



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00759

(22) Data de depozit: 19/11/2020

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(71) Solicitant:
• SPITALUL CLINIC JUDEȚEAN DE
URGENTĂ "PIUS BRÎNZEU" TIMIȘOARA,
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;
• BUZAN MARIA ROXANA,
ALEEA TREI APE, NR.1, SC.4, AP.3,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• GRIJINCU MANUELA, STR.HORIA,
NR.51, AP.2, TIMIȘOARA, TM, RO;
• ZBÎRCEA LAURIANA EUNICE,
STR.MAGUREI, NR.4, SEBIȘ, AR, RO;

• TAMAȘ TUDOR PAUL, BD.CEȚĂȚII,
NR.1/4, SC.B, AP.15, TIMIȘOARA, TM, RO;
• COTARCĂ MONICA, BD.3 AUGUST 1919,
NR.1, AP.6, TIMIȘOARA, TM, RO;
• HAIDAR LAURA, STR.ION NISTOR,
BL.A19, ET.3, AP.9, TIMIȘOARA, TM, RO;
• TĂNASIE GABRIELA, STR.MUNTENIEI,
BL.C30, AP.2, TIMIȘOARA, TM, RO;
• HUȚU IOAN, STR.GH.LAZĂR, NR.34,
ET.VIII, AP.69, TIMIȘOARA, TM, RO;
• ANGHEL SIMONA-SANDA,
STR.MARTIR VASILE BALMUȘ, NR.32-44,
SC.C, AP.8, TIMIȘOARA, TM, RO

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

(54) KIT DE TESTARE CU ANTICORPI ALERGEN-SPECIFICI
PENTRU DETECȚIA ȘI CUANTIFICAREA ALERGENELOR
DIN POLENUL DE AMBROZIE DIN MEDIU ȘI DIN EXTRACTE
ALERGENICE DIAGNOSTICE/TERAPEUTICE

(57) Rezumat:

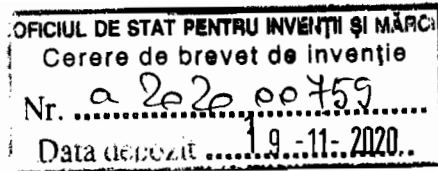
Invenția se referă la o metodă de detectare și cuantificare a alergenilor din polenul de ambrozia din mediu și din extracte alergene. Metoda, conform invenției, constă în realizarea și utilizarea unui kit de testare compus din zece probe de anticorpi alergen-specifici pentru ambrozia, (alergene recombinante de tip Amb a 1.01, Amb a 3 până la Amb a12 exprimate în celule gazdă de tip *Escherichia coli* sau celule de insecte), în care proba de interes (extract alergen sau proba din mediu) este adăugată pe o placă de microtitrare cu

96 godeuri, incubată cu ser de iepure care conține IgG alergen - specific pentru alergenele de ambrozie și detectarea prezenței alergenilor de ambrozia în probă, respectiv, cuantificarea alergenilor din proba examinată, metoda asigurând și standardizarea extractelor alergene utilizate în prezent în diagnostic și terapie.

Revendicări: 10
Figuri: 5

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





84

**KIT DE TESTARE CU ANTICORPI ALERGEN-SPECIFICI PENTRU
DETECȚIA ȘI CUANTIFICAREA ALERGENELOR DIN POLENUL DE
AMBROZIA DIN MEDIU ȘI DIN EXTRACTE ALERGENICE
DIAGNOSTICE/TERAPEUTICE**

Prezenta invenție se referă la domeniul medical, în special la detectarea și terapia alergiei la ambrozia. Mai precis, invenția se referă la proiectarea unui kit care să permită detectarea și cuantificarea alergenelor din 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, astmul) sau chiar fatale (de exemplu, șocul anafilactic) (Meltzer și colab., AAAI, 2011; Calderon și colab., CTA, 2012).

Ambrozia este una dintre cele mai importante surse de alergene, cu un impact puternic asupra sănătății umane în Europa, în special în părțile de est ale Europei, inclusiv în România (Bullock și colab., Evaluarea și controlul răspândirii și efectelor ambroziei comune în Europa, 2010). Ambrozia (genul *Ambrosia*, familia Asteraceae) este specia cu cea mai mare relevanță clinică, fiind 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 a fost recunoscută de mult timp ca o problemă majoră de sănătate, cu rate de sensibilizare de 10% - 26% în populația generală (Gergen și colab., JACI 1987; Arbes și colab., JACI, 2005). În Europa, *A. artemisiifolia* a fost importată începând cu anii 1900 și s-a răspândit rapid în multe zone din Europa Centrală și de Sud-Est. În Europa, frecvența de sensibilizare variază enorm de la o țară la alta. Un studiu (Burbach și colab.,

Allergy, 2009) a relevat o frecvență de sensibilizare între 2,4% în partea de vest a Europei și până la 50% în partea de est a Europei. Mai mult, a fost observată o creștere a prevalenței sensibilizării la ambrozia (Tosi A și colab., Swiss Med Wkly, 2011).

Majoritatea alergiilor, inclusiv alergia la ambrozia, încep cu simptomatologie ușoară (de exemplu, rinită), dar, dacă nu sunt diagnosticate și tratate corespunzător, pot progresa până la astm sever. Prin urmare, identificarea alergenelor care cauzează boala este esențială pentru diagnosticul precis al alergiei și constituie baza pentru tratamentul pacienților alergici prin intervenții alergen-specifice (de exemplu, evitarea alergenilor, dietă, imunoterapie alergen-specifică). În prezent, diagnosticul alergologic, precum și imunoterapia alergen-specifică (AIT) se bazează pe extractul alergen. Dar, una dintre principalele dificultăți întâlnite la utilizarea extractelor alergene este conținutul variabil de alergene. Există metode de standardizare și control al calității extractului alergen, cum ar fi determinarea conținutului total de proteine, măsurarea activității alergene și reactivitatea IgE a extractelor alergene sau determinarea caracteristicilor biochimice și biofizice ale extractului (Valenta și colab., J Allergy Clin Immunol Pract, 2018). Totuși, aceste metode nu reușesc să identifice moleculele alergene și să facă deosebirea între componentele alergene și non-alergene.

Importanța extractelor alergene standardizate și a extractelor de bună calitate a crescut în ultimele 2 decenii, în special în Uniunea Europeană. Deoarece extractele alergene utilizate pentru diagnostic sau terapie sunt acum definite ca produse medicale biologice prin Directivele UE 89/342 / CEE și 2001/83 / CE ele necesită autorizații pentru introducerea pe piață (Valenta și colab., J Allergy Clin Immunol Pract, 2018; Klimek L , Hoffman HJ și colab., Allergy, 2020). O condiție prealabilă majoră pentru folosirea produselor medicale asupra oamenilor este

fabricația în conformitate cu bunele practici de producție (GMP). Ceea ce înseamnă că extractele alergice trebuie să aibă o consecvență a caracteristicilor și calității. Prin urmare, identificarea și cuantificarea alergenilor dintr-un extract devin extrem de importante. Un alt domeniu în care identificarea și cuantificarea alergenilor este utilă este evaluarea probelor din mediul înconjurător. Posibilitatea de a determina încărcătura mediului/aerului cu diferite alergene din poate contribui la îmbunătățirea prognozei pentru expunere și poate contribui astfel la îmbunătățirea strategiei de evitare a alergenilor, ceea ce reprezintă, de asemenea, o parte importantă a terapiei alergen-specifice.

Se cunoaște invenția US2017157240A1 care se referă la extracte alergice din polen, în special extracte alergice din polenul de ambrosia (Ambrosia), care conțin cantități reduse de proteine asemănătoare proteinelor ce leagă cuprului pentru a minimiza riscul de toxicitate, cum ar fi cel de inducere a angioedemului. Invenția se referă, de asemenea, la metode de preparare a extractelor alergice de polen care să conțină cantități reduse de proteine asemănătoare proteinelor care leagă cuprul.

Se cunoaște invenția US2017262985A1 care descrie o metodă de cuantificare a reacției cutanate bazată pe imagini ce include imagistica unei zone de piele care a fost supusă unui test cutanat pentru a produce una sau mai multe imagini ale zonei. Metoda include identificarea regiunilor cu răspunsul de tip papulă și eritem în una sau mai multe imagini ale zonei și cuantificarea indicatorilor papulă și/sau eritem pe baza regiunilor identificate. Metoda include, de asemenea, generarea rezultatelor indicatorilor cuantificați papulă și/sau eritem, indicativi ai reacției alergice cuantificate pe piele.

Se cunoaște invenția US2017096459A1 în care etichete peptidice (Tag-uri) sunt furnizate pentru fuziunea lor cu proteinele la capetele N-terminale sau C-

terminale, care sunt definite de o serie de proprietăți structurale și funcționale care definesc siguranța lor în ceea ce privește modificarea structurii sau funcției biologice a proteinei sau peptidei la care sunt fuzionate și în care proteina-etichetă (Tag) este selectată dintr-un grup format dintr-un fragment de Phl p 2 (*Pheleum pratense*), un fragment de Hev b 6.02 (*Hevea brasiliensis*) și un fragment de Amb t 5 (*Ambrosia trifida*) sau o combinație a acestora. Sunt furnizate, de asemenea, metode pentru producerea și detectarea acestor proteine de fuziune recombinat, precum și a anticorpilor specifici care se leagă de aceste etichete.

Problema tehnică a prezentei invenții este de a realiza un kit de testare care să asigure calitatea, acuratețea diagnosticului și eficacitatea tratamentului prin detectarea și cuantificarea alergenelor de ambrozia în extracte și în probe de mediu, utilizând probe de anticorpi specifici pentru alergenele de ambrozia.

Kit-ul conform invenției, elimină dezavantajele cunoscute prin aceea că este compus din zece probe de anticorpi alergen–specifici pentru ambrozia (specifici pentru 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). Înainte de producerea acestor probe de anticorpi alergen–specifici, este necesară expresia alergenelor recombinat de ambrozia corespunzătoare. Alergenele din polenul de ambrozia utilizate pentru producția de anticorpi IgG sunt redat în Tabelul 1.

Tabelul 1

Numele alergenului	Nr. NCBI	Sistem de expresie
Amb a 1.01	AAA32665.1	Celule de insecte <i>Sf9</i>
Amb a 3	P00304.2	Celule de insecte <i>Sf9</i> , <i>E.coli</i>
Amb a 4	CBK52317.1	Celule de insecte <i>Sf9</i>
Amb a 5	P02878.1	<i>E. coli</i>
Amb a 6	AAB51146.1	Celule de insecte <i>Sf9</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>Sf9</i> , <i>E.coli</i>
Amb a 12	ANZ22900.1	Celule de insecte <i>Sf9</i> , <i>E.coli</i>

O placă cu 96 de godeuri (ELISA) este acoperită cu proba ce urmează a fi testată (extract de ambrozia, probă de mediu) și cu alergenele recombinante (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), după care serurile pre-imune de iepure sunt adăugate peste alergenele corespunzătoare folosind drept control negativ, urmând ca serurile imune de iepure specifice ficărui alergen de ambrozia să fie adăugate în godeurile acoperite cu alergenul corespunzător (control pozitiv) și în cele în care se află proba astfel încât se detectează prezența anumitor alergene în proba testată.

Metoda de realizare a kit-ului are în vedere faptul că cele zece alergene de ambrozia trebuie mai întâi să fie exprimate într-un sistem gazdă precum *Escherichia coli* (*E. coli*) sau celule de insecte. Înainte de expresia proteinei, secvența ADN care codifică

alergenul trebuie să fie sintetizată cu sau fără His-tag (6 x His) N- sau C- terminal. Includerea unei secvențe TEV pentru clivarea His-tag-ului este opțională. Această secvență ADN va fi clonată într-un vector de expresie. Pentru expresia *E. coli* sunt potriviți vectorii pET17b sau pET27b, iar pentru expresia celulei de insectă poate fi folosit vectorul pTM1. Expresia în *E. coli* poate fi efectuată precum a fost descris (Chen KW și colab., Mol Immunol, 2008) utilizând tulpina *E. coli* BL21. Expresia în celule de insectă este realizată în celule *Sf9* precum este descris în ghidul de utilizare "Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System" de la Thermo Scientific. După expresie, alergenele recombinante de ambrozia trebuie să fie extrase sau izolate pentru purificare. Dacă His-tag-ul este prezent, atunci purificarea poate fi realizată utilizând cromatografia de afinitate cu Ni²⁺, în caz contrar, alte metode cromatografice sunt utilizate. După purificare, oricare alte elemente chimice din soluția în care se află alergenul recombinat de ambrozia vor fi eliminate prin dializă împotriva soluției tampon finale. Această soluție tampon finală poate fi orice soluție tampon precum soluția salină tamponată cu fosfat (PBS) sau apa pură, unde alergenele recombinante sunt solubile și stabile. Pot fi adăugați aditivi precum inhibitori de protează pentru a crește stabilitatea alergenelor recombinante. După expresie și purificare alergenele recombinante pot fi depozitate la temperaturi între -20°C și -80°C până la utilizare.

Aceste alergene recombinante de ambrozia sunt utilizate pentru a imuniza iepuri cu scopul de a produce anticorpi alergen-specifici de tip IgG. 200μg de alergen vor fi injectate subcutanat într-un iepure de rasă albă de Noua Zeelandă, de trei ori în total, în intervale lunare, după care, cantitatea de alergen, intervalul și timpul injecției pot fi adaptate. Adjuvanții pot fi folosiți pentru a spori producția de IgG. Adjuvanți adecvați pot fi adjuvantul Freund (complet și incomplet), hidroxidul de aluminiu (AlOH) și altele. Acești anticorpi IgG alergen-specifici pentru alergenele din ambrozia induși la iepure pot fi acum implementați în invenție.

Invenția se va baza pe imunobloturi precum testul imunosorbant legat de enzimă (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), testul dotblot sau orice alt sistem bazat pe același principiu.

Metoda de utilizare se face după principiul testului ELISA, în care proba de interes (extractul alergen, proba din mediu) va fi adăugată pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri. Apoi, placa de microtitrare va fi incubată cu serul de iepure care conține IgG alergen-specific pentru alergenele de ambrozia. Acești anticorpi se vor lega dacă alergenul corespunzător este prezent. Anticorpii IgG legați ai iepurelui pot fi detectați cu anticorpi marcați cu o enzimă anti-IgG de iepure. Enzime folosite în această etapă pot fi peroxidaza din hrean (HRP), fosfataza alcalină (AP) sau alte enzime disponibile pe piață. Dacă este necesar, anticorpi nemarcați anti-IgG de iepure pot fi folosiți inițial, iar apoi detectați cu anticorpi secundari marcați cu o enzimă. Când soluția substrat este adăugată, o reacție de culoare va apărea (HRP-verde, AP-galben). Această reacție de culoare poate fi măsurată prin spectrofotometrie. Controalele negative sunt necesare pentru a distinge între o reacție pozitivă și una negativă. Soluția tampon de control (incubarea soluției tampon în locul serului de iepure) și/sau serul pre-imun (serul de iepure colectat înaintea imunizării cu alergenul) pot fi folosite ca și controale negative.

Rezultatele vor arăta prezența alergenelor de ambrozia în probe. Mai departe, utilizând alergenul recombinat de ambrozia ca standard de concentrație, este posibilă cuantificarea alergenelor din proba examinată.

Utilizarea probelor de anticorpi IgG specifici alergenelor din polenul de ambrozia pentru identificarea și cuantificarea mostrelor de extracte prezintă următoarele avantaje:

- Pot fi generați anticorpi IgG specifici pentru 10 alergene din ambrozia.
- Fiecare tip de anticorpi poate fi produs în cantități mari.
- Kit-ul de testare realizat este capabil să identifice și să cuantifice alergenele din ambrozia, din diverse mostre. Poate fi utilizat pentru evaluarea încărcăturii de alergene din mediu. Concentrația alergenelor din probele de aer poate fi măsurată și astfel pot fi inițiate măsuri preventive. Pe deasupra, acest test poate ajuta la standardizarea extractelor de alergene utilizate în prezent în diagnostic și terapie, astfel putând să îmbunătățească calitatea acestora și, prin urmare, și acuratețea diagnosticului și eficacitatea tratamentului.

În ceea ce urmează, sunt redată exemple ale invenției, cu referire la figurile care reprezintă:

Figura 1: Gel SDS-PAGE în 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 (prima bandă din stânga).

Figura 2: Gel SDS-PAGE în colorație Coomassie ce conține alergenele de ambrozia recombinat izolate și purificate.

Figura 3: Inducerea de anticorpi IgG Amb a 8-specifici în iepuri. Iepurii au fost imunizați cu rAmb a 8 adsorbit la adjuvantul Freund. În continuare, au fost analizate seruri în 3 momente diferite (înainte de imunizare – pre-imun; după 2 injecții – imun I; după 3 injecții – imun II). Reactivitatea IgG a antiserurilor la rAmb a 8 legat de placa ELISA a fost determinată pentru diferite diluții (axa x). Anticorpii IgG legați corespund valorilor densităților optice (OD; axa y).

Figura 4: O ilustrare a invenției. Placa ELISA a fost acoperită cu extract de ambrozia și cu alergenele recombinante Amb a 5 și Amb a 8. Apoi, serurile preimune de iepure Amb a 5-specifice au fost adăugate la plăcuțele acoperite cu rAmb a 5 (Amb a 5 negative control), iar serurile imune de iepure Amb a 5-specifice au fost adăugate la plăcuțele acoperite cu rAmb a 5 (Amb a 5 positive control) și la cele cu extractul de ambrozia (detecția Amb a 5 în extract). Aceleași etape au fost realizate și în cazul serurilor de iepure Amb a 8-specifice. Reactivitatea IgG poate fi observată sub forma culorii verzi, măsurată fotometric și afișată ca densitate optică (OD). În acest caz, se poate observa că extractul nu conține Amb a 5, dar Amb a 8 este prezent.

Figura 5: Curbă standard pentru cuantificarea Amb a 8. O placă ELISA a fost acoperită cu o serie de diluții de rAmb a 8 în trepte de 1:2, începând cu 1μg/ml (axa x). A fost adăgat apoi ser de iepure Amb a 8-specific (diluat 1:2000), iar anticorpii IgG legați au fost detectați și afișați ca densitate optică (axa y).

În continuare este prezentată secvența ADN a unui alergen de ambrozia folosită pentru expresia în *E. coli* și în celulele de insecte:

Nde I – CATATG

BamHI – GGATCC

XhoI – CTCGAG

SmaI – CCCGGG

6x His Tag

Stop codon – TAG

Secvență Amb a 12 pentru expresia în *E. coli*

CATATGGCAACCATCAAGGCAGTGAAGCTCGTCAAATCTTCGACAGC
AGAGGCAACCCTACCGTTGAGGTGGATATTACTCTTTCTGATGGCACGT
TGGCCCGGGCTGCTGTCCCCAGTGGTGCATCCACCGGTATTTACGAGGC
TCTTGAATTGAGAGATGGAGGGTCAGACTACCTTGGAAAAGGTGTCTC
TAAGGCTGTTGCAAACGTCAACACGATCATTGGCCCTGCTCTTGTAGGC
AAGGACCCAACCTGATCAGACCGGTATCGACAATTTTCATGGTTCAACAA
CTTGACGGAACCCAAAATGAATGGGGTTGGTGCAAGCAAAGCTTGGT
GCCAATGCCATCTTGGCAGTTTCTCTTGCAGTTTGCAAGGCTGGTGCTA
GCGTTCTCAAACTCCCCTTTACAAGCACATTGCCAACTTGGCTGGTAA
CAAGAACTTAGTTTTGCCAGTACCTGCATTCAACGTCATCAATGGTGGA
TCACATGCAGGAAACAAGCTTGCCATGCAGGAATTTATGATTCTCCCTA
TCGGTGCCTCCAGCTTTAAGGAAGCCATGAAGATGGGTGTTGAAGTAT
ATCACAACCTTGAAGTCTGTGATCAAGAAGAAATACGGTCAGGATGCAA
CAAATGTTGGTGATGAAGGTGGCTTTGCTCCCAATATTCAGGAAAACA
AGGAGGGTCTTGAGTTGCTTAAGACGGCTATTGCTAAAGCTGGATACA
CAGACAAGGTTGTCATTGGAATGGATGTTGCCGCATCTGAATTCTATGG
CGAGAAGGACAAGACCTATGATCTGAACTTCAAGGAAGAGAACAACG
ATGGCAAAGAAAAGATTTTCAGGAGAACA ACTAAAAGATCTTTACAAGT
CGTTTGTGAGTGAGTACCCCATTTGTGTCCATTGAGGACCCATTTGACCA
AGATGACTGGGAGCACTATGCCAAGATGACCGCTGAATGTGGCGAACA
AGTTCAAATTGTAGGAGACGATCTTTTGGTCACCAACCCACGAGAGTC
AAGAAGGCAATTGATGAGAAGACTTGCAATGCTCTTCTTCTAAAGGTC
AACCAAATTGGGTCTGTGACCGAGAGTATCGAAGCTGTGAGGATGTCC
AAACATGCTGGTTGGGGTGTGATGGCCAGTCACCGCAGTGGAGAAACA
GAGGACACCTTCATTGCTGATCTTTCTGTGGGTTTGGCAACGGGTCAAA

TCAAAACTGGAGCTCCATGCAGGTCAGAGCGTCTTGCAAAGTACAACC
AGCTGTTGAGAATCGAAGAAGAGCTTGGATCAGAAGCGGTTTATGCTG
GAGCCAACTTCCGCAAGCCAGTGGAACCCTACCCATCACCATCACCATC
ACTAGCTCGAG

Structură Amb a 12 pentru expresia în celulele de insecte

GGATCCCGCAACCATCAAGGCAGTGAAAGCTCGTCAAATCTTCGACAG
CAGAGGCAACCCTACCGTTGAGGTGGATATTACTCTTTCTGATGGCACG
TTGGCACGGGCTGCTGTCCCCAGTGGTGCATCCACCGGTATTTACGAGG
CTCTTGAATTGAGAGATGGAGGGTCAGACTACCTTGGAAAAGGTGTCT
CTAAGGCTGTTGCAAACGTCAACACGATCATTGGCCCTGCTCTTGTAGG
CAAGGACCCAACTGATCAGACCGGTATCGACAATTCATGGTTCAACA
ACTTGACGGAACCCAAAATGAATGGGGTTGGTGCAAGCAAAAGCTTGG
TGCCAATGCCATCTTGGCAGTTTCTCTTGCAGTTTGAAGGCTGGTGCT
AGCGTTCTCAAACTCCCCTTTACAAGCACATTGCCAACTTGGCTGGTA
ACAAGAACTTAGTTTTGCCAGTACCTGCATTCAACGTCATCAATGGTGG
ATCACATGCAGGAAACAAGCTTGCCATGCAGGAATTTATGATTCTCCCT
ATCGGTGCCTCCAGCTTTAAGGAAGCCATGAAGATGGGTGTTGAAGTA
TATCACAACCTGAAGTCTGTGATCAAGAAGAAATACGGTCAGGATGCA
ACAAATGTTGGTGATGAAGGTGGCTTTGCTCCCAATATTCAGGAAAAC
AAGGAGGGTCTTGAGTTGCTTAAGACGGCTATTGCTAAAGCTGGATAC
ACAGACAAGGTTGTCATTGGAATGGATGTTGCCGCATCTGAATTCTATG
GCGAGAAGGACAAGACCTATGATCTGAACTTCAAGGAAGAGAACAAC
GATGGCAAAGAAAAGATTCAGGAGAACAATAAAAGATCTTTACAAG
TCGTTTGTGAGTGAGTACCCCATTTGTGTCCATTGAGGACCCATTTGACC

AAGATGACTGGGAGCACTATGCCAAGATGACCGCTGAATGTGGCGAAC
AAGTTCAAATTGTAGGAGACGATCTTTTGGTCACCAACCCCACGAGAG
TCAAGAAGGCAATTGATGAGAAGACTTGCAATGCTCTTCTTCTAAAGGT
CAACCAAATTGGGTCTGTGACCGAGAGTATCGAAGCTGTGAGGATGTC
CAAACATGCTGGTTGGGGTGTGATGGCCAGTCACCGCAGTGGAGAAAC
AGAGGACACCTTCATTGCTGATCTTTCTGTGGGTTTGGCAACGGGTCAA
ATCAAAACTGGAGCTCCATGCAGGTCAGAGCGTCTTGCAAAGTACAAC
CAGCTGTTGAGAATCGAAGAAGAGCTTGGATCAGAAGCGGTTTATGCT
GGAGCCAACTCCGCAAGCCAGTGGAACCCTACCATCACCATCACCAT
CACTAGCCCGGG

In tabelul 2 sunt redate rezultatele ELISA ale fiecărui alergen recombinat pentru 150 pacienți - % prevalență iar in tabelul 3 protocolul de imunizare la iepuri (ex. alergenul Amb a 8)

Tabel 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%

Tabel 3

N° Iepure	Sex	Nume antigen + concentrație	Nume adjuvant	Greutate la începutul imunizării (g)	D0: Ser preimun (1,5-2,5 ml) 1. INJ SQ (8-10 locații)	D28: 2. INJ SC	D38 1. Test bleed	D49: 3. INJ SC
Date					19.03. 2018	16.04. 2018	26.04. 2018	07.05. 2018
338	F	Amba 8 (tuburi 200 µg)	Freund	3030	1 Tub Ag + 250µl CFA & 250µl IFA	1 Tub Ag + 500µl IFA	3-4ml	1 Tu Ag + 500µl IFA
345	M			2530	1 Tub Ag + 250µl CFA & 250µl IFA	1 Tub Ag + 500µl IFA		1 Tube Ag + 500µl IFA

Pentru a descrie proiectarea, expresia, purificarea, caracterizarea alergenelor recombinante de ambrozia, precum și inducerea și implementarea anticorpilor IgG

alergen-specifici în invenție, Amb a 8 și Amb a 12 au fost folosite ca exemple principale.

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 (His-tag) două gene care codifică pentru Amb a 12. Secvența uneia dintre cele două gene a fost optimizată pentru expresie în *E. coli*, iar cealaltă pentru expresie în celule 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/XhoII 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/dezgețare (-70°C / $+50^{\circ}\text{C}$), ADN-ul a fost degradat prin incubare cu $1\ \mu\text{g}$ DNază I timp de 10 min la temperatura camerei, și resturile celulare au fost îndepărtate prin centrifugare ($10000\times g$, 20 min la 4°C). Amb a 12 a fost identificat în supernatantul care a fost dializat împotriva soluției tampon A (NaH_2PO_4 50mM, NaCl 300mM, imidazol 10mM) și a fost purificat în condiții native pe coloane prin cromatografie de afinitate cu rășină Ni-NTA (QIAGEN, Hilden, Germania). Frațiile, 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 bacmidă baculovirală. Clonele pozitive au fost selectate prin screeningul de colonii 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 ($2\ \mu\text{g}$ de ADN bacmid purificat) în celulele *Sf9* (2×10^6 celule), folosind reactivul de transfecție FuGENE HD (Promega, Madison WI, SUA), pentru a primi 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×g, 5 min, 22°C). Supernatantul a fost dializat peste noapte împotriva soluției tampon A și apoi purificat prin cromatografie de afinitate cu Ni²⁺ în condiții native. Fraakțiile, care conțin proteine recombinat e cu puritate de peste 90%, au fost dializate împotriva NaH₂PO₄ 10mM, pH 8,5, iar concentrațiile finale de proteine au fost determinate utilizând kitul de analiză proteică cu acid bichinonic (BCA Protein Assay Kit).

Exemplul 3: Caracterizarea alergenelor din ambrozia

Puritatea și masa moleculară au fost evaluate prin metoda SDS-PAGE și expuse în Figura 1. Ambele alergene Amb a 12 (exprimată în E.coli – eAmb a 12 și exprimată în celule de insectă – iAmb a 12) arată o bandă clară poziționată sub marcajul 55 kDa. Pentru a primi informația despre comportamentul de polimerizare a alergenelor recombinat e, SDS-PAGE a fost efectuată în condiții reducătoare și non-reducătoare conform Figurii 1. Pentru condițiile reducătoare, o probă de soluție tampon conținând β-Mercaptoetanol a fost folosită și probele au fost fierte la 95°C pentru 5 minute, iar pentru condiții non-reducătoare o soluție tampon fără β-Mercaptoetanol a fost utilizată. În condiții reducătoare, cele două alergene Amb a 12, eAmb a 12 și iAmb a 12, se prezintă ca proteine monomeric e (Figura 1, banda r). În condiții non-reducătoare, alergenele recombinat e eAmb a 12 formează agregate, în timp ce iAmb a 12 aproape că nu formează agregate (Figura 1, benzile nr).

Figura 2 sumarizează alergenele recombinat e de ambrozia exprimate și purificate pe un gel SDS-PAGE.

Exemplul 4: Reactivitatea IgE a alergenelor recombinat

Reactivitatea a 150 de pacienți alergici la ambrozia pentru toate cele 10 alergene recombinat din ambrozia a fost testată prin ELISA. Alicote de 100 μ L, din fiecare alergen recombinat de ambrozia diluat în PBS (136mM NaCl, 2.6mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.7mM KH₂PO₄, pH 7.4) (concentrația = 5 μ g/mL) au fost incubate peste noapte la 4°C într-o placă ELISA cu 96 de godeuri (Maxisorp Nunc, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). Placa a fost spălată de două ori cu PBST (PBS; 0.05% [v/v] Tween20) și s-a realizat blocarea cu soluție tampon de blocare (PBST, 3% [w/v] BSA) pentru 3 ore la temperatura camerei. Serul pacienților a fost diluat 1:5 cu PBST, 0.5% (w/v) BSA și 100 μ L din această diluție a fost adăugată per godeu în duplicate peste noapte la 4°C. Plăcile au fost spălate de cinci ori cu PBST și anticorpii IgE legați ai pacientului au fost detectați cu 100 μ L/godeu de anticorpi IgE (epsilon) policlonali de capră anti-umani marcați cu peroxidaza din hrean (HRP) (SeraCare, Milford, MA, USA) în diluție 1:2500 cu PBST, 0.5% (w/v) BSA și incubati 3 ore la temperatura camerei. După cinci spălări substratul de detecție a fost adăugat, acesta conținând - 2,2'-Azino-bis(acid 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) sare de diamoniu (ABTS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) dizolvată în 60mM de acid citric, 77mM Na₂HPO₄ 2H₂O și 3mM H₂O₂. Absorbanta a fost măsurată la 405nm cu referință la 490nm pe cititorul de microplacă (Tecan infinite M200 Pro, Grödig, Austria). Procentul de pacienți testați pozitiv a fost prezentat în tabelul 2. Frecvența reactivității IgE la alergenele noastre recombinat este comparabilă cu frecvența raportată în literatură (Chen KW, Marusciac L, Tamas PT et al., Int Arch of Allergy Immunol, 2018).

Exemplul 5: Imunizarea iepurilor cu alergene recombinat și inducerea de IgG alergen-specific

200µg de Amb a 8 pur recombinat a fost injectat subcutanat cu 250µl de adjuvant Freund Complet (CFA) și 250µl de adjuvant Freund Incomplet (IFA) pentru prima injecție, respectiv 500µl IFA pentru a doua și a treia injecție. Aceste 3 injecții au fost administrate în intervale lunare. Prima probă de ser a fost luată înaintea imunizării (ser preimunizare), apoi la 10 zile după a 2-a injecție a fost prelevată a doua probă de ser (ser imunizat I), iar în final la 10 zile după cea de-a 3-a injecție a fost luată a treia probă de ser (care este în majoritatea cazurilor proba finală, serul imunizat II). Protocolul de imunizare este sumarizat în Tabelul 3. Pentru a analiza inducerea de IgG, un test ELISA a fost efectuat prin acoperirea cu rAmb a 8 (concentrația = 5µg/mL) peste noapte la 4°C pe o placă ELISA cu 96 de godeuri (Maxisorp Nunc, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). Plăcile ELISA au fost spălate de două ori cu PBST (PBS; 0.05% [v/v] Tween20) și s-a realizat blocarea cu soluție tampon de blocare (PBST, 3% [w/v] BSA) pentru 3 ore la temperatura camerei. Serurile de iepure Amb a 8–specifice (pre-imun, imunizat I și imunizat II) au fost diluate în pași 1:10 începând cu o diluție de 1:1000 (8 diluții) cu PBST, 0.5% (w/v) BSA, iar 100µL din aceste diluții au fost adăugate în duplicate peste noapte la 4°C. Plăcile au fost spălate de cinci ori cu PBST și anticorpul IgG au fost detectați cu 100µL/godeu de anticorpi IgG policlonali de capră anti-iepure marcați cu peroxidaza din hrean (HRP) diluați 1:2500 cu PBST, 0.5% (w/v) BSA și incubati 3 ore la temperatura camerei. După cinci spălări detecția a fost efectuată precum a fost descris în Exemplul 4. Anticorpul IgG legați corespund valorilor măsurate prin densitate optică (OD). Rezultatele ELISA au fost expuse în Figura 3.

Figura 4 prezintă o ilustrare a modului de funcționare a invenției. Placa ELISA va fi acoperită cu o probă de testare, în acest caz utilizând extract de ambrozia. Adăugând serul Amb a 5–specific și Amb a 8–specific, aceste alergene pot fi

detectate în extract, dacă sunt prezente. Exemplul nostru a arătat că extractul de polen de ambrozia utilizat a conținut Amb a 8, dar nu și Amb a 5.

Figura 5 prezintă o curbă standard folosind o concentrație exactă de Amb a 8. Concentrația Amb a 8 corespunde unei valori exacte a OD în ELISA după incubarea cu serul de iepure. Această curbă standard permite cuantificarea alergenelor de ambrozia în orice probă testată.

REVENDICĂRI

1. Metoda de realizare a unui kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de ambrozia **caracterizată prin aceea că** anticorpii alergen-specifici pentru zece alergene de ambrozia sunt produși parcurgând următoarele etape :
 - Sintetizarea unei secvenței ADN a alergenului pentru care se dorește obținerea de anticorpi specifici, în care secvența poate să conțină His-Tag (6xHis) N- sau C- terminal, iar pentru înlăturarea secvenței His-Tag se include o secvență TEV sau orice altă secvență pentru înlăturarea His-Tag, asupra căreia va acționa o enzimă.
 - Clonarea secvenței ADN într-un vector de expresie.
 - Efectuarea expresiei proteice a alergenului recombinat în *E. coli* utilizând o tulpină BL21, expresia în celule de insecte fiind realizată în celule Sf9.
 - Extragerea sau izolarea pentru purificare a alergenelor recombinat de ambrozia.
 - Eliminarea prin dializă, împotriva soluției tampon finale a tuturor substanțelor din soluția de alergen recombinat de ambrozia după purificare.
 - Depozitarea alergenelor recombinat după expresie și purificare la temperaturi între -20°C și -80°C până la utilizarea lor în imunizarea unor iepuri.
 - Utilizarea alergenelor recombinat de ambrozia pentru a imuniza iepurii cu scopul de a produce anticorpi alergen-specifici de tip IgG

prin injectare subcutanată a alergenului recombinat într-un iepure de rasă albă de Noua Zeelandă, în intervale lunare.

- Adaptarea cantității de alergen, a intervalului și timpului injecției.
- Folosirea unor adjuvanți pentru a spori producția de IgG.
- Implementarea anticorpilor IgG alergen-specifici pentru ambrozia induși la iepure într-un test de tip imunoblot precum testul imunosorbant legat de enzimă (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), testul dotblot sau orice alt sistem bazat pe același principiu.

2. Metoda de realizare a unui kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de ambrozia conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** pentru expresia *E. coli* sunt potriviți vectorii pET17b sau pET27b, iar pentru expresia celulei de insectă poate fi folosit vectorul pTM1.
3. Metoda de realizare a unui kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de ambrozia conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** dacă 6xHis este prezent, atunci purificarea poate fi realizată utilizând cromatografie chelatoare cu Ni²⁺, sau folosind alte metode cromatografice.
4. Metoda de realizare a unui kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de ambrozia conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** adjuvanții adecvați pot fi adjuvantul Freund (complet și incomplet), hidroxidul de aluminiu (AlOH) și altele.
5. Metoda de utilizare a unui kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de ambrozia **caracterizată prin aceea că** anticorpii specifici pentru cele zece alergene recombinat de ambrozia sunt folosiți în felul următor :

- O probă de interes ce trebuie analizată (extractul alergen, proba din mediu) va fi adăugată pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri conform principiului testului ELISA.
 - Placa de microtitrare va fi incubată cu serul de iepure care conține anticorpi IgG specifici pentru fiecare alergen din ambrozia astfel că anticorpilor se vor lega dacă alergenul corespunzător este prezent în proba analizată.
 - Detectarea anticorpilor IgG de iepure legați se face cu anticorpi anti-IgG de iepure marcați cu o enzimă.
 - Adăugarea unei soluții pentru producerea unei reacții de culoare (HRP-verde, AP-galben).
 - Măsurarea reacției de culoare prin spectrofotometrie.
 - Utilizarea unor controale negative necesare pentru a distinge între o reacție pozitivă și una negativă.
 - Cuantificarea alergenelor din proba de interes utilizând alergenul recombinat de ambrozia ca standard de concentrație.
6. Metoda de utilizare a unui kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de ambrozia conform revendicării 5 **caracterizată prin aceea că** enzimele care sunt legate de anticorpilor anti-IgG de iepure, folosite în etapa de detecție a anticorpilor IgG de iepure pot fi peroxidaza din hrean (HRP), fosfataza alcalină (AP) sau alte enzime disponibile pe piață.
7. Metoda de utilizare a unui kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de ambrozia conform revendicării 5 **caracterizată prin aceea că** anticorpi anti-IgG de iepure,

- nemarcați, pot fi folosiți inițial, iar apoi detectați cu anticorpi secundari marcați cu o enzimă.
8. Metoda de utilizare a unui kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de ambrozia conform revendicării 5 **caracterizată prin aceea că** soluția tampon de control (incubarea soluției tampon în locul serului de iepure) și/sau serul pre-imun (serul de iepure colectat înaintea imunizării cu alergenul) pot fi folosite ca și controale negative.
 9. Kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de ambrozia **caracterizată prin aceea că** este compus din zece probe de anticorpi specifici pentru zece alergene din ambrozia (specifci pentru 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) în care o placă cu 96 de godeuri (ELISA) este acoperită cu proba ce urmează a fi testată (extract de ambrozia, probă de mediu) și cu alergenele recombinat (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), după care serurile pre-imune de iepure sunt adăugate peste alergenele corespunzătoare folosind drept control negativ, urmând ca serurile imune de iepure specifice ficărui alergen de ambrozia să fie adăugate în godeurile acoperite cu alergenul corespunzător (control pozitiv) și în cele în care se află proba astfel încât se detectează prezența anumitor alergene în proba testată.
 10. Kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de ambrozia conform revendicării 9 **caracterizată prin aceea că** în cazul serurilor de iepure specifice alergenelor din ambrozia, reactivitatea IgG poate fi observată în urma unei reacții de culoare, măsurată fotometric și afișată ca densitate optică (OD) determinându-se dacă proba

analizată (extract alergenice, probă din mediu) conține alergenul corespunzător
IgG specific care a legat de probă.

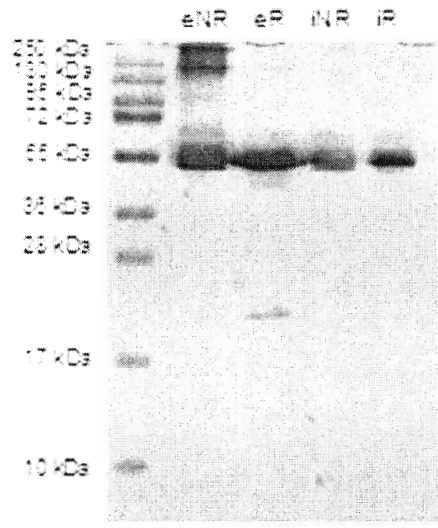


Fig.1

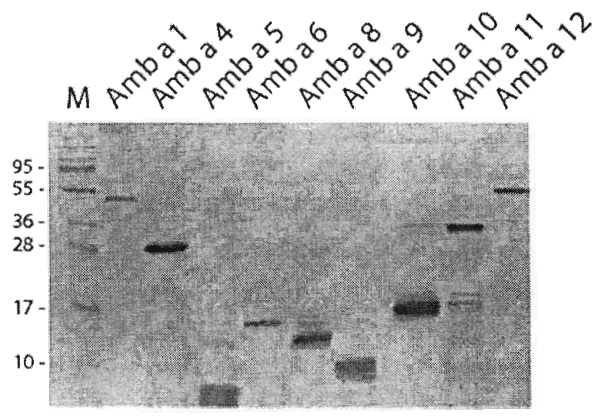


Fig.2

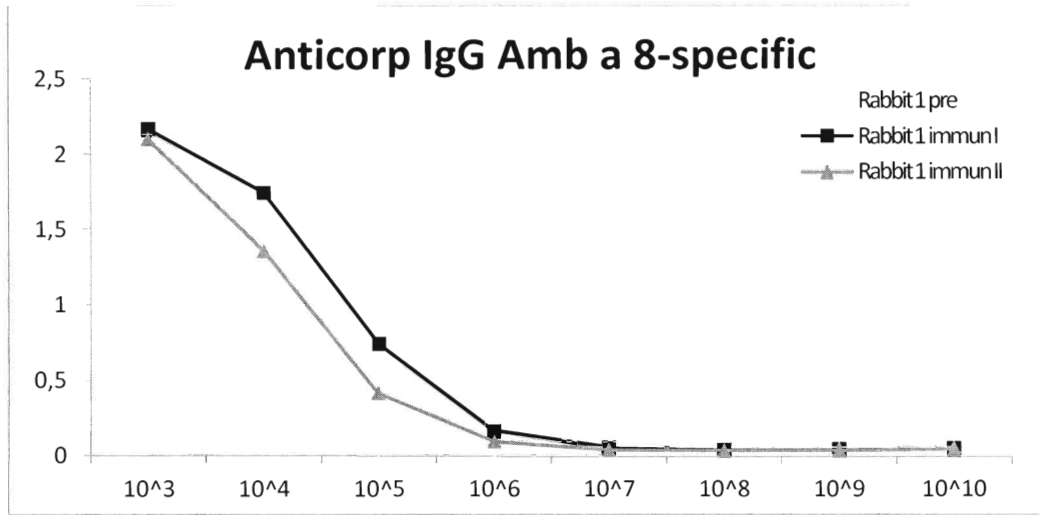


Fig.3

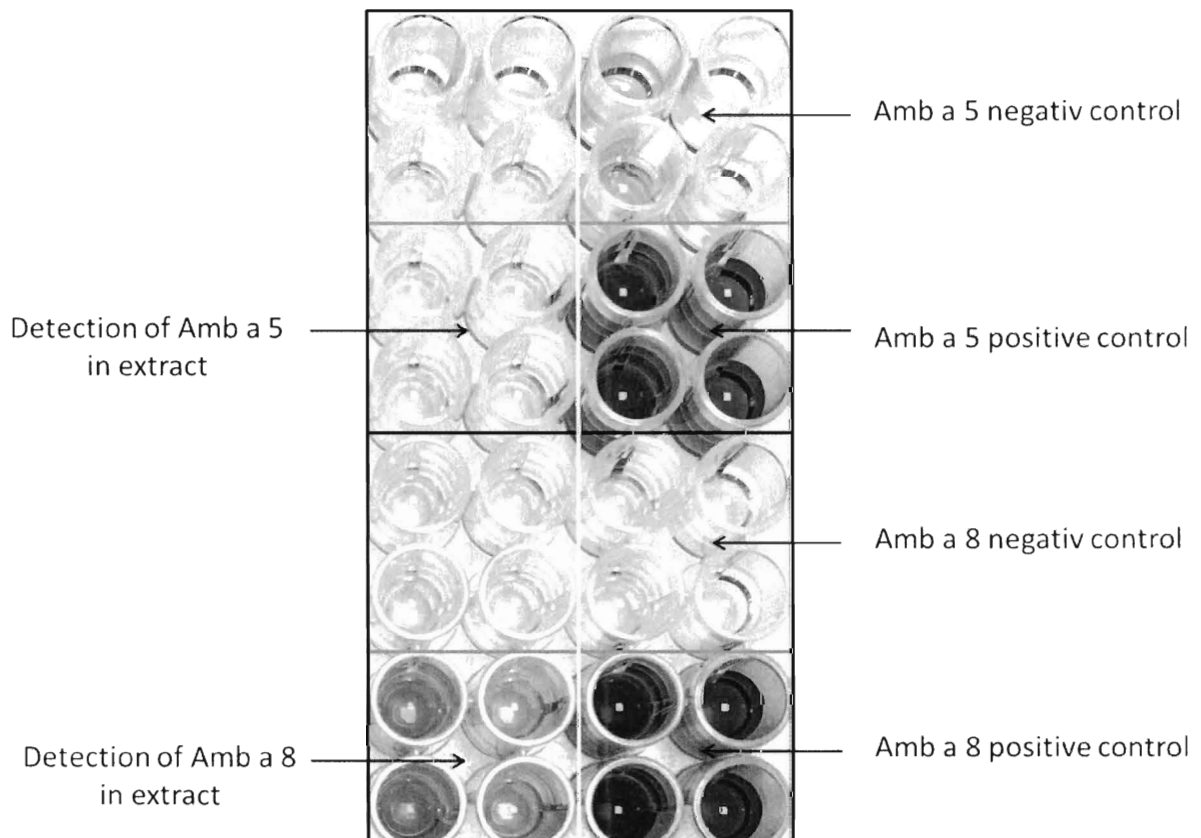


Fig.4

