



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00615**

(22) Data de depozit: **30/09/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2021 BOPI nr. **3/2021**

(71) Solicitant:
• **SPITALUL CLINIC JUDEȚEAN DE
URGENTĂ " PIUS BRÂNZEU"**,
BD. LIVIU REBREANU, NR.156,
TIMIȘOARA, TM, RO

(72) Inventatori:
• **PANAITESCU CARMEN**,
BD. TAKE IONESCU, NR.41, AP.1,
TIMIȘOARA, TM, RO;

• **KUAN-WEI CHEN, LANDSTRASSER
HAUPTSTRASSE 121/9, VIENNA, 1030, AT;**
• **PĂUNESCU VIRGIL**,
STR.AUGUST TREBONIU LAURIAN, NR.7,
AP.2, TIMIȘOARA, TM, RO;
• **BUZAN MARIA ROXANA**,
ALEEA TREI APE, NR.1, SC.4, AP.3,
TIMIȘOARA, TM, RO

(74) Mandatar:
**CABINET DE PROPRIETATE INDUSTRIALĂ
TUDOR ICLĂNZAN, PIAȚA VICTORIEI NR.5,
SC.D, AP.2, TIMIȘOARA, TM**

(54) **KIT ȘI METODĂ DE UTILIZARE PENTRU DIAGNOSTICUL ALERGIEI LA AMBROZIE**

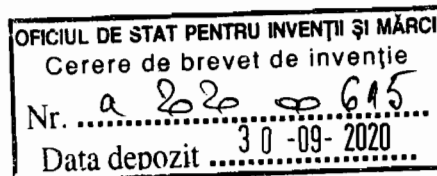
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un kit și la o metodă de utilizare a acestuia pentru diagnosticul alergiei la polenul de ambrozie. Kit-ul, conform invenției, cuprinde 11 alergene recombinante și anume Amb a 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 și Amb a 12, exprimate și purificate în sisteme gazdă de tip E coli și celule de insecte Sf9, implementate în tehnica ELISA. Metoda, conform invenției, constă în aceea că alergenele recombinante de polenul de ambrozie sunt atașate pe suprafața godeurilor unei plăci ELISA în care serul pacientului presupus alergic este testat comparativ cu o persoană non-alergică,

folosind o soluție tampon fără ser pentru evaluarea reactivității IgE prin apariția culorii măsurate cu un spectrofotometru, afișată ca densitate optică, (OD), astfel că, prin interpretarea rezultatelor, se identifică profilul alergic molecular al pacientului și posibila reactivitate încrucișată în scopul diagnosticului alergic.

Revendicări: 11
Figuri: 5





73

KIT ȘI METODĂ DE UTILIZARE PENTRU DIAGNOSTICUL ALERGIEI LA AMBROZIA

Prezenta invenție se încadrează în domeniul menținerii sănătății umane prin diagnosticul alergologic, în special diagnosticul alergiei la polenul de ambrozia. Mai specific, invenția se referă la proiectarea unui kit de diagnostic alergologic și modul lui de utilizare folosind alergene recombinat din polenul de ambrozia.

Alergia IgE-mediată reprezintă tipul de hipersensibilitate cu cea mai mare răspândire la nivel mondial. Până la 30% din populație suferă de simptome de alergie, care pot fi severe și invalidante (de exemplu, astm), sau chiar fatale (de exemplu, șocul anafilactic) (Meltzer *et al.*, AAAI 2011; Calderon *et al.*, CTA 2012). Majoritatea alergiilor încep ca o boală ușoară (de exemplu, rinită), dar dacă nu sunt diagnosticate și tratate corespunzător, evoluează spre astm sever. În Europa, în special în zonele de est, inclusiv în România, ambrozia (genul *Ambrosia*, familia *Asteraceae*) este una dintre cele mai importante surse de alergene, cu un impact puternic asupra sănătății umane (Bullock *et al.*, 2010), fiind specia cu cea mai mare relevanță clinică, cunoscută pentru potențialul ridicat de a provoca reacții de hipersensibilitate de tip I la sfârșitul verii și toamna. În America de Nord, alergia la ambrozia este considerată de mult timp drept o problemă majoră de sănătate, cu o rată de sensibilizare de 10% - 26% în populația generală (Gergen *et al.*, JACI 1987; Arbes *et al.*, JACI 2005). Costurile diagnosticului și tratamentului alergiei la polenul de ambrozia în SUA au fost estimate la aproximativ 21 de miliarde de dolari pe an (Ziska *et al.*, PNAS 2011). *A. artemisiifolia* a fost importată în Europa începând cu 1900 și s-a răspândit rapid în multe zone din Europa Centrală și de Sud-Est. Frecvența de sensibilizare variază enorm între țările din Europa. Un studiu (Burbach *et al.*, Allergy 2009) a relevat o frecvență de sensibilizare cuprinsă între 2,4% în partea de vest a Europei și până la 50% în partea de est a Europei. Mai mult, s-a observat o prevalență (număr de cazuri într-o populație) în creștere a sensibilizării la ambrozia (Tosi A *et al.*, Swiss Med Wkly 2011).



Până în prezent au fost introduse 12 alergene din polenul de ambrozia în baza de date a WHO/IUIS (). În unele studii anterioare s-a menționat că, pe lângă alergenul major Amb a 1, și alte alergene din polenul de ambrozia sunt importante și ar trebui incluse în testul de diagnostic al alergiei mediate de IgE (Wopfner N, Gruber P, Wallner M *et al.*, Allergy 2008; Léonard R, Wopfner N, Pabst M *et al.*, J Biol Chem. 2010). Totuși, în prezent, pentru testul cutanat prick (SPT), care este metoda de diagnostic a alergiei folosită în mod uzual, se folosește doar extractul de ambrozia. Una dintre problemele principale în utilizarea extractelor de alergene este compoziția variată a acestora, ceea ce face imposibil un diagnostic precis. Singura informație pe care SPT cu extract de alergene o oferă este că pacienții prezintă sau nu reactivitate IgE la extract. Dar această reacție pozitivă la SPT se poate datora unei reacții încrucișate cu alte alergene, cum ar fi pelinarița, rezultând astfel un test fals pozitiv. Un rezultat detaliat al testului alergologic este important pentru imunoterapia alergenică (AIT), deoarece acesta determină dacă pacienții sunt cu adevărat sensibilizați la ambrozia și nu prezintă răspuns pozitiv datorită unei reacții încrucișate, deci, dacă sunt potriviți sau nu pentru AIT la ambrozia. În plus, există posibilitatea de a spori succesul AIT prin selecția mai bună a pacienților, în funcție de profilul lor de sensibilizare (Chen KW *et al.*, J Allergy Clin Immunol 2019). Testele „*in vitro*” sunt alternative la SPT și există câteva sisteme utilizate în clinici, cum ar fi cele cunoscute sub denumirea de ImmunoCAP (Thermo Scientific), ALEX (Macro Array Diagnostics), FABER (CAAM) și ISAC (Thermo Scientific). Cu aceste sisteme este posibilă testarea la componentele alergene. De exemplu, în sistemul ISAC se utilizează opt alergene diferite din acarieni. În ceea ce privește alergia la ambrozia, majoritatea sistemelor folosesc doar alergenul major al Amb a 1, doar sistemul ALEX utilizează în plus Amb a 4. Astfel nu se pot oferi informații cu privire la alte alergene relevante din polenul de ambrozia. În concluzie, în prezent nu este posibil un diagnostic precis pentru alergia la ambrozia.



Este cunoscută invenția US2018011108A1 care prezintă o metodă îmbunătățită pentru diagnosticarea alergiei unui subiect folosind proteine constituite din secvențe repetate de ankirină („DARPs”) și kituri pentru utilizare în astfel de metode. De asemenea, sunt furnizate DARPs-ine noi și metodele de utilizare a acestora.

Este cunoscută invenția US5698204A în care se arată că antigenul E sau Amb a I al polenului de ambrozia reprezintă o familie sau familii de proteine. În această invenție sunt prezentate ADNc-uri care codifică Amb a I, alergenul major al ambroziei și Amb a II, peptide derivate din Amb a I sau Amb a II, anticorpi împotriva peptidelor și metodele de tratare a indivizilor pentru sensibilitatea la ambrozia.

Este cunoscută invenția US5714338A în care sunt prezentate metode pentru diagnosticul bolii alergice în care IgE specific pentru un alergen de interes este detectat pe un eșantion de ser al pacientului folosind proba de ser a pacientului pentru a sensibiliza, în prezența sau absența unui antagonist IgE, un mastocit sau bazofil, proiectat genetic să exprime pe suprafață subunități FcεRI. Celula aceasta este capabilă să elibereze un mediator farmacologic. Eliberarea este indusă de către alergen și serul pacientului. Provoacă celulele gazdă sensibilizate cu alergenul de interes se determină prezența sau absența IgE specifice la alergenul de interes în proba serică a pacientului comparând eliberarea mediatorului farmacologic produs de celulele gazdă sensibilizate cu serul pacientului în prezența antagonistului IgE cu eliberarea mediatorului farmacologic produs de celulele gazdă sensibilizate cu serul pacientului în absența antagonistului IgE.

Dezavantajul preponderent al kit-urilor și metodelor cunoscute până în acest moment constă în precizia redusă a acestora.

Problema tehnică a invenției este aceea de realizare a unui instrument sub forma unui kit și a stabili modul lui de utilizare pentru obținerea unui diagnostic precis al alergiei la ambrozia folosind alergene recombinat.

Kit-ul pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform invenției cuprinde alergene recombinat exprimate și purificate în diferite sisteme gazdă precum *E. coli* și sisteme gazdă *Sf9*, provenite din insecte. Un număr de 11 alergene recombinat de ambrozia și anume Amb a 1.01; Amb a 3; Amb a 4; Amb a 5; Amb a 6; Amb a 8; Amb a 9; Amb a 10; Amb a 11 și Amb a 12, sunt atașate pe suprafața godeurilor unei plăci ELISA în care serul pacientului presupus alergic este testat comparativ cu o persoană non-alergică și o soluție tampon fără ser. Evaluarea reactivității IgE se face prin apariția culorii măsurate cu ajutorul unui spectrofotometru care este apoi afișată ca densitate optică (OD).

Metoda pentru utilizarea kit-ului pentru diagnosticul la ambrozia conform invenției constă în implementarea unor alergene în tehnica ELISA. Se utilizează 11 alergene recombinat din polenul de ambrozia, parcurgându-se următoarele etape:

- Expresia alergenelor în *Escherichia coli* (*E. coli*) sau în celule de insecte (*Sf9*);
- Extragerea alergenelor recombinat și purificarea lor;
- Eliminarea oricărui alt produs chimic din soluția în care se află alergenele recombinat prin dializă împotriva soluției tampon finale;
- Depozitarea alergenelor recombinat la temperaturi între - 20° C și - 80° C până la utilizare;
- Integrarea celor 11 alergene recombinat în ELISA (testul imunosorbant legat de enzimă) prin imobilizare pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri;
- Incubarea plăcii de microtitrare cu serul pacienților;



- Măsurarea cu spectrofotometrul a culorii obținute în urma reacției dintre enzimă și soluția substrat, atunci când soluția substrat este adăugată (HRP – verde, AP – galben).
- Efectuarea de probe de control negativ (soluții tampon și/sau ser negativ de la pacienți non-alergici) pentru a diferenția rezultatele pozitive de cele negative;
- Interpretare rezultatelor pentru identificarea profilului detaliat de reactivitate IgE al persoanelor testate la alergenele din polenul de ambrozia.

Kit-ul și metoda de utilizare pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform invenției prezintă următoarele avantaje :

- Prezintă precizie ridicată prin oferirea de informații diagnostice detaliate esențiale pentru identificarea sensibilizării adevărate necesară pentru tratamentul pacienților.
- Kit-ul diagnostic este capabil să identifice la ce alergen este sensibilizat pacientul alergic și să evidențieze reactivitatea încrucișată și profilurile moleculare.
- Pot fi produse alergene recombinat pure, a căror calitate și proprietăți sunt bine definite, în condiții de bună practică de fabricare (GMP).
- Fiecare alergen recombinat poate fi produs în cantități și cu concentrații prestabilite într-un mod reproductibil spre deosebire de extractele de alergen utilizate pentru diagnosticare.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a Kit-ului și metodei sale de utilizare în legătură cu figurile, care reprezintă:

- Fig.1 – Gel SDS-PAGE cu colorație Coomassie ce conține Amb a 12 exprimat în *E. coli* (e) și Amb a 12 exprimat în celule de insecte (i), separate

în condiții non-reducătoare (benzi NR) și reducătoare (benzi R), precum și un marker molecular (banda din stânga).

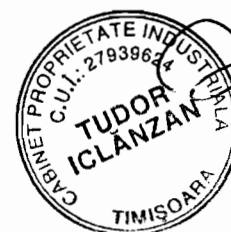
- Fig.2 – Dicroism circular (CD) în spectrul ultraviolet îndepărtat al iAmb a 12 și eAmb a 12. Rezultatele analizei CD ale expresiei proteice sunt exprimate ca medie a elipticităților reziduale (axa y) la anumite lungimi de undă (axa x).
- Fig.3 – Gel SDS-PAGE cu colorație Coomassie ce conține toate alergenele recombinare exprimate și purificate.
- Fig.4 – Placă ELISA acoperită cu alergene recombinare, în coloanele 1-10 cu Amb a 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 și Amb a 12. Pe care s-a adăugat serul de la 2 pacienți alergici la ambrozia și pentru comparație serul de la o persoană non-alergică (NC) și soluție tampon fără ser (BC)
- Fig.5 – Graficul reactivității IgE, reacția de culoare este măsurată cu ajutorul fotometrului și afișată ca densitate optică (OD).

Ambrosia artemisiifolia, cunoscută și sub denumirea de ambrosia scurtă sau comună, în limbaj popular floarea pusteii sau iarba pârloagelor, poate fi întâlnită în multe părți ale lumii, iar alergiile la ambrosia reprezintă o problemă gravă de sănătate. Testul cutanat prick sau testele serice sunt utilizate pentru a diagnostica alergiile la ambrosia, dar aceste teste se bazează în principal pe extracte alergice sau exclusiv pe alergenul major Amb a 1. Deoarece sunt cunoscute 12 alergene din polenul de ambrosia, niciunul dintre testele alergologice utilizate în prezent nu este foarte precis. Prezenta invenție, un kit de diagnosticare a alergiilor la ambrosia, va include unsprezece alergene recombinare, ceea ce permite un diagnostic mai precis, absolut necesar pentru identificarea adevăratei surse alergice și pentru tratamentul pacienților. Alergenele incluse sunt exprimate și purificate în diferite sisteme gazdă, precum *E. coli* sau celulele de insecte Sf9. Această metodă permite

producția în condiții GMP, iar fiecare alergen poate fi produs în cantități și concentrații definite.

Kit-ul și metoda de utilizare pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform invenției este compus din unsprezece alergene recombinante de ambrozia (Amb a 1.01; Amb a 3; Amb a 4; Amb a 5; Amb a 6; Amb a 8; Amb a 9; Amb a 10; Amb a 11 și Amb a 12). Aceste unsprezece alergene de ambrozia trebuie întâi să fie exprimate în *Escherichia coli* (*E. coli*) sau în celule de insecte. Înainte de expresia proteică, secvența de ADN ce codifică alergenul trebuie sintetizată ca proteină marcată N- sau C-terminal cu o secvență de șase histidine (His-Tag), inclusiv o secvență TEV opțională pentru separarea markerului, iar apoi clonat într-un vector de expresie. Vectorii pET17b sau pET27b sunt adecvați pentru expresia în *E. coli*, iar pentru expresia pe celulele de insecte se poate folosi vectorul pTM1. Expresia în *E. coli* poate fi efectuată conform descrierii (Chen KW *et al.*, 2008 Mol Immunol) folosind tulpina *E. coli* BL21. Pentru expresia în celulele de insecte se utilizează celule Sf9, după cum este descris în ghidul utilizatorului “Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System” de la Thermo Scientific. După expresie, alergenele recombinante de ambrozia trebuie extrase sau izolate pentru purificare. Purificarea va fi efectuată prin cromatografie de afinitate cu Ni²⁺. După purificare, orice alt compus chimic din soluția de alergene recombinante va fi eliminat prin dializă împotriva soluției tampon finale. Soluția tampon finală poate fi orice tampon, cum ar fi soluții saline tamponate cu fosfat (PBS) sau apă purificată, atunci când alergenele recombinante sunt solubile și stabile. Pot fi adăugați aditivi, cum ar fi inhibitori de proteaze, pentru a crește stabilitatea alergenelor recombinante. După expresie și purificare alergenele recombinante pot fi depozitate între -20°C și -80°C până la utilizare.

Aceste alergene recombinante pot fi acum implementate în invenție. Invenția va fi bazată pe teste immunoblot cum ar fi testul imunosorbant legat de enzimă



(ELISA), dot blot (tehnică de biologie moleculară în care proteina de aplică direct pe membrana de nitroceluloză, într-un singur punct) sau orice alt sistem utilizat în diagnosticul alergologic. Folosind principiul ELISA, cele unsprezece alergene recombinante din ambrozia vor fi immobilizate pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri. După imobilizarea alergenelor, placa va fi incubată cu ser de la pacienți alergici. Imunoglobulinele E (IgE) specifice alergenelor din polenul de ambrozia se vor fixa de alergen, iar IgE fixate vor fi detectate cu un anticorp anti-IgE uman marcat enzimatic. Enzimele utilizate aici pot fi peroxidaza din hrean (HRP) sau fosfataza alcalină (AP). Dacă este necesar, poate fi folosit un anticorp anti-IgE uman nemarcat ce poate fi ulterior detectat cu un anticorp secundar marcat enzimatic. Atunci când soluția substrat este adăugată, între enzimă și soluția substrat va avea loc o reacție de culoare (HRP – verde, AP – galben). Această reacție de culoare poate fi măsurată cu spectrofotometrul. Pentru a diferenția rezultatele pozitive de cele negative sunt necesar și probe control negative. Pot fi folosite ca probe control negative soluții tampon (incubarea tamponului în locul serului uman) și/sau ser negativ (ser de la pacienți non-atopici). Rezultatele vor arăta profilul detaliat de reactivitate IgE al persoanelor testate la alergenele din polenul de ambrozia.

În Tabelul 1 sunt prezentate alergenele din polenul de ambrozia incluse în invenție, codul de identificare în bazele de date și sistemul de expresie în care sunt obținute:

Tabel 1

Numele alergenului	Nr. NCBI	Sistem de expresie
Amb a 1.01	AAA32665.1	Celule de insecte <i>Sf 9</i>
Amb a 1.02	AAA32666.1	Celule de insecte <i>Sf 9</i>
Amb a 3	P00304.2	Celule de insecte <i>Sf 9</i> , <i>E.coli</i>
Amb a 4	CBK52317.1	Celule de insecte <i>Sf 9</i>
Amb a 5	P02878.1	<i>E. coli</i>

65

Amb a 6	AAB51146.1	Celule de insecte <i>Sf 9</i>
Amb a 8	AAX77687.1	<i>E. coli</i>
Amb a 9	AAX77684	<i>E. coli</i>
Amb a 10	AAX77686	<i>E. coli</i>
Amb a 11	AHA56102.1	Celule de insecte <i>Sf 9</i> , <i>E. coli</i>
Amb a 12	ANZ22900.1	Celule de insecte <i>Sf 9</i> , <i>E. coli</i>

În continuare este prezentată secvența ADN a structurii Amb a 12 pentru expresia în *E. coli* și în celule de insecte *Sf9*

NdeI – CATATG

BamHI – GGATCC

XhoI – CTCGAG

SmaI – CCCGGG

Tag His

Stop codon – TAG

- Structură Amb a 12 pentru expresia în *E. coli*

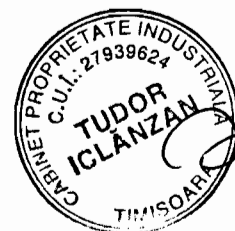
CATATGGCAACCATCAAGGCAGTGAAAGCTCGTCAAATCTTCGACAGC
 AGAGGCAACCCTACCGTTGAGGTGGATATTACTCTTTCTGATGGCACGT
 TGGCCCGGGCTGCTGTCCCCAGTGGTGCATCCACCGGTATTTACGAGGC
 TCTTGAATTGAGAGATGGAGGGTCAGACTACCTTGGAAAAGGTGTCTC
 TAAGGCTGTTGCAAACGTCAACACGATCATTGGCCCTGCTCTTGTAGGC
 AAGGACCCAACCTGATCAGACCGGTATCGACAATTTTCATGGTTCAACAA
 CTTGACGGAACCCAAAATGAATGGGGTTGGTGCAAGCAAAAAGCTTGGT
 GCCAATGCCATCTTGGCAGTTTCTCTTGCAGTTTGCAAGGCTGGTGCTA
 GCGTTCTCAAAACTCCCCTTTACAAGCACATTGCCAACTTGGCTGGTAA
 CAAGAACTTAGTTTTGCCAGTACCTGCATTCAACGTCATCAATGGTGGA
 TCACATGCAGGAAACAAGCTTGCCATGCAGGAATTTATGATTCTCCCTA



TCGGTGCCTCCAGCTTTAAGGAAGCCATGAAGATGGGTGTTGAAGTAT
 ATCACAACCTGAAGTCTGTGATCAAGAAGAAATACGGTCAGGATGCAA
 CAAATGTTGGTGAATGAAGGTGGCTTTGCTCCCAATATTCAGGAAAACA
 AGGAGGGTCTTGAGTTGCTTAAGACGGCTATTGCTAAAGCTGGATACA
 CAGACAAGGTTGTCATTGGAATGGATGTTGCCGCATCTGAATTCTATGG
 CGAGAAGGACAAGACCTATGATCTGAACTTCAAGGAAGAGAACAACG
 ATGGCAAAGAAAAGATTTTCAGGAGAACAATAAAAGATCTTTACAAGT
 CGTTTGTGAGTGAGTACCCCATTTGTGTCCATTGAGGACCCATTTGACCA
 AGATGACTGGGAGCACTATGCCAAGATGACCGCTGAATGTGGCGAACA
 AGTTCAAATTGTAGGAGACGATCTTTTGGTCACCAACCCACGAGAGTC
 AAGAAGGCAATTGATGAGAAGACTTGCAATGCTCTTCTTCTAAAGGTC
 AACCAAATTGGGTCTGTGACCGAGAGTATCGAAGCTGTGAGGATGTCC
 AAACATGCTGGTTGGGGTGTGATGGCCAGTCACCGCAGTGGAGAAACA
 GAGGACACCTTCATTGCTGATCTTTCTGTGGGTTTGGCAACGGGTCAA
 TCAAAACTGGAGCTCCATGCAGGTCAGAGCGTCTTGCAAAGTACAACC
 AGCTGTTGAGAATCGAAGAAGAGCTTGGATCAGAAGCGGTTTATGCTG
 GAGCCAACTCCGCAAGCCAGTGGAACCCTACCATCACCATCACCATC
ACTAGCTCGAG

- Structură Amb a 12 pentru expresia în celule de insecte *Sf9*

GGATCCCGCAACCATCAAGGCAGTGAAAGCTCGTCAAATCTTCGACAG
CAGAGGCAACCCTACCGTTGAGGTGGATATTACTCTTTCTGATGGCACG
TTGGCACGGGCTGCTGTCCCCAGTGGTGCATCCACCGGTATTTACGAGG
CTCTTGAATTGAGAGATGGAGGGTCAGACTACCTTGGAAGGTTGTCT
CTAAGGCTGTTGCAAACGTCAACACGATCATTGGCCCTGCTCTTGTAGG
CAAGGACCCAACTGATCAGACCGGTATCGACAATTCATGGTTCAACA
ACTTGACGGAACCCAAAATGAATGGGGTTGGTGCAAGCAAAGCTTGG



TGCCAATGCCATCTTGGCAGTTTCTCTTGCAGTTTGCAAGGCTGGTGCT
AGCGTTCTCAAACTCCCCTTTACAAGCACATTGCCAACTTGGCTGGTA
ACAAGAACTTAGTTTTGCCAGTACCTGCATTCAACGTCATCAATGGTGG
ATCACATGCAGGAAACAAGCTTGCCATGCAGGAATTTATGATTCTCCCT
ATCGGTGCCTCCAGCTTTAAGGAAGCCATGAAGATGGGTGTTGAAGTA
TATCACAACCTGAAGTCTGTGATCAAGAAGAAATACGGTCAGGATGCA
ACAAATGTTGGTGATGAAGGTGGCTTTGCTCCCAATATTCAGGAAAAC
AAGGAGGGTCTTGAGTTGCTTAAGACGGCTATTGCTAAAGCTGGATAC
ACAGACAAGGTTGTCATTGGAATGGATGTTGCCGCATCTGAATTCTATG
GCGAGAAGGACAAGACCTATGATCTGAACTTCAAGGAAGAGAACAAC
GATGGCAAAGAAAAGATTTTCAGGAGAACAACTAAAAGATCTTTACAAG
TCGTTTGTGAGTGAGTACCCCATTTGTGTCATTGAGGACCCATTTGACC
AAGATGACTGGGAGCACTATGCCAAGATGACCGCTGAATGTGGCGAAC
AAGTTCAAATTGTAGGAGACGATCTTTTGGTCACCAACCCACGAGAG
TCAAGAAGGCAATTGATGAGAAGACTTGCAATGCTCTTCTTCTAAAGGT
CAACCAAATTGGGTCTGTGACCGAGAGTATCGAAGCTGTGAGGATGTC
CAAACATGCTGGTTGGGGTGTGATGGCCAGTCACCGCAGTGGAGAAAC
AGAGGACACCTTCATTGCTGATCTTTCTGTGGGTTTGGCAACGGGTCAA
ATCAAACTGGAGCTCCATGCAGGTCAGAGCGTCTTGCAAAGTACAAC
CAGCTGTTGAGAATCGAAGAAGAGCTTGGATCAGAAGCGGTTTATGCT
GGAGCCAACTCCGCAAGCCAGTGGAACCCTACCATCACCATCACCAT
CACTAGCCCGGG

Amb a 12 a fost utilizată ca exemplu, pentru a descrie proiectarea, expresia, purificarea, caracterizarea și implementarea în invenție a alergenelor recombinat din polenul de ambrozia.

Exemplul 1: Proiectarea alergenului recombinat din polenul de ambrozia



Secvența de aminoacizi (aa) din Amb a 12 a fost preluată din baza de date Allergome (număr de acces A0A1B2H9Q5). Au fost sintetizate cu marker C-terminal de hexa-histidină două gene care codifică Amb a 12. Secvența uneia dintre cele două gene a fost optimizată pentru expresie în *E. coli*, iar cealaltă pentru expresie în celulele de insecte *Sf9*. Pentru expresie în celulele de insecte trebuie adăugat un nucleotid suplimentar (citozină) după situsul de restricție N-terminal. Genele sintetice au fost clonate în fragmentul NdeI/XhoI al situsului de clonare multiplă al vectorului de expresie pET27b pentru expresia în *E. coli*. Pentru expresia în celulele *Sf9*, gena a fost clonată în fragmentul BamHI/SmaI al situsului de clonare multiplă al vectorului de expresie pTM1. După sinteză, secvențele de ADN au fost determinate prin secvențiere (ATG biosynthetics, Merzhausen, Germania).

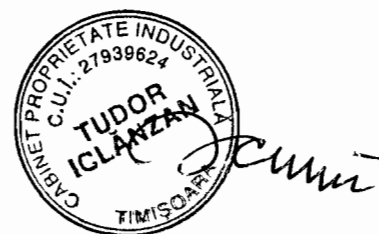
Exemplul 2: Expresia și purificarea alergenului Amb a 12

Pentru expresia în *E. coli*, vectorii care conțin genele Amb a 12 au fost transformați în tulpina de *E. coli* BL21 (DE3). Expresia proteică a fost realizată în cultură lichidă de 250 ml prin inducție cu izopropil- β -tiogalactopiranozidă 0,5 mM (IPTG) la OD₆₀₀ (densitate optică la 600 nm) de 0,6 peste noapte, la 37°C, iar apoi celulele au fost recoltate prin centrifugare la 4000×g timp de 15 min la 4°C. Sedimentul bacterian obținut din cultura lichidă cu volumul de 250 ml a fost resuspendat în 10 ml imidazol 25mM, pH 7,4, 0,1% (v / v) Triton X-100. Celulele au fost lizate prin trei cicluri de înghețare/dezghetare (-70°C / +50°C), ADN-ul a fost degradat prin incubare cu 1 μ g DNază I timp de 10 min la temperatura camerei, și resturile celulare au fost îndepărtate prin centrifugare (10000×g, 20 min la 4°C). Amb a 12 a fost identificat în supernatantul care a fost dializat împotriva soluției tampon A (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazol 10mM) și a fost purificat în condiții native pe coloane de afinitate cu Ni-NTA (QIAGEN, Hilden,



Germania). Frațiile obținute, care conțin proteine recombinante cu puritate mai mare de 90%, au fost dializate împotriva NaH_2PO_4 10mM, pH 8,5 și concentrațiile finale de proteine au fost determinate utilizând kitul de analiză proteică cu acid bicinchoninic (BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA).

Pentru expresia în celulele de insecte, vectorii care conțin genele Amb a 12 au fost mai întâi transformate în celule *E. coli* DH10 competente, în care gena de interes se transpune în bacmidul baculoviral. Clonele pozitive au fost selectate prin screeningul coloniilor albastre-albe, verificate prin PCR folosind primer M13 Forward și Reverse și amplificate prin creșterea peste noapte în 100 ml de mediu de cultură lichid. ADN-ul bacmid a fost apoi izolat folosind kitul Midiprep (Promega, Madison, WI, SUA). Înainte de expresia în celulele de insecte, a fost necesară prepararea unui stoc de baculovirus, prin transfecția bacmidului (2 μg de ADN bacmid purificat) în celulele *Sf9* (2×10^6 celule), folosind reactivul de transfecție FuGENE HD (Promega, Madison WI, SUA), pentru a obține primul stoc de virus P1, urmat de infecția repetată a celulelor *Sf9* cu baculovirus în cantitate crescută (stoc de virus P2 – 4 mL de P1 au fost adăugați la 20 mL de suspensie celulară (1×10^6 celule / ml) și stoc de virus P3 – 10 ml P2 au fost adăugați la 50 ml suspensie de celule). Expresia în celulele de insecte începe prin adăugarea de 50 μL soluție stoc de virus P3 la 1×10^6 celule în mediu fără FBS (ser fetal bovin), care apoi se incubează la 27°C timp de 96 ore sub agitare constantă (110 rpm). Celulele au fost apoi separate de supernatant prin centrifugare ($4000 \times g$, 5 min, 22°C). Supernatantul a fost dializat peste noapte împotriva soluției tampon A și apoi purificat prin cromatografie de afinitate cu Ni^{2+} în condiții native. Frațiile, care conțin proteine recombinante cu puritate de peste 90%, au fost dializate împotriva NaH_2PO_4 10mM, pH 8,5, iar concentrațiile finale de proteine au



fost determinate utilizând kitul de analiză proteică cu acid bicinchoninic (BCA Protein Assay Kit).

Exemplul 3: Caracterizarea alergenelor din polenul de ambrozia

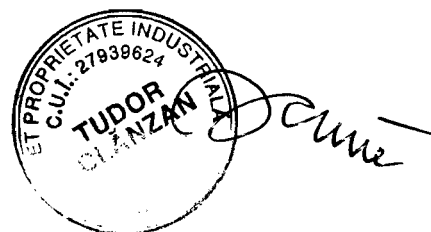
Puritatea și masa moleculară au fost controlate prin SDS-PAGE (electroforeză pe gel de poliacrilamidă utilizând sodium dodecil sulfat), prezentat în Fig.1. Ambele alergene Amb a 12 (cel exprimat în celule *E. coli* – eAmb a 12 și cel exprimat în celule de insecte – iAmb a 12) prezintă o bandă clară sub 55 kDa. Pentru a obține informații despre comportamentul de polimerizare a alergenelor recombinate, s-a efectuat SDS-PAGE în condițiile reducătoare și nereducătoare prezentate în Fig.1. Pentru condițiile reducătoare s-a utilizat soluție tampon care conține β -mercaptoetanol, iar probele au fost supuse fierberii la 95°C timp de 5 minute. Pentru condițiile nereducătoare a fost adăugată soluție tampon fără β -mercaptoetanol. În condiții reducătoare, cele două alergene Amb a 12, eAmb a 12 și iAmb a 12, apar ca proteine monomerice (Fig.1, benzile R). Dar, în condiții nereducătoare, alergenele eAmb a 12 formează agregate, în timp ce iAmb a 12 nu formează aproape niciun agregat (Fig.1, benzile NR).

Pentru a analiza împachetarea proteică, s-au efectuat măsurători de dicroism circular (DC) atât pentru eAmb a 12, cât și pentru iAmb a 12, cu o concentrație proteică de 0,1 mg/ml în NaH_2PO_4 10 mM, pH 8,5, folosind o cuvă de cuarț dreptunghiulară cu grosimea de 0,2 cm. Au fost înregistrate spectre de la 190 la 260 nm, cu o rezoluție de 0,5 nm, la o viteză de scanare de 50 nm/min, și au rezultat din media a trei scanări. Spectrele finale au fost corectate scăzând spectrele de bază obținute cu soluția tampon corespunzătoare (NaH_2PO_4 10 mM, pH 8,5) în condiții identice. Rezultatele sunt exprimate ca elipticitatea medie a rezidului (Θ) la o lungime de undă dată. Spectrul UV îndepărtat a arătat o curbă mai abruptă pentru iAmb a 12 decât pentru eAmb a 12, cu un minim mai mare între 200 și 210

nm și un maxim mai mare la 194 nm, indicând faptul că iAmb a 12 (negru) este împachetat mai bine decât eAmb a 12 (gri) (Fig.2). Prin urmare, este de preferat să fie utilizat iAmb a 12 pentru invenție.

Exemplul 4: Reactivitatea IgE a alergenelor recombinat

Reactivitatea IgE pentru toate cele 11 alergene recombinat din polenul de ambrozia s-a testat prin metoda ELISA la 150 de pacienți alergici la ambrozia. Alicote de 100 μ L din fiecare alergen recombinat diluat în PBS (soluție salină tamponată cu fosfat, 136 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4) (concentrație = 5 μ g/ml), au fost incubate peste noapte la 4°C pe o placă ELISA cu 96 de godeuri (Maxisorp Nunc, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, SUA). Plăcile au fost spălate de două ori cu PBST (PBS; 0,05% [v/v] Tween 20) și blocate cu soluție tampon de blocare (PBST, 3% [w/v] BSA (albumină serică bovină)) timp de 3 ore la temperatura camerei. Serurile pacienților au fost diluate 1:5 în PBST, 0,5% (w/v) BSA, și 100 μ L din această diluție au fost adăugați în fiecare godeu în duplicat și lăsate peste noapte la 4°C. Plăcile au fost spălate de cinci ori cu PBST și anticorpii IgE legați ai pacientului au fost detectați prin adăugarea în fiecare godeu a 100 μ L soluție anticorp policlonal caprin anti-IgE uman (epsilon) marcat cu peroxidază de hrean (HRP)(SeraCare, Milford, MA, SUA) diluat 1:2500 în PBST, 0,5% (w/v) BSA și incubat 3 ore la temperatura camerei. După cinci spălări, s-a adăugat substratul de detecție care conține sarea de diamoniu a 2,2'-azino-bis (acid 3-etil-benzotiazolin-6-sulfonic) (ABTS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SUA) în acid citric 60mM, 77mM Na₂HPO₄×2H₂O și 3mM H₂O₂. Absorbanța a fost măsurată la 405 nm cu referință la 490 nm pe cititorul de plăci (Tecan Infinite M200 Pro, Grödig, Austria). Pacienții testați pozitiv au fost afișați ca procente în Tabelul 2. Frecvența reactivității IgE a alergenelor noastre recombinat este comparabilă cu frecvența



raportată în literatura de specialitate (Chen KW, Marusciac L, Tamas PT *et al.*, Int Arch of Allergy Immunol 2018; 176: 163-80).

În Tabelul 2 sunt redate rezultate ELISA ale fiecărui alergen recombinat pentru 150 pacienți - % prevalență

Tabelul 2

Amb a 1	Amb a 3	Amb a 4	Amb a 5	Amb a 6	Amb a 8	Amb a 9	Amb a 10	Amb a 11	Amb a 12
93%	41%	30%	12%	31%	26%	11%	15%	38%	29%

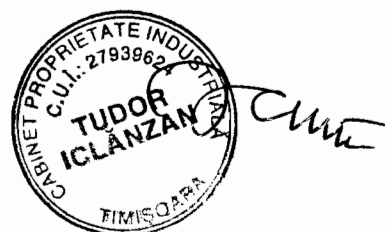
În Fig.1 este redat gelul SDS-PAGE cu colorație Coomassie ce conține Amb a 12 exprimat în *E. coli* (e) și Amb a 12 exprimat în celule de insecte (i), separate în condiții non-reducătoare (benzi NR) și reducătoare (benzi R), precum și un marker molecular (banda din stânga).

În Fig.2 este redat dicroismul circular (CD) în spectrul ultraviolet îndepărtat a iAmb a 12 și eAmb a 12. Rezultatele analizei CD a expresiei proteice sunt exprimate ca medie a elipticităților reziduale (axa y) la anumite lungimi de undă (axa x).

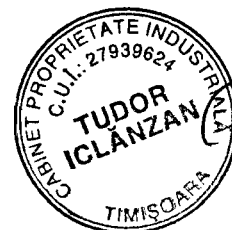
În Fig.3 este redat gelul SDS-PAGE cu colorație Coomassie ce conține toate alergenele recombinat exprimate și purificate.

În Fig.4 este redată o ilustrare a invenției. Aici, o placă ELISA a fost acoperită cu alergene recombinat în coloanele 1-10 cu Amb a 1.01, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 și Amb a 12. Doi pacienți alergici la ambrozia au fost testați (reprezențați în cadranele cu negru și gri deschis). Drept control sau comparator au fost testate o persoană non-alergică (notată cu NC, de culoare gri închis – cadrul al treilea de sus) și o soluție tampon fără ser (notată cu BC, de culoare albă- cadrul de jos).

In Fig.5 este prezentată reactivitatea IgE pentru fiecare alergen, care poate fi observată prin apariția culorii verzi după adăugarea substratului cromogen,



măsurată cu ajutorul spectrofotometrului și afișată ca densitate optică (OD)
(colonanele negre reprezintă pacientul 1, coloanele gri deschis pacientul 2,
coloanele gri închis controlul negativ – ser pacient non-alergic, coloanele albe
reprezintă proba cu soluție tampon, fără ser).



REVENDICĂRI

1. Metoda de utilizare a unui kit pentru diagnosticul alergiei la ambrozia prin implementarea unor alergene în tehnica ELISA, **caracterizată prin aceea că**, în scopul obținerii unui diagnostic precis cu identificarea profilului alergen ic se utilizează 11 alergene recombinat e din polenul de ambrozia prin parcurgerea următoarelor etape:
 - Expresia alergenelor în *Escherichia coli* (*E. coli*) sau în celule de insecte (*Sf 9*);
 - Extragerea alergenelor recombinat e și purificarea lor;
 - Eliminarea oricărui alt produs chimic din soluția în care se află alergenele recombinat e prin dializă împotriva soluției tampon final e;
 - Depozitarea alergenelor recombinat e la temperaturi între - 20° C și - 80° C până la utilizare;
 - Integrarea celor 11 alergene recombinat e în ELISA (testul imunosorbant legat de enzimă) prin imobilizare pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri;
 - Incubarea plăcii de microtitrare cu serul pacienților alergici;
 - Măsurarea cu spectrofotometrul a culorii obținute în urma reacției dintre enzimă și soluția substrat, atunci când soluția substrat este adăugată (HRP – verde, AP – galben).
 - Efectuarea de probe de control negativ (soluții tampon și/sau ser negativ de la pacienți non-alergici) pentru a diferenția rezultatele pozitive de cele negative;

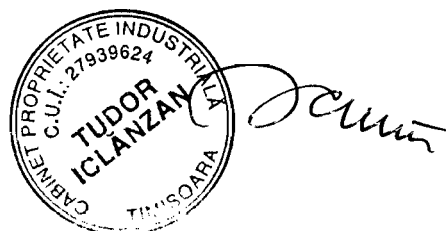


- Interpretarea rezultatelor pentru identificarea profilului detaliat de reactivitate IgE al persoanelor testate la alergenele din polenul de ambrozia.
2. Metoda de utilizare a unui kit pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** înainte de expresia proteică, secvenței de ADN ce codifică alergenul i se atașează o secvență ce codifică 6 histidine (His-Tag) pentru facilitarea purificării și identificării proteinei, inclusiv o secvență TEV opțională pentru separarea markerului His-Tag, urmând ca mai apoi să fie clonată într-un vector de expresie.
 3. Metoda de utilizare a unui kit pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** pentru expresia în E. coli vectorii pET17b sau pET27b sunt adecvați, iar pentru expresia în celule de insecte se poate folosi vectorul pTM1.
 4. Metoda de utilizare a unui kit pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** purificarea alergenelor recombinante este efectuată prin cromatografie de afinitate cu Ni²⁺.
 5. Metoda de utilizare a unui kit pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** soluția finală poate fi orice tampon, cum ar fi soluția salină tamponată cu fosfat (PBS) sau apă purificată la care pot fi adăugați aditivi, cum ar fi inhibitori de proteaze, pentru a crește stabilitatea alergenelor recombinante.
 6. Metoda de utilizare a unui kit pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** anticorpii IgE fixați vor fi detectați cu un anticorp anti-IgE uman marcat enzimatic, enzimele utilizate pentru marcarea putând fi peroxidaza din hrean (HRP) sau fosfataza alcalină (AP).



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Tudor Iclanzan".

7. Metoda de utilizare a unui kit pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** poate fi folosit un anticorp anti-IgE uman nemarcat ce poate fi ulterior detectat cu un anticorp secundar marcat enzimatic.
8. Metoda de utilizare a unui kit pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** probele control negative pot fi soluții tampon și/sau ser negativ (ser de la pacienți non-alergici) care vor fi tratate identic ca orice alt ser ce urmează să fie testat.
9. Kit pentru diagnosticul alergiei la ambrozia cuprinzând alergene recombinat exprimate și purificate în diferite sisteme gazdă precum *E. coli* și sisteme gazdă *Sf9*, provenite din insecte, **caracterizate prin aceea că** un număr de 11 alergene recombinat de ambrozia și anume Amb a 1.01; Amb a 3; Amb a 4; Amb a 5; Amb a 6; Amb a 8; Amb a 9; Amb a 10; Amb a 11 și Amb a 12, sunt atașate pe suprafața godeurilor unei plăci ELISA în care serul pacientului presupus alergic este testat comparativ cu o persoană non-alergică folosind o soluție tampon fără ser care permite evaluarea reactivității IgE prin apariția culorii măsurate cu ajutorul unui spectrofotometru care este apoi afișată ca densitate optică (OD).
10. Kit pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform revendicării 9, **caracterizat prin aceea că** fiecare alergen este reproductibil, putând fi produs în cantități și concentrații bine definite.
11. Kit pentru diagnosticul alergiei la ambrozia conform revendicării 9, **caracterizat prin aceea că** determină profilul alergic molecular al pacientului și evidențiază posibila reactivitatea încrucișată.



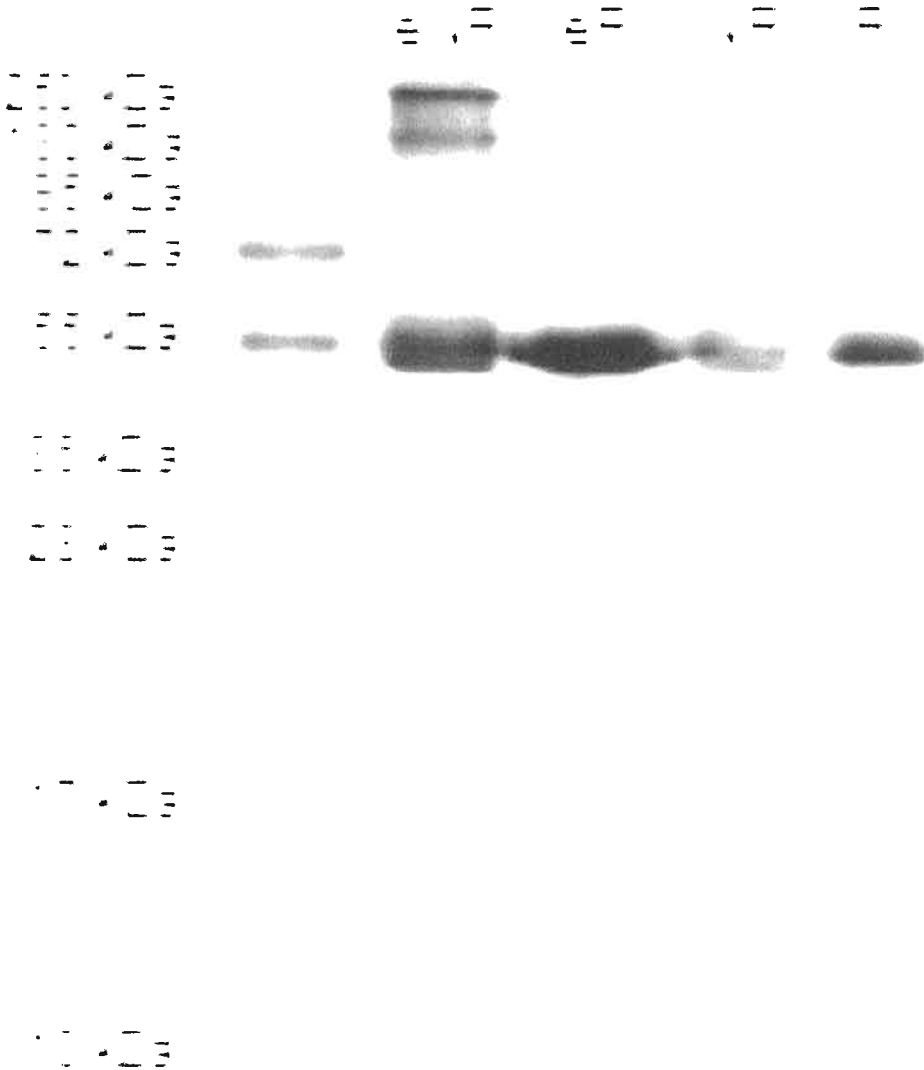


Fig.1



Demu

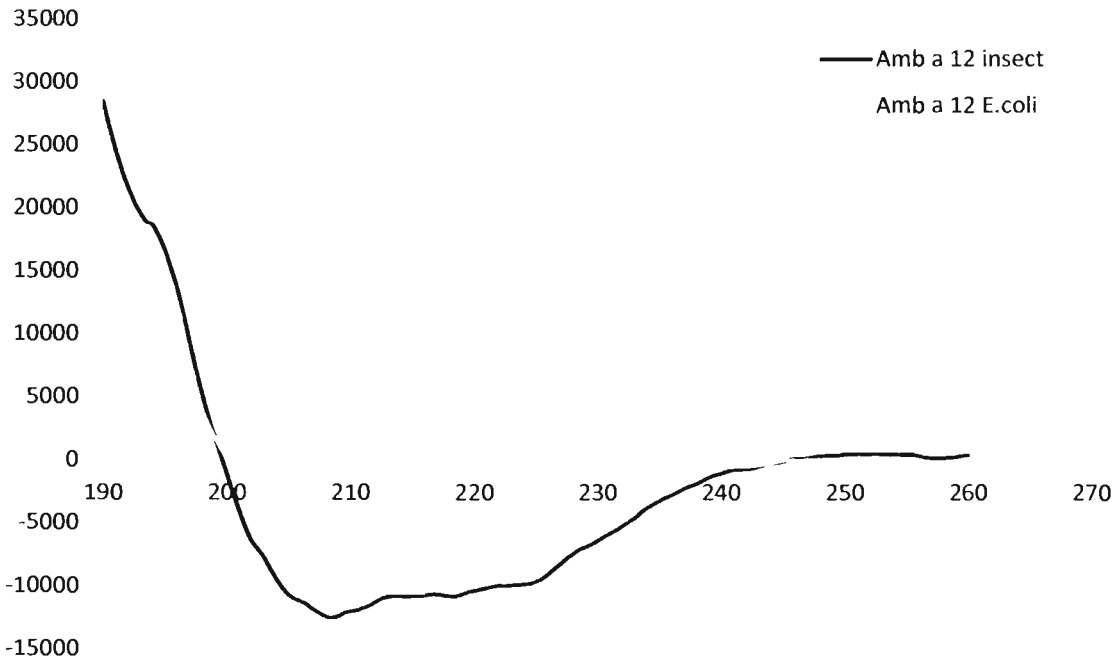


Fig.2

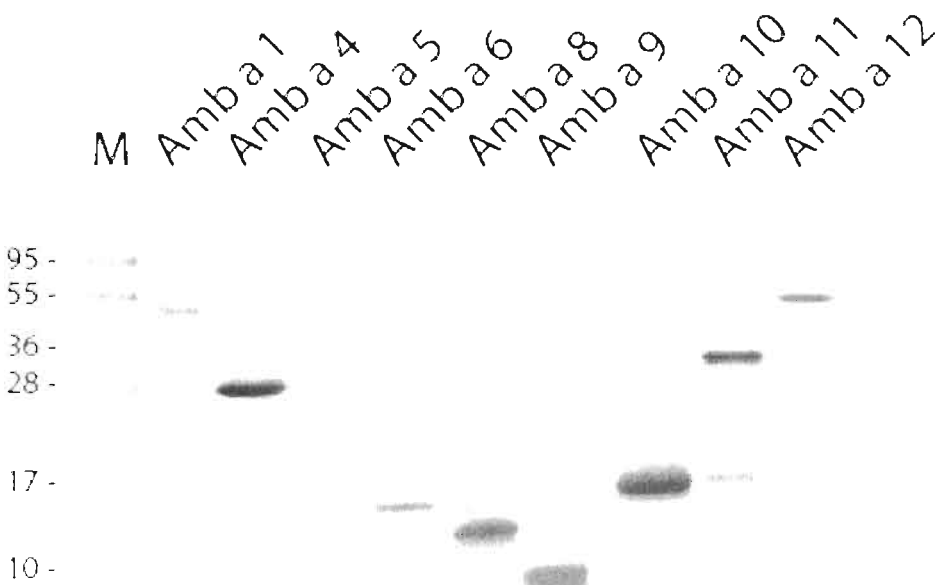


Fig.3



51

Amb a 1
 Amb a 3
 Amb a 4
 Amb a 5
 Amb a 6
 Amb a 8
 Amb a 9
 Amb a 10
 Amb a 11
 Amb a 12



Patient 1



Patient 2

Fig.4

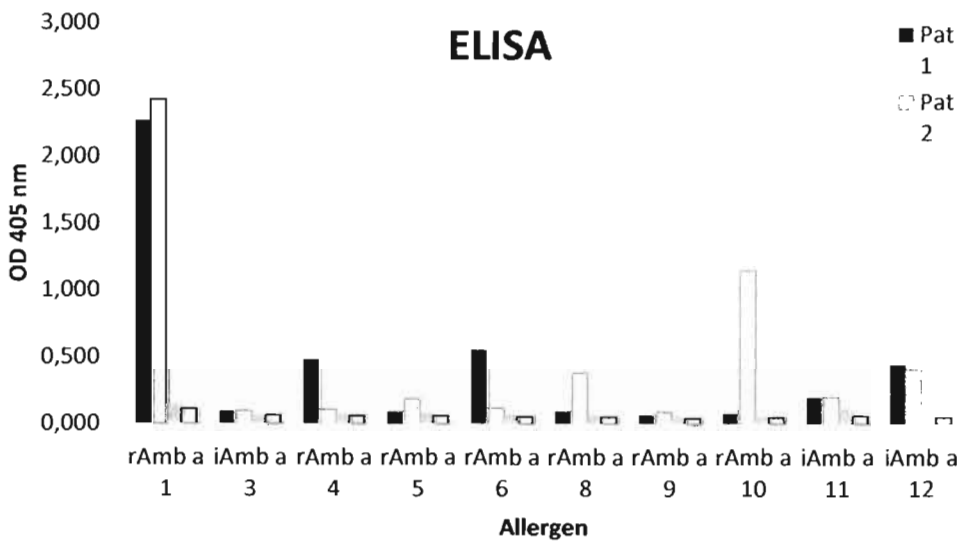


Fig.5

