итоге вакцина от аллергии на пыльцу березы на основе AB-PreS полипептида индуцирует более высокий уровень проективных антител, блокирующих IgE-связывание с Bet v 1 и Mal d 1 по сравнению с другими коммерческими вакцинами.

Список источников

1. Doroфеева Y. et al. Past, presence, and future of allergen immunotherapy vaccines // Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2020.
2. Eckl-Dorna J. et al. Allergen-specific antibodies regulate secondary allergen-specific immune responses // Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 9, № 3131. P. 1–15.
3. van Neerven R.J. et al. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. // J. Immunol. 1999.
4. Niederberger V. et al. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. Vol. 101, № 2. P. 14677–14682.
5. Elisutina O. et al. Bet v 1-specific IgE levels and PR-10 reactivity discriminate silent sensitization from phenotypes of birch allergy // Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2019.
6. Gadermaier E. et al. Analysis of the antibody responses induced by subcutaneous injection immunotherapy with birch and Fagales pollen extracts adsorbed onto aluminum hydroxide // Int. Arch. Allergy Immunol. 2010. Vol. 151, № 1. P. 17–27.
7. Bucher X. et al. Effect of tree pollen specific, subcutaneous immunotherapy on the oral allergy syndrome to apple and hazelnut // Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol. 2004.
8. Valenta R., Campana R., Niederberger V. Recombinant allergy vaccines based on allergen-derived B cell epitopes // Immunology Letters. Elsevier B.V., 2017. Vol. 189. P. 19–26.
9. Valenta R. et al. Vaccine development for allergen-specific immunotherapy based on recombinant allergens and synthetic allergen peptides: Lessons from the past and novel mechanisms of action for the future // J. Allergy Clin. Immunol. Mosby Inc., 2016. Vol. 137, № 2. P. 351–357.
10. Marth K. et al. A nonallergenic birch pollen allergy vaccine consisting of hepatitis PreS-fused Bet v 1 peptides focuses blocking IgG toward IgE epitopes and shifts immune responses to a tolerogenic and Th1 phenotype // J. Immunol. The American Association of Immunologists, 2013. Vol. 190, № 7. P. 3068–3078.
11. Zieglmayer P. et al. Mechanisms, safety and efficacy of a B cell epitope-based vaccine for immunotherapy of grass pollen allergy // EBioMedicine. Elsevier B.V., 2016. Vol. 11. P. 43–57.

12. Niederberger V. et al. Safety and efficacy of immunotherapy with the recombinant B-cell epitope-based grass pollen vaccine BM32 // J. Allergy Clin. Immunol. Mosby Inc., 2018. Vol. 142, № 2. P. 497–509.

13. Eckl-Dorna J. et al. Two years of treatment with the recombinant grass pollen allergy vaccine BM32 induces a continuously increasing allergen-specific IgG4 response // EBioMedicine. 2019. Vol. 50. P. 421–432.

Таблица 1.

График иммунизаций и дозы.

№ группы	Вакцина	Количествокроликов	Доза, мкг/особь	Объем, мл/королик	Подкожное введение График иммунизации	График отбора проб сывороток
1	Apple-PreS A-PreS	2	20	0,5	1. Иммунизация: день 1 2. Иммунизация: день 28 3. Иммунизация: день 56 4. Иммунизация: день 84 5. Иммунизация: день 112	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (2 мл) 4. день 84 (2 мл) 5. день 112 (2 мл) 6. день 140 (последний день отбора) (40-90 мл)
2	Apple-PreS A-PreS	2	40	0,5	1. Иммунизация: день 1 2. Иммунизация: день 28 3. Иммунизация: день 56 4. Иммунизация: день 84 5. Иммунизация: день 112	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (2 мл) 4. день 84 (2 мл) 5. день 112 (2 мл) 6. день 140 (последний день отбора) (40-90 мл)
3	Apple-PreS A-PreS	2	80	0,5	1. Иммунизация: день 1 2. Иммунизация: день 28 3. Иммунизация: день 56 4. Иммунизация: день 84 5. Иммунизация: день 112	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (2 мл) 4. день 84 (2 мл) 5. день 112 (2 мл) 6. день 140 (последний день

						отбора) (40-90 мл)
4	Birch-PreS B-PreS	2	20	0,5	1. Иммунизация: день 1 2. Иммунизация: день 28 3. Иммунизация: день 56 4. Иммунизация: день 84 5. Иммунизация: день 112	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (2 мл) 4. день 84 (2 мл) 5. день 112 (2 мл) 6. день 140 (последний день отбора) (40-90 мл)
5	Birch-PreS B-PreS	2	40	0,5	1. Иммунизация: день 1 2. Иммунизация: день 28 3. Иммунизация: день 56 4. Иммунизация: день 84 5. Иммунизация: день 112	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (2 мл) 4. день 84 (2 мл) 5. день 112 (2 мл) 6. день 140 (последний день отбора) (40-90 мл)
6	Birch-PreS B-PreS	2	80	0,5	1. Иммунизация: день 1 2. Иммунизация: день 28 3. Иммунизация: день 56 4. Иммунизация: день 84 5. Иммунизация: день 112	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (2 мл) 4. день 84 (2 мл) 5. день 112 (2 мл) 6. день 140 (последний день отбора) (40-90 мл)

7	Birch/Apple-PreS AB-PreS	2	20	0,5	1. Иммунизация: день 1 2. Иммунизация: день 28 3. Иммунизация: день 56 4. Иммунизация: день 84 5. Иммунизация: день 112	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (2 мл) 4. день 84 (2 мл) 5. день 112 (2 мл) 6. день 140 (последний день отбора) (40-90 мл)
8	Birch/Apple-PreS AB-PreS	2	40	0,5	1. Иммунизация: день 1 2. Иммунизация: день 28 3. Иммунизация: день 56 4. Иммунизация: день 84 5. Иммунизация: день 112	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (2 мл) 4. день 84 (2 мл) 5. день 112 (2 мл) 6. день 140 (последний день отбора) (40-90 мл)
9	Birch/Apple-PreS AB-PreS	2	80	0,5	1. Иммунизация: день 1 2. Иммунизация: день 28 3. Иммунизация: день 56 4. Иммунизация: день 84 5. Иммунизация: день 112	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (2 мл) 4. день 84 (2 мл) 5. день 112 (2 мл) 6. день 140 (последний день отбора) (40-90 мл)

10	Pollinex Quattro – Bencard	2		1	Иммунизация: день 1 300 ЕД (1 мл) из флакона 300 ЕД/мл (зеленый) 2. Иммунизация: день 14 800 ЕД (1 мл) из флакона 800 ЕД/мл (Желтый) 3. Иммунизация: день 28 2000 ЕД (1 мл) из флакона 2000 ЕД/мл (Красный) 4. Иммунизация: день 56 2000 ЕД (1 мл) из флакона 2000 ЕД/мл (Красный)	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (2 мл) 4. день 84 (последний день отбора) (40-90 мл)
11	Clustoid – Roxall	2		0,2-0,5	1 Иммунизация: день 1, одна часть 2000 TU (0.2 мл)) из флакона 10000 TU/мд (Fx) 2. Иммунизация: день 1, вторая часть, через 15 минут, 5000 TU (0.5 мл)) из флакона 10000 TU/мл (Fx) 3. Иммунизация: день 7 5000 TU (0.5 мл) из флакона 10000 TU/мл (Fx) 4. Иммунизация: день 14 7 5000 TU (0.5 мл) из флакона 10000 TU/мл (Fx) 5 Иммунизация: день 21 5000 TU (0.5 мл) из флакона 10000 TU/мл (Fx)	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 49 (последний день отбора) (40-90 мл)
12	Alutard SQ – ALK	2		0,1-1	1. Иммунизация: день 1, 20 SQ-E (0.2 мл) из флакона 100 SQ-E/мл 2. Иммунизация: день 4, 40 SQ-E (0.4 мл) из флакона 100 SQ-E/мл 3. Иммунизация: день 7,	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (2 мл)

					<p>80 SQ-E (0.8 мл) из флакона 100 SQ-E/мл</p> <p>4. Иммунизация: день 10, 200 SQ-E (0.2 мл) из флакона 1.000 SQ-E/мл</p> <p>5. Иммунизация: день 13, 400 SQ-E (0.4 мл) из флакона 1.000 SQ-E/мл</p> <p>6. Иммунизация: день 16, 800 SQ-E (0.8 мл) из флакона 1.000 SQ-E/мл</p> <p>7. Иммунизация: день 19, 2.000 SQ-E (0.2 мл) из флакона 10.000 SQ-E/мл</p> <p>8. Иммунизация: день 22, 4.000 SQ-E (0.4 мл) из флакона 10.000 SQ-E/мл</p> <p>9. Иммунизация: день 25, 8.000 SQ-E (0.8мл) из флакона 10.000 SQ-E/мл</p> <p>10. Иммунизация: день 35, 10.000 SQ-E (0.1 мл) из флакона 100.000 SQ-E/мл</p> <p>11. Иммунизация: день 49, 20.000 SQ-E (0.2 мл) из флакона 100.000 SQ-E/мл</p> <p>12. Иммунизация: день 63, 40.000 SQ-E (0.4мл) из флакона 100.000 SQ-E/мл</p> <p>13. Иммунизация: день 77, 60.000 SQ-E (0.1 мл) из флакона 100.000 SQ-E/мл</p> <p>14. Иммунизация: день 91, 80.000 SQ-E (0.8мл) из флакона 100.000 SQ-E/мл</p> <p>15. Иммунизация: день 105, 100.000 SQ-E (1мл) из флакона 100.000 SQ-</p>	<p>4. день 84 (2 мл)</p> <p>5. день 112 (2 мл)</p> <p>6. день 133 (последний день отбора) (40-90 мл)</p>
--	--	--	--	--	---	--

					E/мл	
13	Purethal – HAL Allergy	2	0,1-0,5		<p>1. Иммунизация: день 1, 1.000 ТЕ (0.05мл) из флакона 20.000 AUM/мл</p> <p>2. Иммунизация: день 7, 2.000 ТЕ (0.1мл) из флакона 20.000 AUM/мл</p> <p>3. Иммунизация: день 14, 4.000 ТЕ (0.2мл) из флакона 20.000 AUM/мл</p> <p>4. Иммунизация: день 21, 6.000 ТЕ (0.3мл) из флакона 20.000 AUM/мл</p> <p>5. Иммунизация: день 28, 8.000 ТЕ (0.4мл) из флакона 20.000 AUM/мл</p> <p>6. Иммунизация: день 35, 10.000 ТЕ (0.5мл) из флакона 20.000 AUM/мл</p>	<p>1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией</p> <p>2. день 28 (2 мл)</p> <p>3. день 56 (2 мл)</p> <p>4. день 63 (последний день отбора) (40-90 мл)</p>
14	Allergovit-Allergopharma	2	0,1-0,8		<p>1. Иммунизация: день 1, 100 ТЕ (0.1 мл) из флакона 1000 ТЕ/мл (A)</p> <p>2. Иммунизация: день 7, 200 ТЕ (0.2 мл) из флакона 1000 ТЕ/мл (A)</p> <p>3. Иммунизация: день 14, 400 ТЕ (0.4 мл) из флакона 1000 ТЕ/мл (A)</p> <p>4. Иммунизация: день 21, 800 ТЕ (0.8 мл) из флакона 1000 ТЕ/мл (A)</p> <p>5. Иммунизация: день 35, 1500 ТЕ (0.15 мл) из флакона 10.000 ТЕ/мл (B)</p> <p>6. Иммунизация: день 49, 3000 ТЕ (0.3 мл) из флакона 10.000 ТЕ/мл (B)</p> <p>7. Иммунизация: день 63, 6000 ТЕ (0.6 мл) из флакона 10.000 ТЕ/мл</p>	<p>1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией</p> <p>2. день 28 (2 мл)</p> <p>3. день 56 (2 мл)</p> <p>4. день 84 (2 мл)</p> <p>5. день 91 (последний день отбора) (40-90 мл)</p>

				(B)	
15	Экстракт аллергена из пыльцы березы – Микроген	2		1. Иммунизация: 0.002 PNU в 0.2 мл день 1 2. Иммунизация: 0.004 PNU в 0.4 мл день 2 3. Иммунизация: 0.008 PNU в 0.8 мл день 3 4. Иммунизация: 0.02 PNU в 0.2 мл день 4 5. Иммунизация: 0.04 PNU в 0.4 мл день 5 6. Иммунизация: 0.08 PNU в 0.8 мл день 6 7. Иммунизация: 0.2 PNU в 0.2 мл день 7 8. Иммунизация: 0.4 PNU в 0.4 мл день 8 9. Иммунизация: 0.8 PNU в 0.8 мл день 9 10. Иммунизация: 2 PNU в 0.2 мл день 10 11. Иммунизация: 4 PNU в 0.4 мл день 11 12. Иммунизация: 8 PNU в 0.8 мл день 12 13. Иммунизация: 20 PNU в 0.2 мл день 13 14. Иммунизация: 30 PNU в 0.4 мл день 14 15. Иммунизация: 40 PNU в 0.8 мл день 15 16. Иммунизация: 50 PNU в 0.5 мл день 16 17. Иммунизация: 60 PNU в 0.6 мл день 17 18. Иммунизация: 70 PNU в 0.7 мл день 18 19. Иммунизация: 80 PNU в 0.8 мл день 19 20. Иммунизация: 90 PNU в 0.9 мл день 20 21. Иммунизация: 100	1. день 1 (до иммунизации сыворотка) (2 мл) – перед 1-й инъекцией 2. день 28 (2 мл) 3. день 56 (последний день отбора) (40-90 мл)

				PNU в 0.1 мл день 21 22. Иммунизация: 200 PNU в 0.2 мл день 22 23. Иммунизация: 300 PNU в 0.3 мл день 23 24. Иммунизация: 400 PNU в 0.4 мл день 24 25. Иммунизация: 500 PNU в 0.5 мл день 25 26. Иммунизация: 600 PNU в 0.6 мл день 26 27. Иммунизация: 700 PNU в 0.7 мл день 27 28. Иммунизация: 800 PNU в 0.8 мл день 28 29. Иммунизация: 900 PNU в 0.9 мл день 29 30. Иммунизация: 1000 PNU в 1.0 мл день 30	
--	--	--	--	---	--

Таблица 2.

Группы добровольцев, включенные в исследование по оценке способности B-PreS, A-PreS и AB-PreS связываться с IgE-антителами.

№	Группа	Описание добровольцев	К-во
1	BPA	Пациенты с аллергией на пыльцу березу	70
2	non-BPA	Пациенты с аллергией, но без аллергии на пыльцу березы	7
3	HC	Здоровые добровольцы (без аллергии)	7
	Всего		84

Были собраны образцы сыворотки от пациентов с аллергией на пыльцу березы (BPA), пациентов с аллергией, но без аллергии на пыльцу березы (non-BPA) или сыворотки от пациентов, не страдающих аллергией – здоровые добровольцы (HC).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный полипептид для лечения и профилактики аллергии на пыльцу березы и яблоко, содержащий пептидные фрагменты аллергенов Bet v1 и Mal d 1, слитые с полипептидом PreS вируса гепатита B, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 2.
2. Рекомбинантный полипептид по п.1, содержащий, по меньшей мере, четыре пептидных фрагмента аллергена дикого типа пыльцы березы Bet v 1, и, по меньшей мере, два пептидных фрагмента аллергена дикого типа яблока Mal d 1.
3. Рекомбинантный полипептид по п.2, где аллерген дикого типа выбирают из группы, состоящей из основных аллергенов пыльцы березы, в частности Bet v 1, где два пептидных фрагмента имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO 5 и другие два пептидных фрагмента имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO 6.
4. Рекомбинантный полипептид по п.2, где аллерген дикого типа выбирают из группы, состоящей из основных аллергенов яблока, в частности Mal d 1, имеющих один пептидный фрагмент с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 3 и другой пептидный фрагмент с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 4.
5. Композиция вакцины для лечения или профилактики аллергии на пыльцу березы и яблоко, содержащая эффективное количество рекомбинантного полипептида по п.1 и фармацевтически приемлемый наполнитель.
6. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что дополнительно содержит, по меньшей мере, один адьювант и / или консервант.

	P1	P2	
Bet v 1	MGVFNYETETTSVIPAARLFKAFILEGDNALFPKVAQAISSVENIEGNGGPGTIKKISPEGFPFKYVKDRVDEVHTNFKNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGG		112
Mal d 1	...YTF.N.F..E..PS.....V..A..I..I....KQA.IL.....T..G..SQYG...H.I.SI.EASY.S.TL...DAL.T..I...Y.T.L..CGS.S		112
Cor a 1.0101V..P.....SYV....K.I.....T..V.....N.T.G..SRY....E.....N..T.S.T....DVL.K..VCH.L....A.G..		112
Cor a 1.0401C..D.A....P....S.V..A..I.....HFT.A..L.....T..B..NE..M.HK.E..I..A..C..I....L.H....Y..M.A.HG..		113
Aln q 1A..P.....F.L....E.V.....T..S.....E.....RV..SF.....AV..A..VC.....A....		112
Ara h 8TF.D.L..TV.P.K.YN.-WKA.SIT..II-DOKV...IV.....LT..L.DGET.F.LHK.ESI.EA.YA....VG.VALPP.A...TF.T.I.EG.N..		110
Api q 1	...QTHVLL..SVS.EKI.QG.VI.V..TVL..A..G.YK...-K.D....L.I.TI.D.G.ITTMTL.I.G..NKEALTFD...D.DILLGFI.S.E.HVVI.P.A...		111
Dau c 1	..AQSHSL.I..SVS.EKI.SGIV..V..IVI..A..G.YK...-WK.D..A..VRI.TI..S.ITSMTV.T.A..NKEALT.DST..D.DILLGFI.S.ETHLVW.P.A...		111
Pro p 1T..S.F..E..PP.....V..A..V..I.....KHS.II..D.....T..G..SQYG...HRI.SI.KE.HS.S.TL...DAL.N....Y.T.I..S.S..		112
Act d 8	..AIT.DM.IP.S.S.EKM....V....III..AL.H..TG.QTL..D..V....LT..S..SVH.S..H.I.GL..KE..T.S..I...AL..VF.S..YH.....		111
Gly n 4TF.D.IN.PVAP.T.Y..LVT.A..VI..-LDSFK...V.....T..L.DGET.F.LHKIESI.EA.LG.S...VG.AALP..A...TFDS.I..G.N..		111

ФИГ. 1.

A-PreS**B-PreS****AB-PreS**

ФИГ. 2.

ATG – Methionine (start) +
CTG – Peptide Birch-No1-Copy-1 +
TTG – Peptide Birch-No1-Copy-2
GTC – Peptide Apple-No1
GGC – PreS protein
ATG – Peptide Apple-No3
CCG – Peptide Birch-No2-Copy-1
CTT – Peptide Birch-No2-Copy-2
CAT – 6x His terminus
TAA – Stop codon

NdeI
CATATG CTTCCCCGAAAGTTGCACCCAGGCATCTTACGGTGAGAAATACTGAAGGCAACGGGGG
 TTCCGGGACCAATCAGAAATTACGTTTCCCGAGGGTTTCCCTTTAAATAACGTAAAGACCGCGGG
 CGAATTTGTTCCAAAAGTGGGCCACAAGCCATCAGTAGTGTGCAAACATTGAGGGGAAACGGGGGC
 CTGGTACCATCAAAAAAAATCTCCCTCCCTGAAGGATTCCCATTCAAATACTGTCAAAGATCGTAGATG
 AACTGAACTCCAAAAATGCCGGCGAAAGCTATCAAGCAAGCAAAATCTGAAAGCAACGGGGCC
 GGGACTATCAAAAATGTTGGTGGTAAAGGTTGGCAATACTGGTAACTGTAACTCGTAACTTGACTC
 GGCGCTGGTCGAGCAAACCTGTAAGGTATGGCACCAATCTGTCGTGCCAAACCCACTGGGCTC
 TTCCAGATCATCAGTAGACCCGGCGTTGGCGCAAACCTCAAATAATCCGGACTGGGACTTTAACCCG
 ATTAAGACCAATTGGCCGGCTGCGAATCAAGTGGCGTTGGTGCCTTGGCCCGGGCTGACCCCGCC
 CATGGAGGCATCTGGCTGGCGCCGAAGCTAAGGTATCTGACTACCGTTCCACCATTCCCCCG
 CGGCCTCAACCAATCGTCAATCTGGCGTCAACCGACCCGATCAGCCCACCCCTGCGCGATAGCCACC
 CCCAAGCGATGCACTGGAACAGCACTGCGTCCATCAGGCTTGCAAGATCCACCGTGCCTGGCTGT
 ATTTTCCAGCCGGTGGTAGTCGTGGTACGGTAACCCGGCCAAACATTGCCCTCCACATTAGCTC
 TATCTGGCGCGTACCGGTGACCCGGTTACCAACCTGAACTGGTACGGTAAACCCGGCCAAACATTG
 CCGGAGGGGTTCCCTTTAAATACTGTCAAAGATCGCGT
 GGACGAAGTCGACCATACCAATTCAAGTATAACTATTGGTATTGAAGGTGGCCGATCGCGATACT
 TCTCGAAAAATTAGTAATGAAATTAG
 CATCATCATCATCACCACCAT**ACTCGAG**
XbaI

Xhol

ФИГ. 3.

M – Methionine (start)

LFPK – Peptide Birch-No1-Copy-1

LFPK – Peptide Birch-No1-Copy-2

LIPK – Peptide Apple-No1

GGWS – PreS protein

GEGS - Peptide Apple-No2

PEGF - Peptide Birch-No2-Copy-1

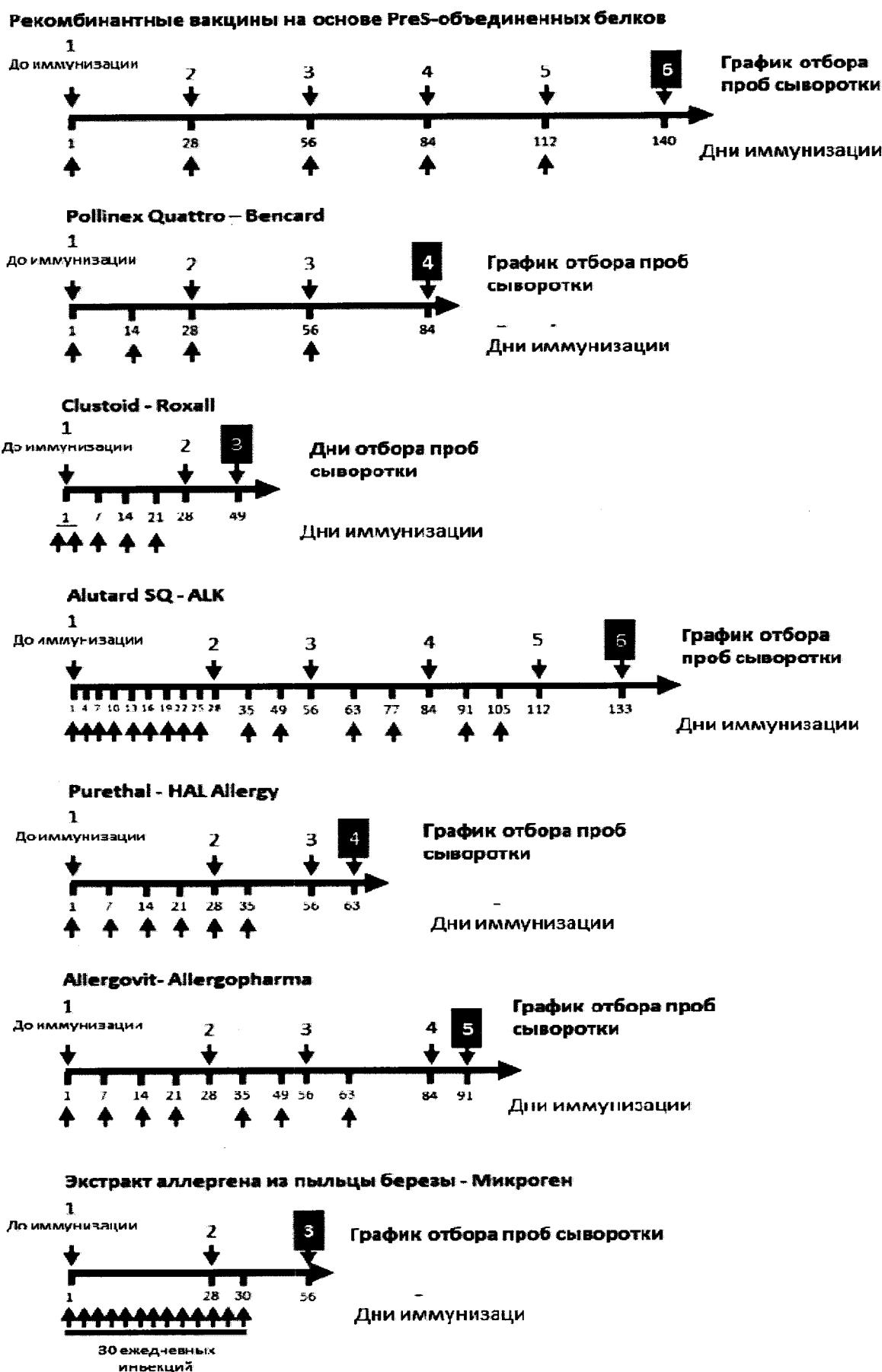
PEGF - Peptide Birch-No2-Copy-2

HHHHHH - 6x His terminus

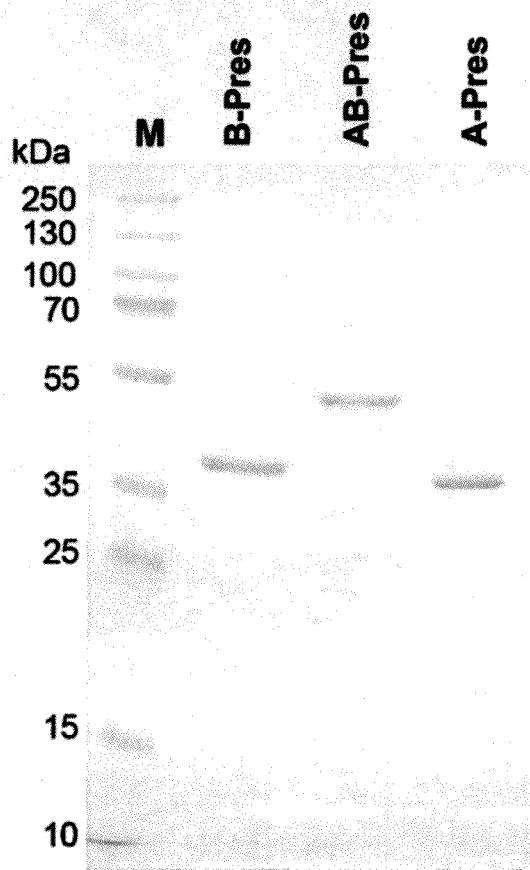
* - Stop codon

HMLFPKVAPQAISSVENIEGNGPGTIKKISFPEGFPFKYVKDRVDELFPKVAPQAIS
SVENIEGNGPGTIKKISFPEGFPFKYVKDRVDELIPKIAAPQAIKOQAEILEGNGGPGTIKKIT
EGEQSQYGYVKHRIDSGGWSSKPRKGMTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDW
 DFNPIKDHWPAANQVGVGAFGPGLTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGR
 QPTPISPLLRDSHPQAMQWNSTAFHQALQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPAPNIASHISSI
 SARTGDPVTN**GEGSQYGYVKHRIDSIDEASYSYSYTLIEDALTDTIEKISYETKPEGFPF**
 KYVKDRVDEVDTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK**PEGFPFKYVKDRVDEVDTNF**
KYKVNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKHHHHHH*LE

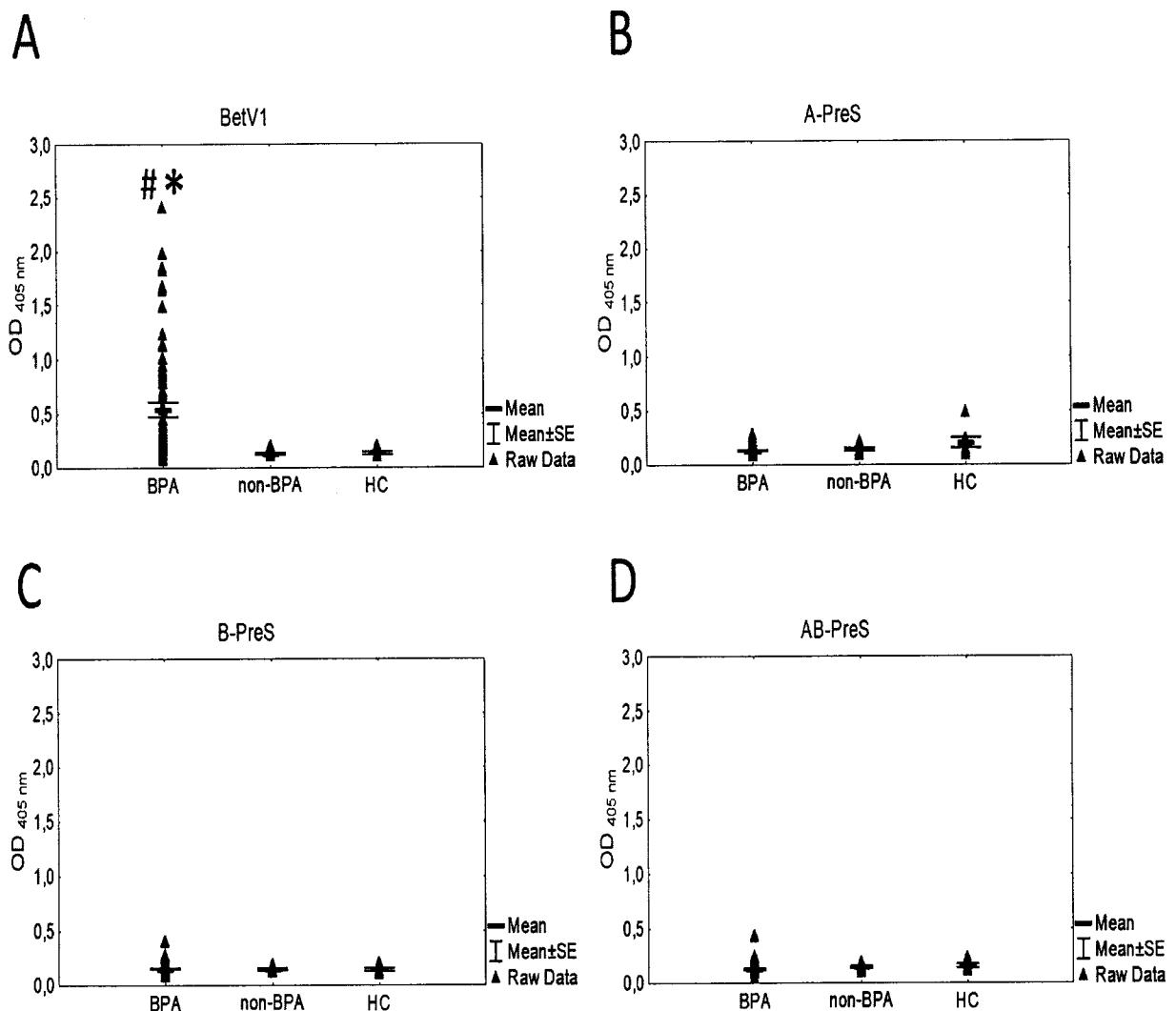
ФИГ. 4.



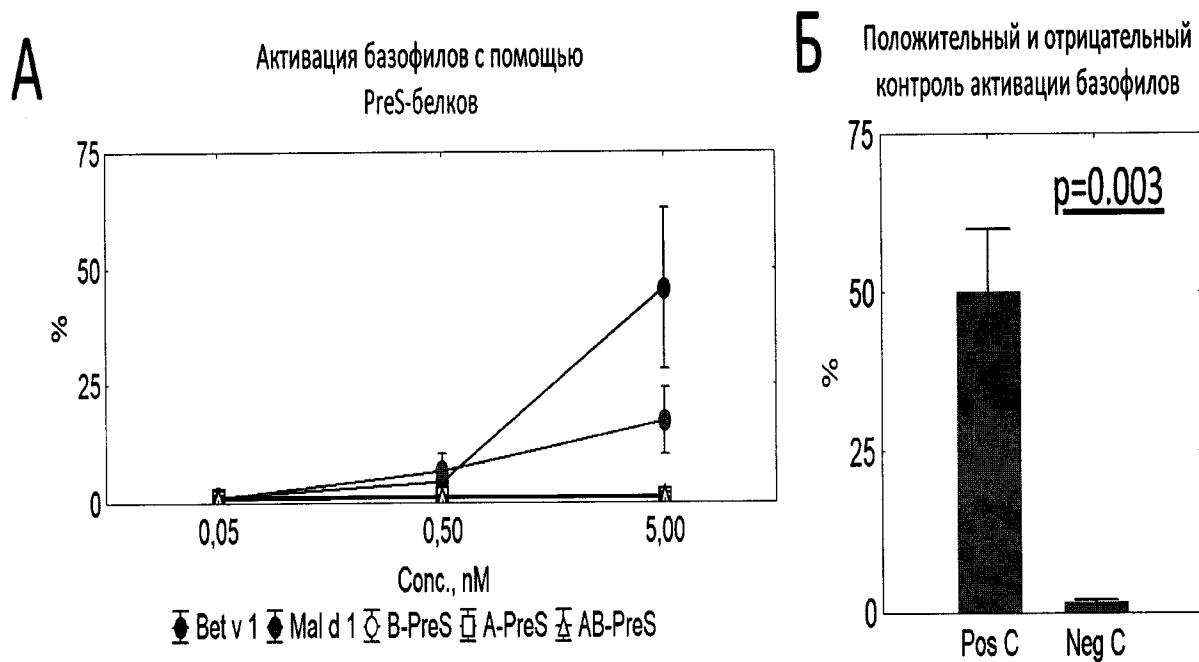
ФИГ. 5.



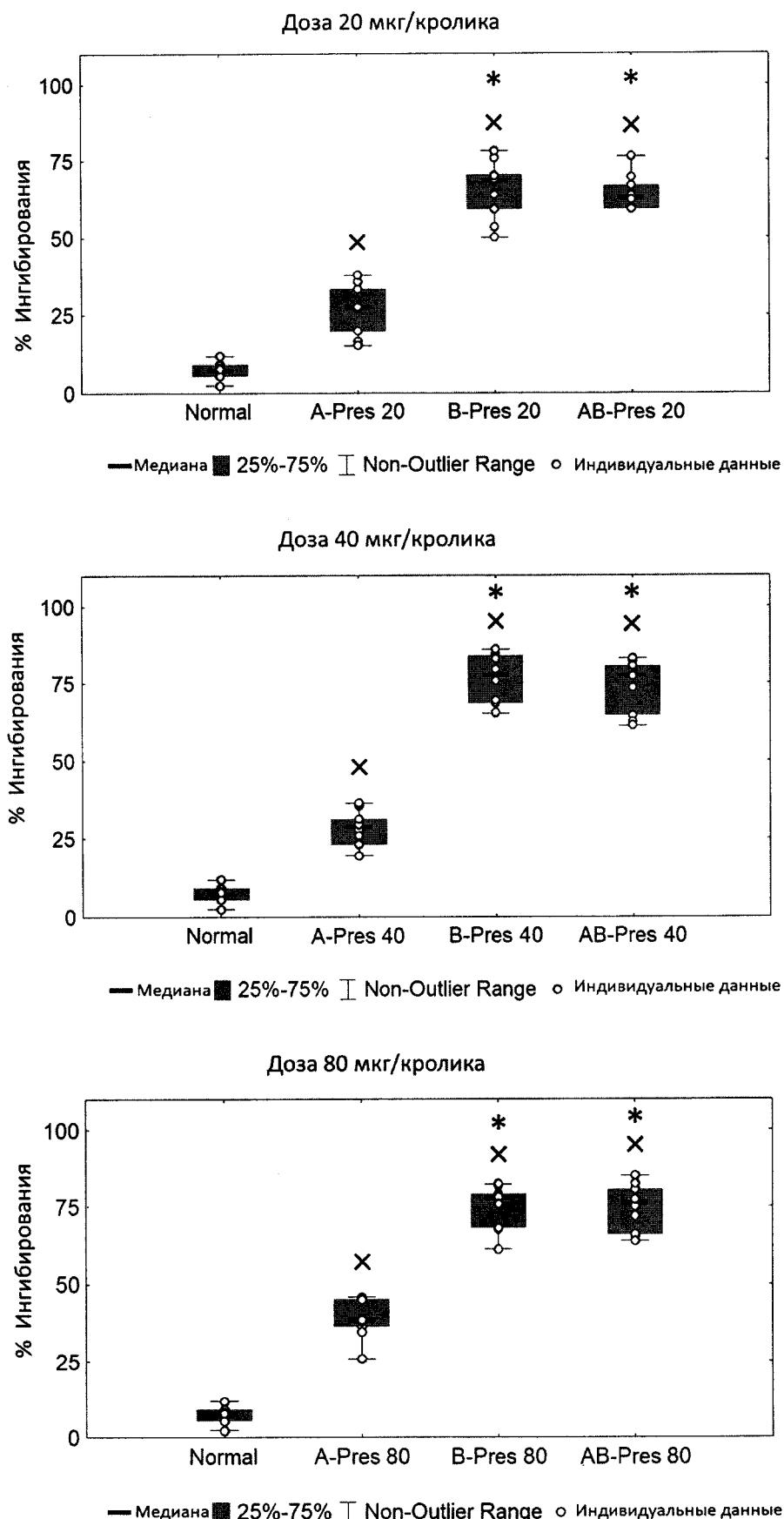
ФИГ. 6.



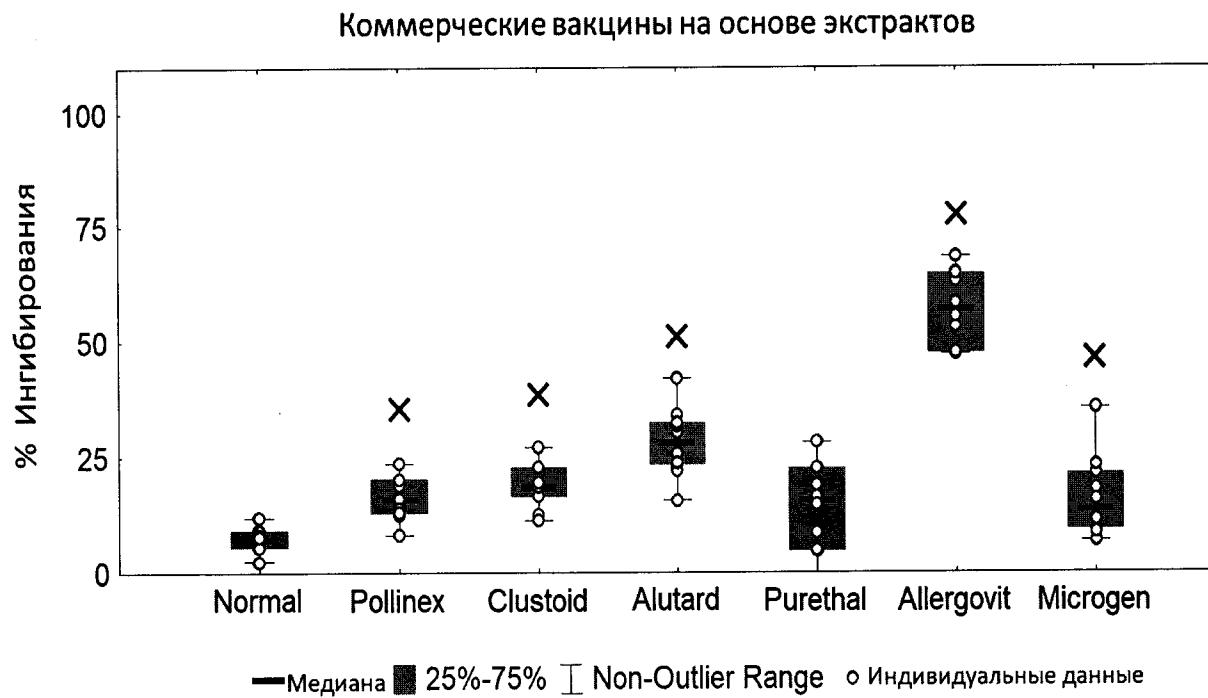
ФИГ. 7.



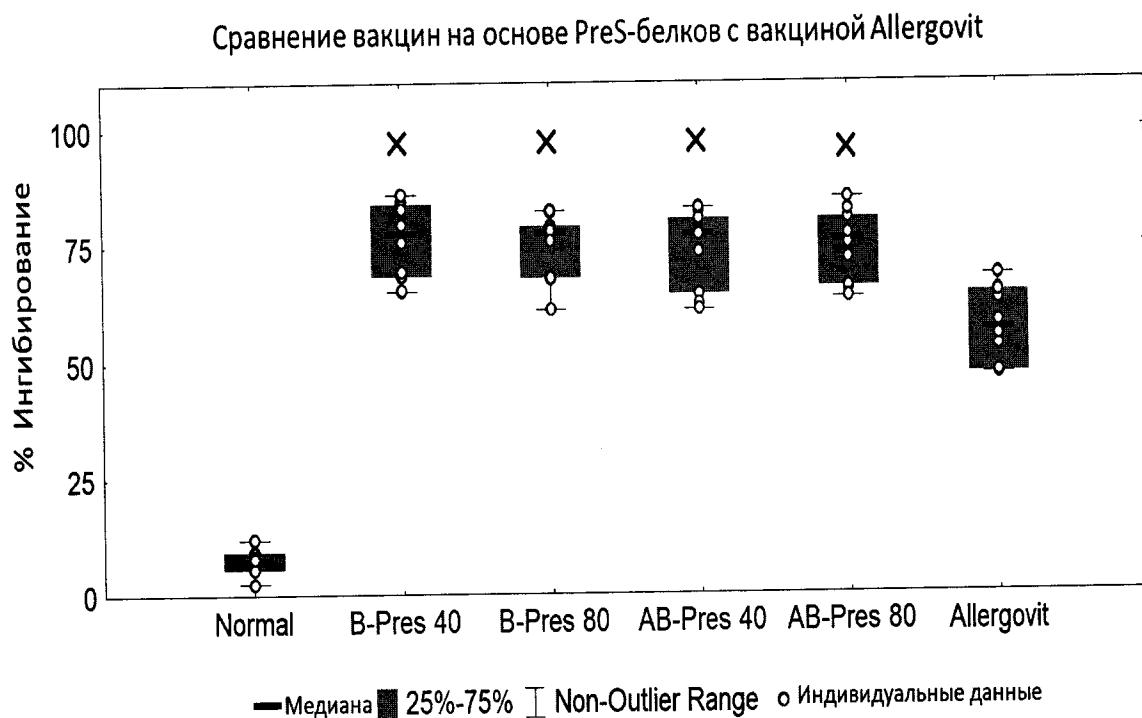
ФИГ. 8.



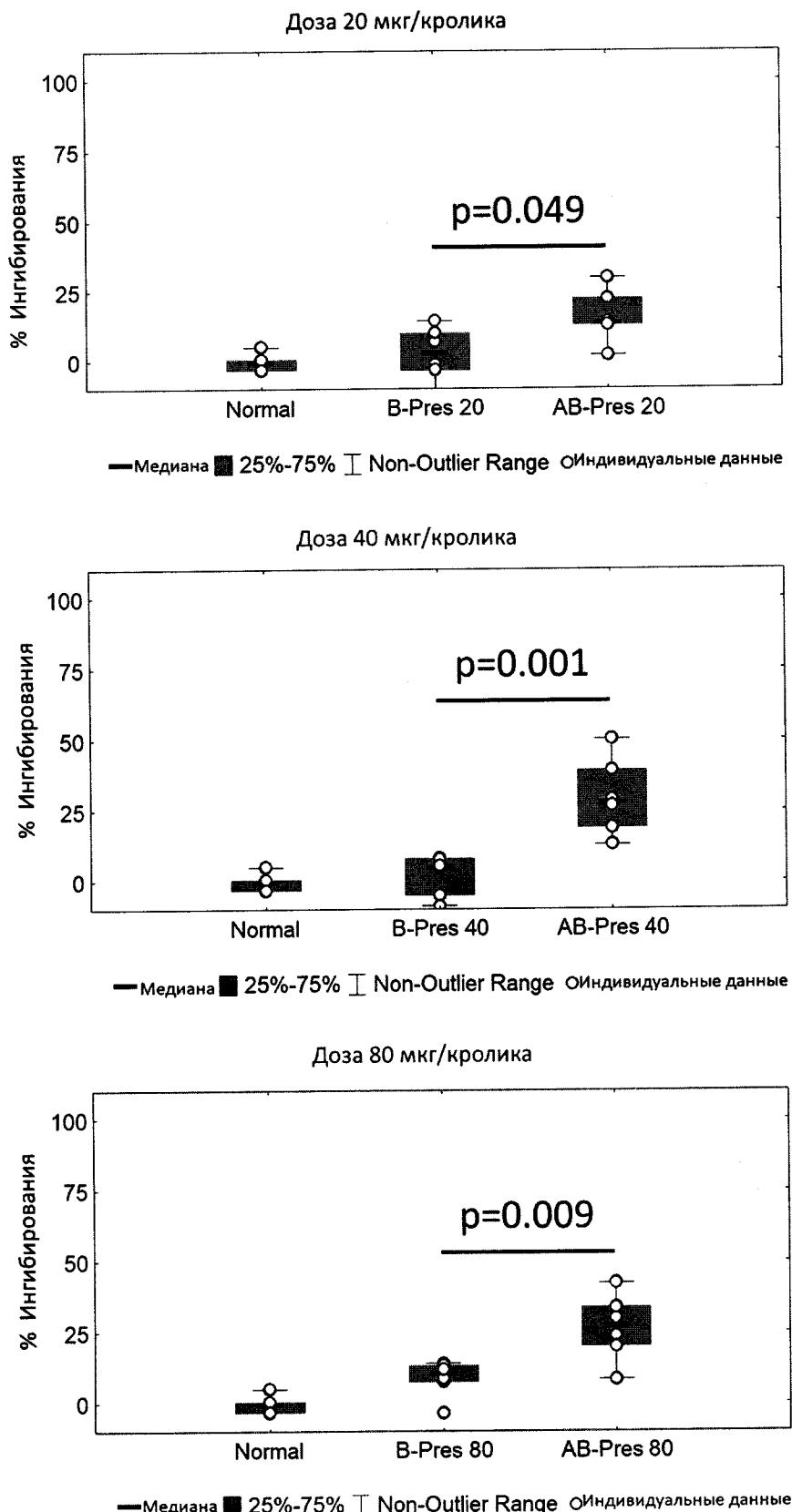
ФИГ. 9.



ФИГ. 10.



ФИГ. 11.



ФИГ. 12.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2021/000437

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(see supplemental sheet)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, C07K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

E-Library, Espacenet, PatSearch, PATENTSCOPE, RUPTO, Google, Google Scholar, PubMed, USPTO, ScienceDirect

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RU 2013157115 A (BIOMEI AG), 20.07.2015	1-6
A	RU 2624030 C2 (LOFARMA S.P.A), 31.07.2012	1-6
A	RU 2193413 C2 (NOVARTIS AG), 01.03.1996	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

09 December 2021 (09.12.2021)

20 January 2022 (20.01.2022)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

RU

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2021/000437

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

C07K 14/02 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2021/000437

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ
(см. дополнительный лист)

Согласно Международной патентной классификации МПК

B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА

Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)

A61K, C07K, A61P

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

E-Library, Espacenet, PatSearch, PATENTSCOPE, RUPTO, Google, Google Scholar, PubMed, USPTO, ScienceDirect

C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2013157115 A (БИОМЕЙ АГ), 20.07.2015	1-6
A	RU 2624030 C2 (ЛОФАРМА С.П.А), 31.07.2012	1-6
A	RU 2193413 C2 (NOVARTIS AG), 01.03.1996	1-6



последующие документы указаны в продолжении графы С.



данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:			
“A”	документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“T”	более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение
“D”	документ, цитируемый заявителем в международной заявке	“X”	документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности
“E”	более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“Y”	документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста
“L”	документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“&”	документ, являющийся патентом-аналогом
“O”	документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.		
“P”	документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты исправляемого приоритета		

Дата действительного завершения международного поиска
09 декабря 2021 (09.12.2021)Дата отправки настоящего отчета о международном поиске
20 января 2022 (20.01.2022)Наименование и адрес ISA/RU:
Федеральный институт промышленной собственности,
Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59,
ГСП-3, Россия, 125993
Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37Уполномоченное лицо:
Кравцова Г.В.
Телефон № (8-499) 240-25-91

**ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ
ПОИСКЕ**

Номер международной заявки

PCT/RU 2021/000437

Графа I Последовательность(и) нуклеотидов и/или аминокислот (Продолжение пункта 1.с первого листа)

1. Относительно любой последовательности нуклеотидов и/или аминокислот, раскрытой в международной заявке, международный поиск подготовлен на основе перечня последовательностей, поданного или представленного:
 - a. в виде неотъемлемой части международной заявки в том виде, как она подана:
 - в форме, соответствующей Приложению C/ST.25, в текстовом формате.
 - на бумаге или в графическом формате.
 - b. вместе с международной заявкой в соответствии с Правилом 13ter.1 только для целей проведения международного поиска в форме, соответствующей Приложению C/ST.25, в текстовом формате.
 - c. впоследствии после даты международной подачи только для целей проведения международного поиска:
 - в форме, соответствующей Приложению C/ST.25, в текстовом формате (Правило 13ter.1(a)).
 - на бумаге или в графическом формате (Правило 13ter.1(b) и Административная инструкция, Раздел 713).
2. Дополнительно, в случае, если более чем одна версия или копия перечня последовательностей была подана первоначально или была представлена впоследствии, требуется, чтобы информация в последующих или дополнительных копиях была идентична той, которая была в первоначально поданной заявке, или не выходила за рамки раскрытия первоначально поданной заявки.
3. Дополнительные комментарии:

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ
Классификация предмета изобретения

Номер международной заявки

PCT/RU 2021/000437

A61K 39/35(2006.01)
A61K 39/36 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
C07K 14/02 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)