

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392350** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.02.14

(51) Int. Cl. *C07K 16/16* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.05.31

(54) **АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА К ВЕТ v 1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/513,872; 62/571,696; 62/662,165**

(32) **2017.06.01; 2017.10.12; 2018.04.24**

(33) **US**

(62) **201992651; 2018.05.31**

(71) Заявитель:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Оренго Джейми М., Мерфи Эндрю
Дж., Бадите Ашок Т., Камат Вишал,
Лю Яшу (US)**

(74) Представитель:

**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)**

(57) В настоящем документе предусмотрены антитела, которые связываются с аллергенами Fagales, родственными Fagales аллергенами, пыльцой березы или Vet v 1, композиции, содержащие антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, и способы применения антител. Согласно определенным вариантам осуществления антитела представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела, которые связываются с Vet v 1. Антитела являются применимыми для связывания Vet v 1 in vivo, таким образом предотвращая связывание аллергена с предварительно образованным IgE на поверхности тучных клеток или базофилов. Тем самым антитела действуют для предотвращения высвобождения гистамина и других медиаторов воспаления из тучных клеток и/или базофилов, тем самым уменьшая интенсивность неблагоприятного ответа на аллергены Fagales у сенсibilизированных пациентов.

A1

202392350

202392350

A1

АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА К ВЕТ v 1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0001] Настоящее изобретение относится к антителам человека и антигенсвязывающим фрагментам антител человека, которые связывают с аллергеном пыльцы березы, Bet v 1, терапевтическим композициям, содержащим антитела, и способам применения антител.

Перечень последовательностей

[0002] Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с описанием изобретения в электронном виде посредством EFS-Web в виде отформатированного в соответствии с ASCII (Американский стандартный код обмена информацией) перечня последовательностей с названием файла 10301WO01_SEQ_LIST_ST25, датой создания 31 марта 2018 г. и размером, составляющим 137 KB. Перечень последовательностей, содержащийся в этом отформатированном согласно ASCII документе, является частью настоящего описания изобретения и тем самым полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0003] Береза является преобладающей причиной возникновения аллергии у 23% пациентов с аллергией в США и 14% пациентов с аллергией в Европе (отчет Datamonitor report on Allergic Rhinitis, июль 2010 г.) и основной причиной аллергии 1 типа весной в Европе, Северной Америке, России и Австралии (Breiteneder et al., *EMBO J.* 1989, 8(7): 1935-8). Белок Bet v 1 является основным аллергеном березы, идентифицированным в пыльце *Betula verrucosa* (дерево европейской белой березы, синонимом также является название *Betula pendula*) и отвечает за связывание IgE более чем у 95% пациентов с аллергией на пыльцу березы (Breiteneder, выше). Bet v 1 представляет собой небольшой 7-цепочечный антипараллельный β -лист с тремя α -спиралями и известной кристаллической структурой (Kofler et al., 2012, 422(1): 109-23; Markovic-Housley et al., *J Mol Biol.* 2003, 325(1): 123-33; Spangfort et al., *J. Immunol.* 2003, 171(6): 3084-90). Международная патентная публикация WO 94/10194 относится к пептидам, полученным из деревьев порядка Букоцветных (Fagales).

[0004] Шестьдесят процентов пациентов с аллергией на пыльцу березы реагируют исключительно на Bet v 1 (Jarolim et al., Int Arch Allergy Appl Immunol. 1989, 88(1-2): 180-2). Одна береза может производить до пяти миллионов пыльцевых зерен, которые перемещаются по воздуху на расстояние до 100 ярдов от дерева. Симптомы аллергии на пыльцу березы могут варьироваться от легкого ринита и конъюнктивита до угрожающих жизни астматических реакций.

[0005] Иммуноглобулин E (IgE) отвечает за гиперчувствительность 1 типа, которая проявляется в аллергическом рините, аллергическом конъюнктивите, сенной лихорадке, аллергической бронхиальной астме, аллергии на пчелиный яд и аллергии на пищевые продукты. IgE циркулирует в крови и связывается с высокоаффинными рецепторами FcεR1α для IgE на базофилах и тучных клетках. При большинстве аллергических ответов аллергены попадают в организм при вдыхании, проглатывании или через кожу. Затем аллерген связывается с предварительно образованным IgE, уже связанным с высокоаффинным рецептором на поверхностях тучных клеток и базофилов, что приводит к перекрестному сшиванию нескольких молекул IgE и запуску высвобождения гистамина и других медиаторов воспаления, вызывающих различные аллергические симптомы.

[0006] Лечение аллергии включает в себя стероиды для подавления иммунной активности и бронходилататоры для облегчения симптомов бронхиальной астмы. Десенсибилизирующую терапию также используют для пациентов с тяжелой аллергией. Комбинации пептидных вакцин были испытаны для десенсибилизации людей к определенным аллергенам, например Bet v 1 (см. патент США № 9017689). Для лечения аллергий были предложены антитела, поскольку они могут блокировать проникновение молекул аллергенов в ткани слизистой оболочки или могут связывать аллерген до того, как у него появится возможность связываться с IgE, связанным с высокоаффинным рецептором на тучных клетках или базофилах, таким образом предотвращая высвобождение гистамина и других медиаторов воспаления из этих клеток.

[0007] В патенте США № 5670626 описано применение моноклональных антител для лечения IgE-опосредованных аллергических заболеваний, таких как аллергический ринит, аллергическая бронхиальная астма и аллергический конъюнктивит, путем блокирования связывания аллергенов с тканью слизистой оболочки. В патенте США № 6849259 описано применение аллерген-специфических антител для ингибирования аллергического воспаления в *in vivo* модели аллергии у мышей. Были описаны системы антител на основе молока и яиц. Например, в заявке на выдачу патента США № US2003/0003133A1 раскрыто использование молока в качестве носителя для аллергенов

для индукции оральной толерантности к пыльце березы и другим аллергенам. Композиции и способы снижения аллергического ответа у животного на аллерген в окружающей среде посредством использования молекулы, которая ингибирует способность аллергена связываться с тучными клетками, были описаны в международной патентной публикации WO 1994/024164A2. Другие антитела к Bet v 1 были упомянуты в патентном документе США № 2010/0034812.

[0008] Настоящее изобретение направлено на преодоление одной или нескольких проблем, обсуждаемых выше.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0009] В настоящем документе предусмотрены полностью человеческие моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают пыльцу березы, например натуральный Bet v 1, экстракт пыльцы березы *Betula pendula* (BPE), BPE *Betula nigra* или BPE *Betula populifolia*. Антитела могут являться применимыми для связывания аллергена Bet v 1 *in vivo* после воздействия аллергена березы на сенсibilизированного пациента и, как таковые, могут действовать либо для стимуляции удаления природного Bet v 1, экстракта пыльцы березы *Betula pendula* (BPE), BPE *Betula nigra* или BPE *Betula populifolia*, либо для блокирования связывания аллергена с предварительно образованным IgE на поверхности тучных клеток или базофилов. Таким образом, антитела, описанные в настоящем документе, могут предотвращать высвобождение гистамина или других медиаторов воспаления из тучных клеток или базофилов, тем самым предотвращая или уменьшая неблагоприятные эффекты, наблюдаемые у пациентов, сенсibilизированных к аллергену березы. Согласно определенным вариантам осуществления антитела могут быть способны уменьшать, минимизировать или предотвращать по меньшей мере один симптом у пациента, чувствительного к аллергену березы или аллергену, родственному аллергену березы, такой как чихание, конгестия, заложенность носа, кашель, одышка, бронхоспазм, ринит или конъюнктивит. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела могут быть способны предотвращать даже более серьезные осложнения *in vivo*, связанные с воздействием аллергена пыльцы березы на сенсibilизированных индивидуумов, такие как астматические реакции, анафилаксия или даже смерть.

[0010] Предусмотренные в настоящем документе антитела могут являться полноразмерными, например, антитело IgG1 или/и IgG4, или могут содержать только антигенсвязывающую часть, например, фрагмент Fab, F(ab')₂ или scFv, и могут быть

модифицированы, чтобы повлиять на функциональность, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164: 1925-1933).

[0011] Первый аспект настоящего изобретения относится к выделенному моноклональному антителу человека или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с природным Bet v 1, экстрактом пыльцы березы *Betula pendula* (BPE), BPE *Betula nigra* и/или BPE *Betula populifolia*.

[0012] Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание природного Bet v 1, BPE *Betula pendula*, BPE *Betula nigra* или BPE *Betula populifolia* с аллерген-специфическим IgE.

[0013] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с Bet v 1 с K_D , равной или составляющей меньше чем 10^{-8} М. Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с Bet v 1 с K_D , находящейся в диапазоне от приблизительно 10^{-8} до приблизительно 10^{-11} М. Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с Bet v 1 с K_D , равной или составляющей меньше чем 27,9 нМ. Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с Bet v 1 с K_D , равной, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,66 нМ до приблизительно 27,9 нМ.

[0014] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело.

[0015] Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент вступает в перекрестную реакцию с одним или несколькими аллергенами, выбранными из группы, состоящей из *Aln g1*, *Cor a1*, *Car b1*, *Que a1*, *Api g2*, *Api g1*, *Dau c1*, *Mal d1*, *Ost c1*, *Fag s1* и *Cas s1*. Такие аллергены также можно назвать белками PR-10, или так называемыми белками, связанными с патогенезом (PR). Дополнительные белки PR-10 (представители семейства Bet v 1) также включают в себя *Act s 8* и *Act d 8* (киви), *Ara h 8* (арахис), *Pru ar 1* (абрикос), *Pru av 1* (вишня), *Pru p 1* (персик), *Pyr c 1* (груша), *Gly m 4* (соя), *Vig r 1* (золотистая фасоль), *Sola I 4* (помидор), *Cuc m 3* (дыня), *Rub i 1* (малина), и *Fra a 1* (клубника). Указанные аллергены также можно считать аллергенами, родственными *Fagales*.

[0016] Согласно одному варианту осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вступает в перекрестную реакцию с одним или

несколькими аллергенами, выбранными из группы, состоящей из Aln g1, Mal d1, Api g1, Car b1 и Cor a1.

[0017] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей варибельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282 и 290; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266 и 298. Способы и техники идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в настоящей области техники и их можно использовать для идентификации CDR в пределах заданных аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные соглашения, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на изменчивости последовательности, определение согласно Chothia основано на расположении областей структурной петли, а определение AbM является сочетанием подходов Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, (1997), *J. Mol. Biol.* 273:927-948; и Martin *et al.*, (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272. Общедоступные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в пределах антитела.

[0018] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей варибельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 146, 98 и 290; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 154, 106 и 298.

[0019] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282 и 290.

[0020] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 146, 98 и 290.

[0021] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266 и 298.

[0022] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 154, 106 и 298.

[0023] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282 и 290; и (b) LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266 и 298.

[0024] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 146, 98 и 290; и (b) LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 154, 106 и 298.

[0025] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующее:

(a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 284 и 292;

(b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 286 и 294;

(c) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 288 и 296;

(d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268 и 300;

(e) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270 и 302; и

(f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272 и 304.

[0026] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, 282/266 и 290/298.

[0027] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114/122, 146/154, 98/106 и 290/298.

[0028] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146/154 и 290/298.

[0029] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 44 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 44 до приблизительно 70 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 19 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно 57 до приблизительно 70 согласно SEQ ID NO: 306; и аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно 81 до приблизительно 96 согласно SEQ ID NO: 306.

[0030] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 44 согласно SEQ ID NO: 306.

[0031] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 43 согласно SEQ ID NO: 306.

[0032] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 44 до приблизительно положения 70 согласно SEQ ID NO: 306.

[0033] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 44 до приблизительно положения 56 согласно SEQ ID NO: 306.

[0034] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 2 до приблизительно положения 19 согласно SEQ ID NO: 306.

[0035] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 57 до приблизительно положения 70 согласно SEQ ID NO: 306.

[0036] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 57 до приблизительно положения 66 согласно SEQ ID NO: 306.

[0037] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 81 до приблизительно положения 96 согласно SEQ ID NO: 306.

[0038] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 81 до приблизительно положения 89 согласно SEQ ID NO: 306.

[0039] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью,

выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310 и 311. Эпитопы, содержащие SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310 или 311, можно удлинить на 1 - 5 аминокислот или 5-10 аминокислот, либо на С-конце, либо на N-конце. Например, эпитоп согласно SEQ ID NO: 311 при удлинении на 5-10 аминокислот охватывает эпитоп согласно SEQ ID NO: 115. Другими словами, эпитоп, содержащий SEQ ID NO: 311, например, включает в себя эпитоп согласно SEQ ID NO: 315.

[0040] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с SEQ ID NO: 307.

[0041] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с SEQ ID NO: 308.

[0042] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с SEQ ID NO: 309.

[0043] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с SEQ ID NO: 310.

[0044] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с SEQ ID NO: 311.

[0045] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют с SEQ ID NO: 315.

[0046] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, 311 и 315, и содержат пару последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114/122, 146/154, 98/106 и 290/298.

[0047] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые взаимодействуют с SEQ ID NO: 307, содержат три HCDR, содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 146, и три LCDR, содержащиеся в варибельной области легкой цепи согласно SEQ ID NO: 154.

[0048] Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые взаимодействуют с SEQ ID NO: 310, содержат три HCDR, содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 290, и три LCDR, содержащиеся в варибельной области легкой цепи согласно SEQ ID NO: 298.

[0049] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 148, 150 и 152 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 156, 158 и 160 соответственно.

[0050] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 292, 294 и 296 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 300, 302 и 304 соответственно.

[0051] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 4, 6 и 8 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 12, 14 и 16 соответственно.

[0052] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 20, 22 и 24 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 28, 30 и 32 соответственно.

[0053] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 36, 38 и 40 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 44, 46 и 48 соответственно.

[0054] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 52, 54 и 56 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 60, 62 и 64 соответственно.

[0055] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 68, 70 и 72 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 76, 78 и 80 соответственно.

[0056] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 84, 86 и 88 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 92, 94 и 96 соответственно.

[0057] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 100, 102 и 104 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 108, 110 и 112 соответственно.

[0058] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 116, 118 и 120 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 124, 126 и 128 соответственно.

[0059] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 132, 134 и 136 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 140, 142 и 144 соответственно.

[0060] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 164, 166 и 168 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 172, 174 и 176 соответственно.

[0061] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 180, 182 и 184 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 188, 190 и 192 соответственно.

[0062] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 196, 198 и 200 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 204, 206 и 208 соответственно.

[0063] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 212, 214 и 216 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 220, 222 и 224 соответственно.

[0064] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 228, 230 и 232 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 236, 238 и 234 соответственно.

[0065] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 244, 246 и 248 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 252, 254 и 256 соответственно.

[0066] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 260, 262 и 264 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 268, 270 и 272 соответственно.

[0067] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 276, 278 и 280 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 268, 270 и 272 соответственно.

[0068] Согласно одному варианту осуществления антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 согласно SEQ ID NO: 284, 286 и 288 соответственно и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID NO: 268, 270 и 272 соответственно.

[0069] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к полностью человеческому моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с природным Bet v 1, ВРЕ березы *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* или ВРЕ *Betula populifolia*, причем антитело или его фрагмент проявляет одну или несколько следующих характеристик: (i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282 и 290, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266 и 298, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 288 и 296, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272 и 304, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iv) содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 284 и 292, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 286 и 294, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268 и 300, или по

существо сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270 и 302, или по существо сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (v) связывается с Bet v 1 с K_D , равной или составляющей меньше чем 10^{-8} и находящейся в диапазоне от приблизительно 10^{-8} до приблизительно 10^{-11} ; (vi) демонстрирует эффективность по меньшей мере в одной модели анафилаксии или воспаления на животных; или (vii) конкурирует с эталонным антителом за связывание с природным Bet v 1, ВРЕ березы *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* или ВРЕ *Betula populifolia*.

[0070] Согласно одному варианту осуществления “эталонное антитело” может включать в себя, например, антитела с комбинацией пар аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, 282/266 и 290/298.

[0071] Настоящее изобретение относится к антителам с модифицированным профилом гликозилирования. В некоторых применениях применимой может являться модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, или например, удаление фукозного фрагмента для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield *et al.*, 2002, *JBC* 277: 26733). В других применениях модификацию галактозилирования можно осуществить для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

[0072] Согласно второму аспекту предусмотрено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за специфическое связывание с природным Bet v 1, ВРЕ березы *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* или ВРЕ *Betula populifolia* с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащими определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), причем HCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282 и 290; и CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), причем LCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266 и 298.

[0073] Согласно одному варианту осуществления предусмотрено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за специфическое связывание с природным Bet v 1, BPE березы *Betula pendula*, BPE *Betula nigra* или BPE *Betula populifolia* с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащими определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), причем HCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 146, 98 и 290; и CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), причем LCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 154, 106 и 298.

[0074] Согласно родственному варианту осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые конкурируют за специфическое связывание с природным Bet v 1, BPE березы *Betula pendula*, BPE *Betula nigra* или BPE *Betula populifolia* с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащими CDR тяжелой и легкой цепей, содержащиеся в пределах пар последовательностей тяжелой и легкой цепей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, 282/266 и 290/298.

[0075] Согласно третьему аспекту предусмотрено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом на Bet v 1, что и антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), причем HCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282 и 290; и CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), причем LCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266 и 298.

[0076] Согласно одному варианту осуществления предусмотрено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом на Bet v 1, что и антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), причем HCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 146, 98 и 290; и CDR варибельной

области легкой цепи (LCVR), причем LCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 154, 106 и 298.

[0077] Согласно родственному варианту осуществления в настоящем документе предусмотрено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом на Bet v 1, что и антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR тяжелой и легкой цепей, содержащиеся в пределах пар последовательностей тяжелой и легкой цепей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, 282/266 и 290/298.

[0078] Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела к Bet v 1 или их фрагменты. Рекомбинантные экспрессионные векторы, несущие такие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, в которых такие векторы были введены, также предусмотрены в настоящем документе, как и способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев при условиях, обеспечивающих возможность получения антител, и выделения полученных антител.

[0079] Согласно одному варианту осуществления в настоящем документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие моноклональное антитело человека или его фрагмент, которые связываются с природным Bet v 1, ВРЕ *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* или ВРЕ *Betula populifolia*.

[0080] Согласно одному варианту осуществления в настоящем документе предусмотрено антитело или его фрагмент, содержащие HCVR, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 281 и 289, или по существу идентичной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологией по отношению к ним.

[0081] Согласно одному варианту осуществления HCVR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113, 145, 257 и 289.

[0082] Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент дополнительно содержит LCVR, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265 и 297, или по существу идентичной последовательности,

характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% гомологией по отношению к ним.

[0083] Согласно одному варианту осуществления LCVR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121, 153, 265 и 297.

[0084] Согласно одному варианту осуществления в настоящем документе предусмотрено антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, содержащие домен HCDR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 287 и 295, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271 и 303, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0085] Согласно одному варианту осуществления в настоящем документе предусмотрено антитело или его фрагмент, дополнительно содержащие домен HCDR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 283 и 291, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен HCDR2, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 285 и 293, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен LCDR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267 и 299, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR2, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269 и 301, или

по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0086] Согласно пятому аспекту предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество одного или нескольких выделенных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с природным Bet v 1, ВРЕ березы *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* или ВРЕ *Betula populifolia*, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

[0087] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество двух или более выделенных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с Bet v 1, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

[0088] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит следующее:

a) первое выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, которые содержат HCVR с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 146; и LCVR с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 154;

b) второе выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, которые содержат HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 98 и 290; и LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 106 и 298; и

c) одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

[0089] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит следующее:

a) первое выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, которые содержат HCVR с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 290; и LCVR с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 298;

b) второе выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, которые содержат HCVR с

аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 146 и 98; и LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 154 и 106; и

с) одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

[0090] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит следующее:

а) первое выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, которые содержат HCVR с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 146; и LCVR с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 154;

б) второе выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, которые содержат HCVR с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 290; и LCVR с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 298; и

с) одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

[0091] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит следующее:

а) первое выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCVR с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 146, и LCVR с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 154;

б) второе выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCVR с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 290, и LCVR с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 298;

с) одно или несколько дополнительных выделенных моноклональных антител человека или антигенсвязывающих фрагментов, содержащих HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114 и 98, и LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122 и 106; и

д) одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

[0092] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит следующее:

первое выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, состоящую из SEQ ID NO: 146/154;

второе выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114/122, 98/106 и 290/298; и

одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

[0093] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит следующее:

первое выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, состоящую из SEQ ID NO: 146/154;

второе выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, состоящую из SEQ ID NO: 290/298; и

одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

[0094] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит два или более выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с Bet v 1, содержащих пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, 282/266 и 290/298; и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

[0095] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит три или более выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с Bet v 1, содержащих пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, 282/266 и 290/298; и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

[0096] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит четыре выделенных моноклональных антитела человека, которые связываются с Bet v 1, или их антигенсвязывающие фрагменты, причем антитела человека или их антигенсвязывающие фрагменты содержат пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 114/122, 146/154, 98/106 и 290/298; и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

[0097] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело, обозначенное H4H16992P, характеризующееся парой аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 146/154; антитело, обозначенное H4H17082P2, характеризующееся парой аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 290/298; и антитело, обозначенное H4H17038P2, характеризующееся парой аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 98/106.

[0098] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело, обозначенное H4H16992P, характеризующееся парой аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 146/154; антитело, обозначенное H4H17082P2, характеризующееся парой аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 290/298; антитело, обозначенное H4H17038P2, характеризующееся парой аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 98/106; и антитело, обозначенное H4H16987P, характеризующееся парой аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 114/122.

[0099] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество первого выделенного моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Bet v 1, причем первое антитело или его фрагмент взаимодействует с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 44 согласно SEQ ID NO: 306, и второго выделенного моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Bet v 1, причем второе антитело или его фрагмент взаимодействует с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 44 до приблизительно положения 70 согласно SEQ ID NO: 306, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

[00100] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество первого выделенного

моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Bet v 1, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, причем первое антитело или его фрагмент взаимодействует с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 43 согласно SEQ ID NO: 306, и второго выделенного моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Bet v 1, причем второе антитело или его фрагмент взаимодействует с аминокислотными остатками, находящимися в диапазоне от приблизительно положения 44 до приблизительно положения 56 согласно SEQ ID NO: 306.

[00101] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество первого выделенного моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Bet v 1, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, причем первое антитело или его фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 307, и второе выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с Bet v 1, причем второе антитело или его фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 308, 309, 310, 311 или 315.

[00102] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество первого выделенного моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Bet v 1, и одного или нескольких дополнительных выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с Bet v 1, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, причем первое антитело или его фрагмент взаимодействует по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 43 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 44 до приблизительно 56 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 19 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно 57 до приблизительно 70 согласно SEQ ID NO: 306; и аминокислотных остатков, находящихся в

диапазоне от приблизительно 81 до 89 или приблизительно 81 до приблизительно 96 согласно SEQ ID NO: 306.

[00103] Согласно одному варианту осуществления одно или несколько дополнительных выделенных моноклональных антител человека или их фрагментов взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 43 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 44 до приблизительно 56 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 19 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно 57 до приблизительно 70 согласно SEQ ID NO: 306; и аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно 81 до 89 или приблизительно 81 до приблизительно 96 согласно SEQ ID NO: 306, причем по меньшей мере одно из одного или нескольких дополнительных выделенных моноклональных антител человека взаимодействует с другой аминокислотной последовательностью, чем первое выделенное моноклональное антитело человека.

[00104] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество первого выделенного моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с $\text{Bet } \nu 1$, и одного или нескольких дополнительных выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с $\text{Bet } \nu 1$, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, причем первое антитело или его фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 307, и причем одно или несколько дополнительных антител или их фрагментов взаимодействуют с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 308, 309, 310, 311 и 315.

[00105] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество по меньшей мере двух выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с природным $\text{Bet } \nu 1$ или ВРЕ, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, причем по меньшей мере два антитела не конкурируют за связывание с природным $\text{Bet } \nu 1$ или ВРЕ. Согласно некоторым аспектам антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой

антитела к Bet v 1, H4H16992P и H4H17082P2, содержащие пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 146/154 и 290/298 соответственно.

[00106] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество по меньшей мере трех выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с природным Bet v 1 или ВРЕ, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, причем по меньшей мере три антитела не конкурируют за связывание с природным Bet v 1 или ВРЕ. Согласно некоторым аспектам антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой антитела к Bet v 1, H4H16992P, H4H17082P2 и H4H17038P2, содержащие пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 146/154, 290/298 и 98/106 соответственно.

[00107] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество по меньшей мере четырех выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с природным Bet v 1 или ВРЕ, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, причем по меньшей мере четыре антитела не конкурируют за связывание с природным Bet v 1 или ВРЕ. Согласно некоторым аспектам антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой антитела к Bet v 1, H4H16992P, H4H17082P2, H4H17038P2 и H4H16987P, содержащие пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 146/154, 290/298, 98/106, и 114/122 соответственно.

[00108] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество выделенного моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с Bet v 1, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вступают в перекрестную реакцию с одним или несколькими аллергенами, выбранными из группы, состоящей из Aln g1, Cor a1, Car b1, Que a1, Api g2, Api g1, Dau c1, Mal d1, Ost c1, Fag s1 и Cas s1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вступает в перекрестную реакцию с одним или несколькими аллергенами, выбранными из группы, состоящей из Aln g1, Mal d1, Api g1, Car b1 и Cor a1.

[00109] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию терапевтически

эффективного количества одного или нескольких антител к Bet v 1 или их антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению и терапевтически эффективное количество второго терапевтического средства вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

[00110] Второе терапевтическое средство может представлять собой низкомолекулярное лекарственное средство, белок/полипептид, антитело, молекулу нуклеиновой кислоты, такую как антисмысловая молекула, или кРНК. Второе терапевтическое средство может являться синтетическим или происходящим из природного источника.

[00111] Второе терапевтическое средство может представлять собой любое средство, которое эффективно сочетается с антителом или его фрагментом согласно настоящему изобретению, например, второе антитело, отличное от описанных в настоящем документе, которое способно блокировать связывание Bet v 1 с присутствующим на тучных клетках или базофилах IgE. Вторым терапевтическим средством также может являться любое средство, которое используют в качестве стандарта лечения аллергического ответа на любой аллерген. Такое второе терапевтическое средство может представлять собой антигистамин, эпинефрин, противозастойное средство, кортикостероид или пептидную вакцину.

[00112] Согласно определенным вариантам осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое помогает нейтрализовать или уменьшить любой(ые) возможный(е) побочный(е) эффект(ы), связанный(е) с антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела согласно настоящему изобретению, если такой(ие) побочный(е) эффект(ы) должно(ы) произойти.

[00113] Также следует понимать, что антитела и фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению можно применять в видах комбинированной терапии, т.е. антитела и фармацевтически приемлемые композиции можно вводить одновременно, до или после одного или нескольких других требуемых терапевтических средств или медицинских процедур, включая в себя, например, в комбинации со схемой аллерген-специфической иммунотерапии (SIT), когда антитела вводят до или во время SIT. Конкретная комбинация видов лечения (терапевтических средств или процедур) для применения в комбинированной схеме будет учитывать совместимость требуемых терапевтических средств и/или процедур и требуемого терапевтического эффекта, который должен быть достигнут. Также следует понимать, что применяемые виды терапии могут достигать требуемого эффекта в отношении того же нарушения (например, антитело можно вводить одновременно с другим средством,

применяемым для лечения того же нарушения), или они могут достигать различных эффектов (например, контроль любых неблагоприятных эффектов). Используемые в настоящем документе дополнительные терапевтические средства, которые, как правило, вводят для лечения или предотвращения конкретного заболевания или состояния, являются подходящими для заболевания или состояния, подлежащих лечению.

[00114] При совместном введении нескольких терапевтических средств дозировки можно соответствующим образом скорректировать, как это установлено в соответствующей области техники.

[00115] Согласно шестому аспекту предусмотрен способ лечения пациента, который демонстрирует чувствительность или аллергический ответ по отношению к белку *Fagales*, родственному *Fagales* аллергену, пыльце березы или ее экстракту или белку *Bet v 1*, или лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с чувствительностью или аллергическим ответом по отношению к белку *Fagales*, родственному *Fagales* аллергену, пыльце березы или ее экстракту или белку *Bet v 1*, предусматривающий введение эффективного количества одного или нескольких выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с природным *Bet v 1*, ВРЕ *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* или ВРЕ *Betula populifolia*, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество одного или нескольких выделенных моноклональных антител человека или их фрагментов, которые связываются с природным *Bet v 1*, ВРЕ *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* или ВРЕ *Betula populifolia*, нуждающемуся в этом пациенту, причем чувствительность или аллергический ответ по отношению к белку *Fagales*, родственному *Fagales* аллергену, пыльце березы или ее экстракту или белку *Bet v 1* или предотвращается, или уменьшается по степени тяжести и/или продолжительности, или по меньшей мере один симптом или осложнение, ассоциированные с чувствительностью или аллергическим ответом по отношению к белку *Fagales*, родственному *Fagales* аллергену, пыльце березы или ее экстракту или белку *Bet v 1*, предотвращаются или уменьшаются по интенсивности, или частота и/или продолжительность или степень тяжести чувствительности или аллергического ответа по отношению к белку *Fagales*, родственному *Fagales*, пыльце березы или ее экстракту или белку *Bet v 1* снижается после введения одного или нескольких выделенных моноклональных антител человека или их фрагментов, которые связываются с природным *Bet v 1*, ВРЕ *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* или ВРЕ *Betula populifolia*, или после введения композиции, содержащей любое одно или несколько указанных выше антител.

[00116] Согласно некоторым вариантам осуществления экстракт пыльцы березы выбирают из группы, состоящей из природного Bet v 1, ВРЕ *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* и ВРЕ *Betula populifolia*.

[00117] Согласно некоторым вариантам осуществления лечение приводит к снижению аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, аллергической бронхиальной астмы или анафилактической реакции после воздействия на пациента белка *Fagales*, родственного *Fagales* аллергена, пыльцы березы или ее экстракта или белка Bet v 1.

[00118] Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение эффективного количества второго терапевтического средства, применимого для ослабления аллергического ответа на белок *Fagales*, родственной *Fagales* аллерген, пыльцу березы или ее экстракт или белок Bet v 1. Второе терапевтическое средство можно выбрать из группы, состоящей из кортикостероида, бронходилататора, антигистаминного средства, эпинефрина, противозастойного средства, другого отличающегося антитела к Bet v 1 и пептидной вакцины.

[00119] Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает лечение пациента с помощью схемы аллерген-специфической иммунотерапии (SIT) сразу после или одновременно с антителами или их фрагментами или фармацевтической композицией, содержащей антитела.

[00120] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента с аллергией на *Fagales*, который демонстрирует чувствительность или аллергический ответ по отношению к одному или нескольким аллергенам *Fagales* или родственным аллергенам *Fagales*, или лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с чувствительностью или аллергическим ответом по отношению к одному или нескольким аллергенам *Fagales* или родственным аллергенам *Fagales*, предусматривающему введение эффективного количества одного или нескольких выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с Bet v 1, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество одного или нескольких выделенных моноклональных антител человека или их фрагментов, которые связываются с Bet v 1, нуждающемуся в этом пациенту, причем чувствительность или аллергический ответ по отношению к аллергену *Fagales* или родственному *Fagales* аллергену или предотвращается, или уменьшается по степени тяжести и/или продолжительности, или по меньшей мере один симптом или осложнение, ассоциированные с чувствительностью или аллергическим

ответом по отношению к аллергену Fagales или родственного Fagales аллергена, предотвращаются или уменьшаются по интенсивности, или частота и/или продолжительность или степень тяжести чувствительности или аллергического ответа по отношению к аллергену Fagales или родственного Fagales аллергена снижается после введения одного или нескольких выделенных моноклональных антител человека или их фрагментов, которые связываются с Bet v 1, или после введения композиции, содержащей любое одно или несколько указанных выше антител.

[00121] Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько аллергенов Fagales выбраны из группы, состоящей из Bet v 1, Aln g1, Cor a1, Car b1 и Que a1.

[00122] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей одно или несколько антител, описанных в настоящем документе, которые связываются с природным Bet v 1, ВРЕ *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* и ВРЕ *Betula populifolia*, для применения при лечении пациента, который демонстрирует чувствительность или аллергический ответ по отношению к белку Fagales, пыльце березы или ее экстракту или белку Bet v 1, или для лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с чувствительностью или аллергическим ответом по отношению к белку Fagales, пыльце березы или ее экстракту или белку Bet v 1, причем чувствительность или аллергический ответ по отношению к белку Fagales, пыльце березы или ее экстракту или белку Bet v 1 или предотвращается, или уменьшается по степени тяжести и/или продолжительности, или по меньшей мере один симптом или осложнение, ассоциированные с чувствительностью или аллергическим ответом по отношению к белку Fagales, пыльце березы или ее экстракту или белку Bet v 1, предотвращаются или уменьшаются по интенсивности, или частота и/или продолжительность или степень тяжести чувствительности или аллергического ответа по отношению к белку Fagales, пыльце березы или ее экстракту или белку Bet v 1 снижается.

[00123] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, содержащей одно или несколько антител согласно настоящему изобретению, которые связываются с Bet v 1, в получении лекарственного средства для применения при лечении пациента, который демонстрирует чувствительность или аллергический ответ по отношению к пыльце березы или ее экстракту или к белку Bet v 1, или для лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с чувствительностью или аллергическим ответом по отношению к пыльце березы или ее экстракту, или к белку Bet v 1, причем чувствительность или аллергический ответ по отношению к пыльце березы или ее экстракту или к белку Bet

v 1 или предотвращается, или уменьшается по степени тяжести и/или продолжительности, или по меньшей мере один симптом или осложнение, ассоциированные с чувствительностью или аллергическим ответом по отношению к пыльце березы или ее экстракту или к белку Bet v 1, предотвращаются или уменьшаются по интенсивности, или частота и/или продолжительность или степень тяжести чувствительности или аллергического ответа по отношению к пыльце березы или ее экстракту или к белку Bet v 1 снижается.

[00124] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, как описано выше, причем композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством, применимым для уменьшения аллергического ответа по отношению к белку Fagales, пыльце березы или ее экстракту или белку Bet v 1. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, как описано выше, причем второе терапевтическое средство выбрано из кортикостероида, бронходилататора, антигистаминного средства, эпинефрина, противозастойного средства, другого отличающегося антитела к Bet v 1 и пептидной вакцины.

[00125] Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению, которые связываются с Bet v 1, могут быть способны снижать, минимизировать или предотвращать по меньшей мере один симптом у пациента, чувствительного к пыльце березы или Bet v 1, такой как чихание, конгестия, заложенность носа, кашель, одышка, бронхоспазм, ринит или конъюнктивит.

[00126] Согласно одному варианту осуществления антитела согласно настоящему изобретению, которые связываются с Bet v 1, или композицию, содержащую одно или несколько антител согласно настоящему изобретению, можно использовать для профилактики более серьезных *in vivo* осложнений, ассоциированных с аллергией на Bet v 1, включая в себя астматические реакции, анафилактический шок или даже смерть в результате анафилаксии.

[00127] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическую композицию вводят пациенту в комбинации со вторым терапевтическим средством.

[00128] Согласно другому варианту осуществления второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из антигистаминного средства, эпинефрина, противозастойного средства, кортикостероида, другого отличающегося антитела к Bet v 1, пептидной вакцины и любой другой паллиативной терапии, применимой для снижения степени тяжести аллергического ответа или для уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с аллергическим ответом.

[00129] Согласно другому варианту осуществления фармацевтическую композицию вводят одновременно, перед или после одного или нескольких других требуемых терапевтических средств или медицинских процедур, включая в себя, например, введение перед или одновременно со схемой аллерген-специфической иммунотерапии (SIT). Согласно некоторым аспектам применение схемы SIT вместе с антителами, предусмотренными в настоящем документе, обеспечивает синергический эффект.

[00130] Согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ усиления эффективности и/или безопасности схемы аллерген-специфической иммунотерапии (SIT), причем способ предусматривает введение эффективного количества одного или нескольких выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, как предусмотрено в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество одного или нескольких выделенных моноклональных антител человека или их фрагментов, нуждающемуся в этом пациенту непосредственно до или одновременно со схемой SIT, причем степень тяжести аллергического ответа на схему SIT уменьшается. Согласно некоторым вариантам осуществления схема SIT содержит фазу введения увеличивающихся доз с последующей поддерживающей фазой. Согласно некоторым вариантам осуществления схема SIT представляет собой схему “молниеносной” (rush) SIT.

[00131] Согласно дополнительному аспекту предусмотрен способ профилактики или снижения дегрануляции тучных клеток, ассоциированной с белком Fagales, родственным Fagales аллергеном, пылью березы или экстрактом пыльцы березы или сенсibilизацией с помощью Bet v 1, причем способ предусматривает введение фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, нуждающемуся в этом пациенту.

[00132] Согласно некоторым вариантам осуществления ВРЕ выбран из группы, состоящей из природного Bet v 1, ВРЕ *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* и ВРЕ *Betula populifolia*.

[00133] Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание фигур

[00134] На фигуре 1 представлено эпитопное картирование на основании обмена H-D/MS для взаимодействия H4H16992P с Bet v 1.

[00135] На фигуре 2 представлено эпитопное картирование на основании обмена H-D/MS для взаимодействия H4H17082P с Bet v 1.

[00136] На фигуре 3 представлено эпитопное картирование на основании обмена H-D/MS для взаимодействия H4H17038P2 с Bet v 1.

[00137] На фигуре 4 представлено эпитопное картирование на основании обмена H-D/MS для взаимодействия H4H16987P с Bet v 1.

[00138] На фигуре 5 представлено эпитопное картирование на основании обмена H-D/MS для взаимодействия H4H16992P, H4H17082P, H4H17038P2 и H4H16987P с Bet v 1.

[00139] На фигуре 6 представлена диаграмма протокола, используемого для определения эффективности комбинаций антител в блокировании дегрануляции тучных клеток, индуцированной Bet v 1, в модели РСА у гуманизированной мыши.

[00140] На фигуре 7 показана способность комбинации антител к Bet v 1 блокировать дегрануляцию тучных клеток в модели РСА у гуманизированной мыши с использованием содержащих IgE сывороток, полученных от трех чувствительных к Bet v 1 доноров.

[00141] На фигуре 8 показаны два графика, причем на первом показаны репрезентативные данные, показывающие комбинации антител к Bet v 1, которые блокируют активацию базофилов в РВМС, полученных от одного донора с аллергией на пыльцу березы. На гистограмме представлены данные, показывающие процент блокирования активации базофилов в РВМС, полученных от нескольких доноров, с помощью комбинаций антител к Bet v 1, по отношению к каждому антителу отдельно.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[00142] Прежде чем будут описаны настоящие композиции и способы, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными композициями и способами, а также экспериментальными условиями, поскольку такие способы, композиции и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[00143] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в настоящей области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемый в настоящем документе термин "приблизительно" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает,

что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, используемое в настоящем документе выражение "приблизительно 100" включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

[00144] Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, можно использовать при практическом применении или испытании настоящего изобретения, ниже описаны предпочтительные способы и материалы.

Определения

[00145] Используемый в настоящем документе термин "Bet v 1" относится по меньшей мере к одному белку Bet v 1, либо в природной/нативной форме, либо полученному рекомбинантным путем. Белок Bet v 1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 306 и последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 305. Природный белок Bet v 1 характеризуется размером, составляющим приблизительно 17 кДа, и существует в виде 7-цепочечного антипараллельного β -листа ($\beta 1$ - $\beta 7$), двух коротких α -спиралей ($\alpha 1$ и $\alpha 2$), соединяющих $\beta 1$ и $\beta 2$, длинной C-концевой α -спирали ($\alpha 3$) и мотива богатой глицином петли между $\beta 2$ и $\beta 3$ (Kofler et al. (2012) *J. Mol. Biol.* 422(1): 109-123). Полученный рекомбинантным путем мутантный Bet v 1, SEQ ID NO: 312, содержит G2-N160 согласно Uniprot P15494 с заменой S85A и содержит Мус-Мус-гексагистидиновую метку. Аминокислотная последовательность Bet v 1 от Uniprot: P15494, т.е. SEQ ID NO: 314, также может относиться к Bet v 1.

[00146] "Bet v 1" представляет собой полипептид, содержащий или, альтернативно, состоящий из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 306 или SEQ ID NO: 314 или гомологичной им последовательности. Используемая в настоящем документе фраза "последовательность, гомологичная последовательности согласно SEQ ID NO: 306 или SEQ ID NO: 314," относится к полипептиду, который характеризуется идентичностью в отношении SEQ ID NO: 306 или SEQ ID NO: 314, которая составляет больше чем 70%, предпочтительно больше чем 80%, более предпочтительно больше чем 90% и даже более предпочтительно больше чем 95%.

[00147] Используемый в настоящем документе термин "фрагмент Bet v 1" относится к полипептиду, содержащему или, альтернативно, состоящему по меньшей мере из одного антигенного сайта Bet v 1. Согласно одному варианту осуществления используемый в настоящем документе термин "фрагмент Bet v 1" относится к полипептиду, содержащему или, альтернативно, состоящему по меньшей мере из двух антигенных сайтов

Bet v 1. Согласно одному варианту осуществления антигенные сайты связаны ковалентно. Согласно одному варианту осуществления антигенные сайты связаны с помощью по меньшей мере одной пептидной связи. Согласно одному варианту осуществления два антигенных сайта связаны с помощью по меньшей мере одной пептидной связи и спейсера между антигенными сайтами. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере два антигенных сайта содержат аминокислотные последовательности 23-44 и 44-56 согласно UniProt P15494. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере два антигенных сайта содержат аминокислотную последовательность в пределах любой из SEQ ID NO: 306, 307, 308, 309, 310, 311 и 315. Согласно одному варианту осуществления любой из фрагментов Bet v 1 способен нидуцировать продукцию антител *in vivo*, которые специфически связываются с встречающимся в природе Bet v 1 или с полученным рекомбинантным путем Bet v 1.

[00148] Используемый в настоящем документе термин "антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащие по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, Bet v 1). Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "антитело" включает в себя молекулы иммуноглобулина, состоящие из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (т.е. "полные молекулы антител"), и, а также их мультимеры (например, IgM) или их антигенсвязывающие фрагменты. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи ("HCVR" или "V_H") и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи ("LCVR или "V_L") и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с областями, которые являются более консервативными, которые называются каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут являться идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественным образом или синтетически модифицированными. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основании параллельного анализа двух или больше CDR.

[00149] Кроме того, возможна замена одного или нескольких остатков CDR или пропуск одной или нескольких CDR. В научной литературе описаны антитела, которые для связывания могут обойтись без одной или двух CDR. Padlan с соавт. (1995 *FASEB J.* 9: 133-139) проанализировали области контакта между антителами и их антигенами, основываясь на опубликованных кристаллических структурах, и пришли к выводу, что только приблизительно одна пятая - одна третья остатков CDR действительно контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил много антител, в которых одна или две CDR не характеризуются наличием аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos *et al.* 2002 *J Mol Biol* 320:415-428).

[00150] Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются) из областей CDR согласно Kabat, лежащих вне CDR согласно Chothia, путем молекулярного моделирования и/или опытным путем. Если CDR или его остаток(остатки) опущен(ы), ее(их), как правило, заменяют аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности антитела человека или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замены также можно выбрать опытным путем. Эмпирические замены могут представлять собой консервативные или неконсервативные замены.

[00151] Полностью человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с *Bet v 1*, как раскрыто в настоящем документе, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, причем одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных областей и/или областей CDR мутированы до соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии, из которой происходит антитело, или до соответствующего(их) остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии человека или до консервативной аминокислотной замены соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности обобщенно в настоящем документе называются "мутации зародышевой линии"). Средний специалист в настоящей

области техники, начиная с последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем документе, может легко получить различные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления все остатки каркасной области и/или области CDR в пределах доменов V_H и/или V_L подвергаются обратной мутации до остатков, встречающихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки подвергаются обратной мутации до исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, встречающиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, встречающиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько остатков каркасной области и/или области CDR подвергаются мутации до соответствующего(их) остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело изначально).

[00152] Более того, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или больше мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, причем определенные индивидуальные остатки мутированы до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, при этом другие определенные остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или подвергаются мутации до соответствующего остатка отличающейся последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко испытать в отношении одного или нескольких требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от конкретной ситуации), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, предусмотрены настоящим изобретением.

[00153] Согласно настоящему изобретению также предусмотрены полностью человеческие моноклональные антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, с одной или несколькими консервативными заменами. Например, согласно настоящему

изобретению предусмотрены антитела с аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе.

[00154] Используемый в настоящем документе термин "антитело человека" включает в себя не встречающиеся в природе антитела человека. Термин включает в себя антитела, которые рекомбинантно получены в организме не являющегося человеком млекопитающего или в клетках не являющегося человеком млекопитающего. Подразумевается, что термин включает в себя антитела, выделенные из организма субъекта-человека или образованные в организме субъекта-человека.

[00155] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой рекомбинантные и/или не встречающиеся в природе антитела человека. Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "рекомбинантное антитело человека" включает в себя все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных способов, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным в отношении генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью любых других средств, которые включают в себя сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Согласно определенным вариантам осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают *in vitro* мутагенезу (или, если используют животное, которое является трансгенным в отношении последовательностей Ig человека, *in vivo* соматическому мутагенезу) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, наряду с тем, что они относятся к последовательностям V_H и V_L зародышевой линии человека, могут не существовать в природе в пределах репертуара антител зародышевой линии человека *in vivo*.

[00156] Антитела человека могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит

стабильный четырехцепочечный конструктор приблизительно 150-160 кДа, в котором димеры удерживаются вместе дисульфидной связью между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны через межцепочечные дисульфидные связи, и образуется молекула, составляющая приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитела). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

[00157] Частота появления второй формы в различных интактных изоформах IgG обусловлена без ограничения структурными различиями, связанными с изоформой шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшить появление второй формы (Angal *et al.*, 1993, *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира IgG1 человека. Настоящее изобретение охватывает антитела, характеризующиеся одной или несколькими мутациями в шарнире, области C_H2 или C_H3, которые могут являться желательными, например, при производстве, для улучшения выхода требуемой формы антитела.

[00158] Используемое в настоящем документе выражение “антигенсвязывающая молекула” означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий по меньшей мере из одной определяющей комплементарности области (CDR), которая отдельно или в комбинации с одной или несколькими дополнительными CDR и/или каркасными областями (FR), специфически связывается с конкретным антигеном. Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела, как эти термины определены в другом месте в настоящем документе.

[00159] Фраза “специфически связывает” или “специфически связывается с” или тому подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным при физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации, равной по меньшей мере приблизительно 1×10^{-6} М или меньше (например, меньшее значение K_D обозначает более плотное связывание). Способы определения того, являются ли две молекулы специфически связывающимися, хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Как описано в настоящем документе, антитела, которые специфически связываются с Vet v 1, были идентифицированы с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™.

[00160] Фраза “высокоаффинное” антитело относится к тем моноклональным антителам, которые характеризуются аффинностью связывания с Bet v 1, выраженной как K_D , составляющей по меньшей мере, 10^{-8} М; предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М, еще более предпочтительно 10^{-12} М, как измерено поверхностным плазмонным резонансом, например, BIACORE™ или анализом аффинности в растворе методом ELISA.

[00161] Под термином “медленная скорость диссоциации”, “Koff” или “kd” подразумевается антитело, которое диссоциирует от Bet v 1 с константой скорости, составляющей $1 \times 10^{-3} \cdot \text{с}^{-1}$ или менее, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \cdot \text{с}^{-1}$ или менее, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™.

[00162] Используемые в настоящем документе термины “антигенсвязывающая часть” антитела, “антигенсвязывающий фрагмент” антитела и тому подобное включают в себя любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины “антигенсвязывающий фрагмент” антитела или “фрагмент антитела” относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с Bet v 1.

[00163] Согласно конкретным вариантам осуществления антитело или фрагменты антитела согласно настоящему изобретению могут являться конъюгированными с терапевтическим фрагментом (“иммуноконъюгат”), таким как кортикостероид, второе антитело к Bet v 1 или эпинефрин, вакцина или любой другой терапевтический компонент, применимый для лечения аллергического ответа на Bet v 1.

[00164] Антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой выделенные антитела. Используемый в настоящем документе термин “выделенное антитело” означает антитело, которое идентифицировали и отделили и/или извлекли по меньшей мере из одного компонента его природного окружения. Например, антитело, которое отделили или удалили по меньшей мере из одного компонента организма или из ткани или клетки, в которых антитело существует в природе или производится в природе, представляет собой “выделенное антитело” для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает в себя антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, подвергнутые по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело может по существу не содержать другой клеточный материал и/или химические соединения.

[00165] Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело может по существу не содержать других антител (Ab), характеризующихся другими антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с Bet v 1 или его фрагментом, по существу не содержит антитела, которые специфически связываются с антигенами, отличными от антигенов Fagales или, согласно некоторым аспектам, отличными от Bet v 1.

[00166] Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин “блокирующее антитело” или “нейтрализующее антитело” (или “антитело, которое нейтрализует активность Bet v 1”) обозначает антитело или его антигенсвязывающую часть, связывание которых с Bet v 1 приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической активности Bet v 1. Например, антитело согласно настоящему изобретению может помочь в предотвращении первичного аллергического ответа на Bet v 1. Альтернативно, антитело согласно настоящему изобретению может демонстрировать способность предотвратить вторичный аллергический ответ на Bet v 1 или по меньшей мере один симптом аллергического ответа на Bet v 1, включая в себя чихание, кашель, астматическое состояние или анафилактическую реакцию, вызванные Bet v 1. Это ингибирование биологической активности Bet v 1 можно оценить путем измерения одного или нескольких показателей биологической активности Bet v 1 с помощью одного или нескольких стандартных анализов *in vitro* или *in vivo* (таких как анализ пассивной кожной анафилаксии, как описано в настоящем документе) или других анализов *in vivo*, известных в настоящей области техники (например, другие модели на животных для оценки защиты от стимуляции с помощью Bet v 1 после введения одного или нескольких антител, описанных в настоящем документе).

[00167] Используемый в настоящем документе термин “поверхностный плазмонный резонанс” относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать биомолекулярные взаимодействия в режиме реального времени путем обнаружения изменений концентраций белка в пределах матрицы биосенсора, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Упсала, Швеция и Пискатауэй, Нью-Джерси).

[00168] Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин “K_D” относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

[00169] Термин “эпитоп” относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания с антигеном в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Отдельный антиген может содержать

больше одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут характеризоваться различными биологическими эффектами. Термин “эпитоп” также относится к сайту на антигене, на который отвечают В и/или Т-клетки. Это также относится к области антигена, которая связана антителом. Эпитопы могут являться либо линейными, либо конформационными. Линейный эпитоп образован смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. Конформационный эпитоп образован пространственно смежными аминокислотами из различных сегментов неразветвленной полипептидной цепи. Согласно определенным вариантам осуществления эпитопы могут включать в себя детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахара, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, согласно определенным вариантам осуществления, могут характеризоваться специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими характеристиками заряда. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, являются подклассом структурных эпитопов и содержат те остатки, которые непосредственно вносят вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы, образованные из расположенных рядом аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные за счет сворачивания в третичную структуру, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает в себя по меньшей мере 3, а более обычно по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

[00170] Термин “существенная идентичность” или “по существу идентичный”, когда он относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или цепью, комплементарной ей) существует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере приблизительно в 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого известного алгоритма измерения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, характеризующаяся существенной идентичностью по отношению к эталонной молекуле нуклеиновой кислоты, может в определенных случаях кодировать полипептид, характеризующийся такой же или по существу сходной аминокислотной

последовательностью, как и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

[00171] Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу сходные" означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за введение пропусков по умолчанию, характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, даже более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислота замена по существу не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, где две или больше аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, идентичность последовательностей в процентах или степень сходства в процентах можно скорректировать в сторону увеличения, чтобы скорректировать консервативную природу замены. Средства для осуществления этой регулировки хорошо известны специалистам в настоящей области техники. (См., например, Pearson, 1994, *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331). Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают в себя (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются следующие: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992, *Science* 256: 1443-1445). "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в логарифмической матрице правдоподобия PAM250.

[00172] Сходство последовательностей для полипептидов, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей.

Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности с использованием показателей сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая в себя консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близко родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнить с использованием FASTA, программы в GCG версии 6.1, с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и идентичность последовательностей в процентах областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностями поиска (Pearson, 2000, ранее). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. (См., например, Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и 1997 *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402)

[00173] Под фразой “терапевтически эффективное количество” подразумевается количество, которое обеспечивает тот требуемый эффект, для которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет определяться специалистом в настоящей области техники с использованием известных техник (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[00174] Антитела согласно настоящему изобретению можно использовать для “десенсибилизации” индивидуума с аллергией на Fagales. Термин “десенсибилизировать” определяют в настоящем документе как уменьшение аллергической реактивности индивидуума с аллергией на Fagales на воздействие аллергена Fagales, такого как пыльца березы, например, Bet v 1, Aln g1, Cor a1, Car b1, Que a1, Api g2, Api g1, Dau c1, Mal d1, Ost c1, Fag s1 и/или Cas s1 (до уровня, меньшего, чем тот, который в противном случае испытывал бы индивидуум с аллергией на Fagales), или родственного Fagales аллергена. Термин “десенсибилизировать” дополнительно определяют в настоящем документе как уменьшение аллергической реактивности индивидуума по отношению к белкам PR-10, включая в себя Act c 8 и Act d 8 (киви), Ara h 8 (арахис), Pru ar 1 (абрикос), Pru av 1 (вишня),

Pru p 1 (персик), Pyc s 1 (груша), Gly m 4 (соя), Vig r 1 (золотистая фасоль), Sola I 4 (помидор), Cuc m 3 (дыня), Rub i 1 (малина), и Fra a 1 (клубника).

Общее описание

[00175] Деревья, принадлежащие к порядку Fagales, являются источником симптомов весенней аллергии, и основной аллерген березы, Bet v 1, отвечает за связывание IgE более чем у 95% пациентов с аллергией на пыльцу березы (Breiteneder, EMBO J. 1989, 8(7):1935-8). Береза является преобладающей причиной возникновения аллергии у 23% пациентов с аллергией в США и 14% пациентов с аллергией в Европе. (Отчет DataMonitor report on Allergic Rhinitis, июль 2010 г.). Степень тяжести симптомов у людей, которые демонстрируют чувствительность к пыльце березы, варьируется от относительно легкого ринита и конъюнктивита до потенциально опасного для жизни астматического состояния. Было показано, что у более 60% пациентов, страдающих аллергией на пыльцу березы, присутствуют IgE-антитела к этому Bet v 1 (Jarolim et al., Int Arch Allergy Appl Immunol. 1989, 88(1-2):180-2).

[00176] Деревья Fagales демонстрируют четкое географическое распределение, где береза и ольха являются эндемичными в северных частях Европы и Северной Америки, в то время как лещина, граб и дуб предпочитают более теплый климат, таким образом заселяя скорее южные части этих континентов. Совместные популяции всех пяти видов часто встречаются в зонах умеренного климата (Spieksma FTM. Regional European pollen calendars. D'Amato G, Spieksma FTM, Bonini S, ред. Allergenic pollen and pollinosis in Europe. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 1991. pp. 49–65). Несколько деревьев Betulaceae, в том числе ольха, лещина и граб, способны инициировать сенсибилизацию к аллергенам, подобным Bet v 1, у восприимчивых людей, что приводит к выработке в высокой степени перекрестно-реактивных IgE-антител. (Hauser, et al., 2011, Clin Exp Allergy. 41: 1804–14).

[00177] Аллергены порядка Fagales или аллергены Fagales, как определено в настоящем документе, включают в себя пыльцу березы (Bet v 1), пыльцу ольхи (Aln g1 и Aln g4), пыльцу лещины (Cor a1, Cor a2, Cor a8, Cor a9, Cor a10, Cor a11, Cor a12, Cor a13 и Cor a14), пыльцу граба (Car b1), пыльцу хмелеграба (Ost c1), пыльцу каштана (Cas s1, Cas s5, Cas s8 и Cas s9), пыльцу бука (Fag s1) и пыльцу белого дуба (Que a1 и Que a2). Из аллергенов, не являющихся аллергенами березовой пыльцы, Aln g1, Cor a1, Car b1, Ost c1, Cas s1, Fag s1 и Que a1 являются подобными или родственными Bet v 1, т.е. представляют собой родственные Fagales аллергены. Эти аллергены также экспрессируются в орехах деревьев Fagales и в плодах неродственных деревьев, принадлежащих к порядку Rosales.

Перекрестная реактивность этих аллергенов может вызвать симптомы пищевой аллергии у пациентов с аллергией на пыльцу. Типичные перекрестно-реактивные формы пищевой аллергии включают в себя аллергию на яблоки, вишню, абрикос, грушу, люцерну, горох, сою, помидоры, сельдерей, морковь и спаржу. (Allergens and Allergen Immunotherapy: Subcutaneous, Sublingual, and Oral, 5-е изд. Richard F. Lockey, Dennis K. Ledford, редакторы. CRC Press, Taylor & Francis Group, London, NY, 2014. pp. 114, 118-119).

[00178] Используемая в настоящем документе фраза “аллерген Fagales” включает в себя родственные Fagales аллергены. Согласно некоторым вариантам осуществления “родственный аллерген Fagales” определяют как белок, характеризующийся общей гомологией последовательности с Bet v 1, составляющей по меньшей мере приблизительно 35%, или гомологией последовательности с эпитопом 1 Bet v 1, составляющей по меньшей мере приблизительно 50%, или гомологией последовательности с эпитопом 2 Bet v 1, составляющей по меньшей мере приблизительно 40%, или гомологией последовательности с эпитопом 3 Bet v 1, составляющей по меньшей мере приблизительно 25%, или гомологией последовательности с эпитопом 4 Bet v 1, составляющей по меньшей мере приблизительно 15%. Согласно некоторым вариантам осуществления “родственный аллерген Fagales” определяют как белок, с которым перекрестно реагируют антитела к Bet v 1, включая в себя аллергены из порядка Rosales.

[00179] Иммуноглобулин E (IgE) отвечает за гиперчувствительность 1 типа, которая проявляется в аллергическом рините, аллергическом конъюнктивите, сенной лихорадке, аллергической бронхиальной астме, аллергии на пчелиный яд и аллергии на пищевые продукты. IgE циркулирует в крови и связывается с высокоаффинными Fc-рецепторами для IgE на базофилах и тучных клетках. При большинстве аллергических ответов аллергены попадают в организм при вдыхании, проглатывании или через кожу. Затем аллерген связывается с предварительно образованным IgE, уже связанным с высокоаффинным рецептором на поверхностях тучных клеток и базофилов, что приводит к перекрестному сшиванию нескольких молекул IgE и запуску высвобождения гистамина и других медиаторов воспаления, вызывающих различные аллергические симптомы.

[00180] Лечение аллергии на пыльцу березы включает в себя десенсибилизирующую терапию, которая включает в себя повторные инъекции с увеличением дозировки либо неочищенного экстракта пыльцы березы, либо коротких пептидов, полученных из Bet v 1. Недостатки аллерген-специфической иммунотерапии включают в себя длительную продолжительность лечения, что приводит к проблемам с соблюдением пациентом схемы лечения и частым аллергическим ответами (до 30%) на вводимый белок. Десенсибилизирующая терапия может занять несколько лет, прежде чем

лечение считается эффективным. Успешное лечение зависит от состава и качества экстракта, и лечение противопоказано пациентам с тяжелой бронхиальной астмой/пищевой аллергией из-за риска тяжелых неблагоприятных эффектов, опосредованных IgE. Соответственно, в области лечения аллергии на пыльцу березы существует потребность в альтернативных стратегиях лечения пациентов, чувствительных к аллергенам Fagales, в частности Bet v 1.

[00181] Антитела были предложены в качестве общей стратегии лечения аллергий, поскольку они могут блокировать проникновение молекул аллергенов в ткани слизистой оболочки или могут связывать аллерген до того, как он сможет связываться с IgE, связанным с высокоаффинным рецептором на тучных клетках или базофилах, таким образом предотвращая высвобождение гистамина и других медиаторов воспаления из этих клеток. В патенте США № 5670626 описано применение моноклональных антител для лечения IgE-опосредованных аллергических заболеваний, таких как аллергический ринит, аллергическая бронхиальная астма и аллергический конъюнктивит, путем блокирования связывания аллергенов с тканью слизистой оболочки. В патенте США № 6849259 описано применение аллерген-специфических антител для ингибирования аллергического воспаления на *in vivo* модели аллергии у мышей. Описаны системы антител на основе молока и яиц. Например, в US20030003133A1 раскрыто использование молока в качестве носителя для аллергенов для индукции оральной толерантности к пыльце березы и другим аллергенам. Композиции и способы снижения аллергического ответа у животного на аллерген в окружающей среде путем использования молекулы, которая ингибирует способность аллергена связываться с тучными клетками, были описаны в международной патентной публикации WO1994/024164A2. Другие антитела к Bet v 1 были упомянуты в патентном документе США № 2010/0034812.

[00182] Полностью человеческие антитела, описанные в настоящем документе, демонстрируют специфическое связывание с Bet v 1 и могут являться применимыми для лечения пациентов, страдающих аллергией на пыльцу березы, в частности, у пациентов, которые демонстрируют чувствительность к аллергену Bet v 1. Применение таких антител может являться эффективным средством лечения пациентов, страдающих аллергией на пыльцу деревьев Fagales, или их можно использовать для предотвращения повышенного ответа на Bet v 1 при вторичном воздействии или сопутствующих симптомов, связанных с аллергией, или можно использовать для уменьшения степени тяжести и/или продолжительности аллергического ответа, связанного с первичным воздействием аллергена пыльцы березы или с рецидивом симптомов при вторичном воздействии. Их можно использовать отдельно или в качестве вспомогательной

терапии с другими терапевтическими компонентами или способами, известными в настоящей области техники, для лечения таких аллергий, такими как без ограничения лечение с помощью кортикостероидов или эпинефрина. Их можно использовать в сочетании со вторым или третьим отличающимся антителом, специфическим в отношении Bet v 1. Их можно использовать с аллерген-специфической иммунотерапией (SIT). Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация с SIT в результате является синергически эффективной.

[00183] В отличие от десенсибилизирующей терапии лечение с помощью антител, описанных в настоящем документе, может обеспечить эффективное облегчение в течение приблизительно 2 недель после начала лечения или в течение приблизительно 10 дней или приблизительно 8 дней после начала лечения. В комбинации с воздействием белка или пептидов Bet v 1 или одного или нескольких дополнительных аллергенов Fagales, лечение с помощью полностью человеческих антител, описанных в настоящем документе, может не только блокировать аллергический ответ, но может более эффективно или синергически снижать чувствительность пациентов, страдающих аллергией на пыльцу деревьев Fagales.

[00184] Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению получают из организма мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как природный Bet v 1, который можно приобрести коммерческим путем (например, у Indoor Biotechnologies, VA, № по кат. NA-BV1-1) или можно получить рекомбинантным способом. Полноразмерная аминокислотная последовательность Bet v 1 показана как SEQ ID NO: 306. Полноразмерную аминокислотную последовательность Bet v 1 также можно найти в SEQ ID NO: 314 от Uniprot: P15494.

[00185] Иммуноген может представлять собой биологически активный и/или иммуногенный фрагмент природного, нативного или полученного рекомбинантным способом Bet v 1 или ДНК, кодирующую его активный фрагмент. Фрагмент может быть получен или из N-конца, или из C-конца Bet v 1 или из любого сайта в аминокислотной последовательности Bet v 1.

Антигенсвязывающие фрагменты антител

[00186] Если специально не указано иное, используемый в настоящем документе термин "антитело" следует понимать как включающий в себя молекулы антител, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т.е. "полные молекулы антитела"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела,

"антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное включают в себя любой встречающийся в природе, полученный ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с $\text{Vet } \nu 1$. Фрагмент антитела может включать в себя фрагмент Fab, фрагмент $F(ab')_2$, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из полных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных техник, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные техники генной инженерии, предусматривающие манипуляции с ДНК и экспрессию ДНК, кодирующую переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая в себя, например, фаговые библиотеки антител), или же ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и воздействовать на нее химически или с использованием техник молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

[00187] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя следующее: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты $F(ab')_2$; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие звенья, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, наноантитела (например моновалентные наноантитела, бивалентные наноантитела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в объем используемое в настоящем документе выражения "антигенсвязывающий фрагмент".

[00188] Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может

характеризоваться любым размером или аминокислотным составом и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая является смежной или расположена в одной рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен V_H , ассоциированный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может являться димерной и может содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[00189] Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие, иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые можно обнаружить в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению, включают в себя следующее: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая в себя любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, что дает в результате гибкое или полугибкое соединение между смежными переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей))

Получение антител человека

[00190] Способы получения антител человека в трансгенных мышах известны в настоящей области техники. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения антител человека, которые специфически связываются с $Bet\ v\ 1$.

[00191] При использовании технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, патент США № 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа для создания моноклональных антитела вначале выделяют высокоаффинные химерные антитела к $\text{V}\beta 1$ с варибельной областью человека и константной областью мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает в себя создание трансгенной мыши с геномом, содержащим варибельные области тяжелой и легкой цепей человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что мышь вырабатывает антитело, содержащее варибельную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую варибельные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепей человека. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

[00192] Как правило, мышь VELOCIMMUNE® сенсibiliзируют представляющим интерес антигеном, и лимфатические клетки (такие как В-клетки) извлекают из организма мышей, которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки могут сливать с линией клеток миеломы для получения иммортализованных гибридных клеточных линий, и такие гибридные клеточные линии подвергают скринингу и отбирают для идентификации гибридных клеточных линий, которые продуцируют антитела, специфические в отношении представляющего интерес антигена. ДНК, кодирующую варибельные области тяжелой цепи и легкой цепей, можно выделить и связать с требуемыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепей. Такой белок антитела может продуцироваться в клетке, такой как клетка СНО. Альтернативно, ДНК, кодирующую антигенспецифические химерные антитела или варибельные домены легкой и тяжелой цепей, можно выделить непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

[00193] Сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела с варибельной областью человека и константной областью мыши. Как и в разделе экспериментов ниже, определяют характеристики антител и выбирают антитела в отношении требуемых характеристик, включая в себя аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Константные области мыши заменяют требуемой константной областью человека, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированным IgG1 или IgG4 для создания полностью человеческого антитела согласно настоящему изобретению. В то время как выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного

применения, характеристики высокой аффинности связывания антигена и целевой специфичности находятся в варибельной области.

[00194] Как правило, антитела согласно настоящему изобретению обладают очень высокими аффинностями, как правило, с K_D от приблизительно 10^{-12} до приблизительно 10^{-9} М при измерении по связыванию с антигеном, либо иммобилизованным на твердой фазе, либо в жидкой фазе. Константные области мыши заменяют требуемыми константными областями человека для создания полностью человеческих антител согласно настоящему изобретению. В то время как выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокоаффинного связывания с антигеном и характеристики специфичности по отношению к мишени находятся в варибельной области.

Биоэквиваленты

[00195] Антитела к Vet v 1 и фрагменты антител согласно настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от аминокислотных последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связываться с Vet v 1. Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одну или несколько вставок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая является по существу эквивалентной активности описанных антител. Аналогично, кодирующие антитело последовательности ДНК согласно настоящему изобретению охватывают последовательности, которые содержат одну или несколько вставок, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые являются по существу биоэквивалентом по отношению к антителу или фрагменту антитела согласно настоящему изобретению.

[00196] Два антигенсвязывающих белка или антитела, считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень абсорбции которых не показывают значительного различия при введении в одной и той же молярной дозе в аналогичных условиях эксперимента, либо в виде одной дозы, либо в виде нескольких доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все же их можно считать биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены на этикетке, не имеют

существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при постоянном применении, и считаются с медицинской точки зрения незначительными для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

[00197] Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте и эффективности.

[00198] Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или несколько раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включая в себя клинически значимое изменение иммуногенности или пониженную эффективность, по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

[00199] Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если оба они действуют посредством общего механизма или механизмов действия для условия или условий использования, в той степени, в которой такие механизмы являются известными.

[00200] Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают в себя, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию времени; (b) тест *in vitro*, который коррелировал с данными о биодоступности *in vivo* у человека и является обоснованно прогностическим в отношении этих данных; (c) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют как функцию времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое испытание, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела

[00201] Биоэквивалентные варианты антител согласно настоящему изобретению можно сконструировать, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно удалить или заменить другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антител, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют

характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Биологические характеристики антител

[00202] Как правило, антитела согласно настоящему изобретению могут функционировать путем связывания с Bet v 1, фрагментом Bet v 1 или с Bet v 1 и одним или несколькими аллергенами Fagales или аллергенами, родственными Fagales.

[00203] Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут связываться с эпитопом или фрагментом, расположенным в пределах белка Bet v 1, например, эпитопом или фрагментом, охватывающим аминокислотные остатки, находящиеся в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 43 согласно SEQ ID NO: 306; эпитопом или фрагментом, охватывающим аминокислотные остатки, находящиеся в диапазоне от приблизительно положения 44 до приблизительно 56 согласно SEQ ID NO: 306; эпитопом или фрагментом, охватывающим аминокислотные остатки, находящиеся в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 19 согласно SEQ ID NO: 306; эпитопом или фрагментом, охватывающим аминокислотные остатки, находящиеся в диапазоне от приблизительно 57 до приблизительно 70 согласно SEQ ID NO: 306; или эпитопом или фрагментом, охватывающим аминокислотные остатки, находящиеся в диапазоне от приблизительно 81 до приблизительно 89 или приблизительно 81 до приблизительно 96 согласно SEQ ID NO: 306. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут связываться по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, 311 и 315, причем последовательность эпитопа можно удлинить на 1-5 аминокислот или приблизительно 5 - приблизительно 10 аминокислот либо на C-конце, либо на N-конце.

[00204] Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут функционировать путем блокирования или ингибирования связывания IgE с тучными клетками или базофилами у пациента, чувствительного к аллергену Bet v 1. Согласно определенным вариантам осуществления предусмотренные в настоящем документе антитела ингибируют или блокируют активацию базофилов, например, по меньшей мере приблизительно на 70%, по сравнению с антителом изотипического контроля. Согласно определенным вариантам осуществления антитела ингибируют или блокируют дегрануляцию тучных клеток, например, по меньшей мере на приблизительно 70%, или по меньшей мере на приблизительно 75%, или по меньшей мере на приблизительно 80%, или по меньшей мере на приблизительно 85%, или по меньшей мере

мере на приблизительно 90%, или по меньшей мере на приблизительно 95%, по сравнению с антителом изотипического контроля.

[00205] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к полностью человеческому моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с $\text{Vet } \nu 1$, причем антитело или его фрагмент проявляет одну или несколько следующих характеристик: (i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282 и 290, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266 и 298, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 288 и 296, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272 и 304, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iv) содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 284 и 292, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 286 и 294, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:

12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268 и 300, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270 и 302, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (v) связывается с Bet v 1 с K_D , равной или составляющей меньше чем 10^{-8} или находящейся в диапазоне от приблизительно 10^{-8} до приблизительно 10^{-11} ; (vi) демонстрирует эффективность по меньшей мере в одной модели анафилаксии или воспаления на животных; или (vii) конкурирует с эталонным антителом за связывание с Bet v 1.

[00206] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению комбинации двух или более полностью человеческих антител согласно настоящему изобретению или их фрагментов для получения композиции, причем антитела связываются с Bet v 1, и причем каждое антитело или его фрагмент, содержащиеся в композиции, проявляют одну или несколько следующих характеристик: (i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282 и 290, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266 и 298, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 288 и 296, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272 и 304, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iv) содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 284 и 292, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 286 и 294, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268 и 300, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270 и 302, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (v) связывается с Bet v 1 с K_D , равной или составляющей меньше чем 10^{-8} или находящейся в диапазоне от приблизительно 10^{-8} до приблизительно 10^{-11} ; (vi) демонстрирует эффективность по меньшей мере в одной модели анафилактики или воспаления на животных; или (vii) конкурирует с эталонным антителом за связывание с Bet v 1.

[00207] Определенные антитела к Bet v 1 согласно настоящему изобретению при использовании их отдельно или в комбинации способны связываться и нейтрализовать по меньшей мере один биологический эффект Bet v 1, как определено в анализах *in vitro* или *in vivo*. Способность антител согласно настоящему изобретению связываться и нейтрализовать активность Bet v 1 можно измерить с использованием любого стандартного способа, известного специалистам в настоящей области техники, включая в себя анализы связывания или анализы нейтрализации активности (например, защита от анафилактики), как описано в настоящем документе.

[00208] Неограничивающие иллюстративные анализы *in vitro* для измерения активности связывания проиллюстрированы в примере 3 в настоящем документе. В

примере 3 аффинности связывания и кинетические константы антител человека к Bet v 1 определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

[00209] Белки или пептиды Bet v 1 можно модифицировать для включения в них вставки или замены определенных остатков для мечения или в целях конъюгации с молекулами-носителями, такими как KLH. Например, цистеин можно добавить либо на N-конце, либо на C-конце пептида, либо можно добавить линкерную последовательность для получения пептида для конъюгации, например, с KLH для иммунизации. Антитела, специфические по отношению к Bet v 1, могут не содержать дополнительные метки или фрагменты, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. Согласно одному варианту осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания местоположение метки (если таковая присутствует) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан этот пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован так, что C-концевая часть пептида будет дистальной по отношению к поверхности.

Картирование эпитопов и родственные технологии

[00210] Используемый в настоящем документе термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания с антигеном в варибельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Отдельный антиген может содержать больше одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут характеризоваться различными биологическими эффектами. Эпитопы могут являться либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп образован пространственно смежными аминокислотами из различных сегментов неразветвленной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образован смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных случаях эпитоп может включать в себя фрагменты сахаридов, фосфорилированные группы или сульфонильные группы на антигене.

[00211] В настоящем документе предусмотрены антитела к Bet v 1, которые взаимодействуют с одним или несколькими аминокислотами, обнаруженными в пределах молекулы Bet v 1, включая в себя, например, любой фрагмент Bet v 1, показанный в SEQ ID NO: 306, или в пределах сопоставимых областей полученного рекомбинантным способом белка Bet v 1. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в пределах молекулы Bet

включают в себя по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, 311 и 315, причем такую последовательность можно удлинить на приблизительно 1 - приблизительно 5 аминокислот или приблизительно 5 - приблизительно 10 аминокислот, либо на С-конце, либо на N-конце. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в пределах молекулы Bet v 1 (например, конформационный эпитоп).

[00212] Различные техники, известные средним специалистам в настоящей области техники, можно использовать для определения того, “взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами” в пределах полипептида или белка. Иллюстративные техники включают в себя, например, рутинные анализы перекрестного блокирования, такие как анализы, описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY). Другие способы включают в себя анализ с помощью аланин-сканирующего мутагенеза, пептидный блоттинг (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и анализ ЯМР. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопов, экстракция эпитопов и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который можно применять для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, обнаруживаемый посредством масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водородно-дейтериевого обмена предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок-антитело переносят в воду и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом антитела, подвергаются обратному обмену дейтерия на водород с более медленной скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью границы раздела. В результате аминокислоты, которые образуют часть границы раздела белок/антитело, могут сохранять дейтерий и, следовательно, проявлять относительно большую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в границу раздела. После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, таким образом выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Рентгеноструктурный анализ комплекса антитела с антигеном также можно использовать в целях картирования эпитопов.

[00213] Анализ профиля на основе модификаций (MAP - от англ. "Modification-Assisted Profiling))), также известный как анализ профиля антител на основе структуры антигенов (ASAP - от англ. "Antigen Structure-based Antibody Profiling))), представляет собой способ распределения по категориям больших количеств моноклональных антител, направленных против одного и того же антигена, в соответствии со сходствами профиля связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигена (US 2004/0101920). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, либо явно отличающийся от эпитопа, представленного другой категорией, либо частично перекрывающийся с ним. Эта технология позволяет быстро отфильтровать генетически идентичные антитела, так что определение характеристик может быть сосредоточено на генетически отличных антителах. В случае использования для скрининга гибридом MAP может облегчать идентификацию редких гибридомных клонов, которые продуцируют моноклональные антитела с требуемыми характеристиками. MAP можно использовать для сортировки антител согласно настоящему изобретению по группам антител, связывающихся с различными эпитопами.

[00214] Согласно определенным вариантам осуществления антитела к Bet v 1 или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом в пределах Bet v 1, в природной или нативной форме, как проиллюстрировано в SEQ ID NO: 306 или SEQ ID NO: 314 (аминокислотная последовательность Bet v 1 из Uniprot: P15494), или полученного рекомбинантным способом белка или с их фрагментом. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению, как показано в таблице 1, взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 44 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 43 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 38 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 23 до приблизительно положения 41 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 26 до приблизительно положения 43 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 29 до приблизительно положения 43 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 44 до приблизительно положения 70 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 44 до

приблизительно положения 56 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 45 до приблизительно положения 56 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 2 до приблизительно положения 19 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 5 до приблизительно положения 10 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 5 до приблизительно положения 19 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 8 до приблизительно положения 19 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 11 до приблизительно положения 19 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 57 до приблизительно положения 70 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 57 до приблизительно положения 66 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 81 до приблизительно положения 96 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 84 до приблизительно положения 96 согласно SEQ ID NO: 306; аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 85 до приблизительно положения 96 согласно SEQ ID NO: 306; и аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 81 до приблизительно положения 89 согласно SEQ ID NO: 306. Указанные области дополнительно проиллюстрированы в SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, 311 и 315.

[00215] Настоящее изобретение также относится к антителам к Bet v 1, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе в таблице 1, или антитело с последовательностями CDR любого из иллюстративных антител, описанных в таблице 1. Аналогично, настоящее изобретение также относится к антителам к Bet v 1, которые конкурируют за связывание с Bet v 1 или фрагментом Bet v 1 с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе в таблице 1, или антителом с последовательностями CDR любого из иллюстративных антител, описанных в таблице 1.

[00216] Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к Bet v 1, или конкурирует за связывание с ним, с использованием рутинных способов, известных в настоящей области техники. Например, для определения того, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к Bet v 1 согласно настоящему изобретению, эталонному антителу позволяют связываться с

белком или пептидом Bet v 1 в насыщающих условиях. Затем оценивают способность исследуемого антитела связываться с молекулой Bet v 1. Если исследуемое антитело способно связываться с Bet v 1 после насыщающего связывания с эталонным антителом к Bet v 1, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с другим эпитопом по сравнению с эталонным антителом к Bet v 1. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с молекулой Bet v 1 после насыщающего связывания с эталонным антителом к Bet v 1, тогда исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным антителом к Bet v 1 антитело согласно настоящему изобретению.

[00217] Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом к Bet v 1, описанную выше методологию связывания выполняют в двух ориентациях: в первой ориентации эталонному антителу позволяют связываться с молекулой Bet v 1 в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой Bet v 1. Во второй ориентации исследуемому антителу позволяют связываться с молекулой Bet v 1 в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой Bet v 1. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой Bet v 1, то делают вывод, что исследуемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с Bet v 1. Специалисту в настоящей области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, может необязательно связываться с таким же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

[00218] Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. Иными словами, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990 50:1495-1502). Альтернативно, два антитела характеризуются одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антитела характеризуются перекрывающимися эпитопами, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

[00219] Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, пептидные мутации и анализы связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела связано со связыванием с тем же эпитопом, что и у эталонного антитела, или же стерическое блокирование (или другое явление) является причиной отсутствия наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода можно выполнить с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в настоящей области техники.

Иммуноконъюгаты

[00220] Настоящее изобретение включает в себя человеческое моноклональное антитело к Bet v 1, конъюгированное с терапевтическим фрагментом (“иммуноконъюгат”), таким как средство, способное снижать тяжесть аллергического ответа на аллерген Bet v 1, или в окружающей среде, в которой присутствуют деревья Fagales, или уменьшать интенсивность по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с воздействием пыльцы березы или аллергена Bet v 1, включая в себя ринит, конъюнктивит или затруднение дыхания или их тяжесть. Такое средство может представлять собой кортикостероид, второе отличающееся антитело к Bet v 1 или вакцину. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к Bet v 1, будет учитывать состояние, подлежащее лечению, и требуемый терапевтический эффект, который должен быть достигнут. В качестве альтернативы, если требуемый терапевтический эффект заключается в лечении осложнений или симптомов, ассоциированных с воздействием аллергена Bet v 1, или любого другого состояния, возникающего в результате такого воздействия, такого как без ограничения ринит или конъюнктивит, предпочтительным может являться конъюгирование средства, подходящего для лечения последствий или симптомов состояния или для ослабления любых побочных эффектов антител согласно настоящему изобретению. Примеры подходящих средств для образования иммуноконъюгатов известны в настоящей области техники, см., например, международную патентную публикацию WO 05/103081.

Терапевтическое введение и составы

[00221] Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим антитела к Bet v 1 или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению. Введение терапевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением будут осуществлять подходящим путем, включая в себя без

ограничения внутривенно, подкожно, внутримышечно, интраназально, с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые включены в составы для обеспечения улучшенной транспортировки, доставки, переносимости и тому подобного. Множество приемлемых составов можно найти в рецептурном справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[00222] Доза антитела может варьироваться в зависимости от возраста и размеров пациента, которому вводят дозу, целевого заболевания, состояний, пути введения и тому подобного. Когда антитело согласно настоящему изобретению используют для лечения ринита или конъюнктивита, ассоциированных с воздействием пыльцы с дерева Fagales, или пыльцы березы, или Bet v 1, у индивидуума с чувствительностью к Bet v 1, или для предотвращения анафилактической реакции на аллерген Fagales или для уменьшения тяжести аллергического ответа целесообразно внутривенно вводить антитело согласно настоящему изобретению, как правило, в однократной дозе, составляющей приблизительно 0,01 - приблизительно 30 мг/кг массы тела, более предпочтительно приблизительно 0,02 - приблизительно 7, приблизительно 0,03 - приблизительно 5 или приблизительно 0,05 - приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частоту и продолжительность лечения можно скорректировать. Согласно определенным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно вводить в виде начальной дозы, составляющей по меньшей мере приблизительно 0,1 мг - приблизительно 800 мг, приблизительно 1 - приблизительно 500 мг, приблизительно 5 - приблизительно 300 мг или приблизительно 10 - приблизительно 200 мг, до приблизительно 100 мг или до приблизительно 50 мг. Согласно определенным вариантам осуществления за начальной дозой может следовать введение второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может являться приблизительно таким же или меньшим, чем количество начальной дозы, причем интервал между последующими дозами составляет по меньшей мере 1 день - 3 дня; по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей

мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель; или по меньшей мере 14 недель.

[00223] Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu *et al.* (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают в себя без ограничения интрадермальный, трансдермальный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, через слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может являться системным или местным.

[00224] Фармацевтическую композицию можно доставлять в везикуле, в частности липосоме (см., например, Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533).

[00225] В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе контролируемого высвобождения. Согласно одному варианту осуществления можно использовать насос. Согласно другому варианту осуществления можно использовать полимерные материалы. Согласно еще одному варианту осуществления систему контролируемого высвобождения можно поместить в непосредственной близости от мишени композиции, таким образом, понадобится лишь доля системной дозы.

[00226] Инъекционные препараты могут включать в себя лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты можно получить общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты можно получить, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования описанного выше антигена или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существует, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество

[например, полисорбат 80, НСО-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученной таким образом инъекцией предпочтительно заполняют соответствующую ампулу.

[00227] Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки, устройство доставки шприц-ручка легко находит применение при доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Такое устройство доставки шприц-ручка может являться многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве доставки шприц-ручка, как правило, используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только вся фармацевтическая композиция в картридже была введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. После этого устройство доставки шприц-ручку можно повторно использовать. В одноразовом устройстве доставки шприце-ручке нет сменного картриджа. Напротив, одноразовое устройство доставки шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар освобождается от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывают.

[00228] Многочисленные многоразовые устройства доставки шприцы-ручки и автоинъекторы находят применение в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают в себя без ограничения следующее: AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручка DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), шприц-ручка HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручка HUMALOG™, шприц-ручка HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, Inn.), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручка BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), называя лишь несколько из них. Примеры одноразовых устройств доставки шприц-ручка, находящих свое применение в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения следующее: шприц-ручка SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks,

Calif.), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручка HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, Ill.), называя лишь несколько из них.

[00229] Фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, преимущественно получают в виде лекарственных форм в стандартной дозе, которая соответствует дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают в себя, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося в них вышеупомянутого антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекций предпочтительно, чтобы указанное антитело содержалось в количестве, составляющем от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения антител

[00230] Благодаря их взаимодействия с Bet v 1 антитела согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения первичного ответа после воздействия на человека аллергена Fagales, пыльцы березы или окружающей среды, содержащей белок Bet v 1, или по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с аллергическим ответом, такого как зуд в глазах, конъюнктивит, ринит, одышка, затрудненное дыхание или для предотвращения вторичного ответа на аллерген Bet v 1, включая в себя более серьезную анафилактическую реакцию, или для уменьшения тяжести, продолжительности и/или частоты симптомов после повторного воздействия аллергена Fagales. Соответственно, предусмотрено, что антитела согласно настоящему изобретению можно использовать профилактически или терапевтически.

[00231] Согласно дополнительно варианту осуществления настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению используют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих чувствительностью к пыльце березы или ее экстракту и/или белку Bet v 1. Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению используют для получения фармацевтической композиции для снижения тяжести первичного воздействия Bet v 1 или для снижения тяжести, продолжительности и/или количества аллергических ответов на Bet v 1. Согласно дополнительному варианту осуществления настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению используют в качестве вспомогательной терапии с помощью любого другого средства, применимого для лечения аллергенов Fagales, включая в себя кортикостероиды, вакцины,

аллерген-специфическую иммунотерапию (SIT) или любую другую паллиативную терапию, известную специалистам в настоящей области техники.

Виды комбинированной терапии

[00232] Виды комбинированной терапии могут включать в себя антитело к Bet v 1 согласно настоящему изобретению и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно эффективно комбинировать с антителом согласно настоящему изобретению или с биологически активным фрагментом антитела согласно настоящему изобретению.

[00233] Например, второе терапевтическое средство можно использовать для помощи в уменьшении аллергических симптомов после воздействия аллергена Fagales, пыльцы березы или ее экстракта или Bet v 1, или воздействия окружающей среды, в которой присутствуют и цветут деревья Fagales, такое как кортикостероид. Антитела также могут использовать в сочетании с другими видами терапии, такими как вакцина, специфическая для аллергена Bet v 1. Дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить до, одновременно или после введения антитела к Bet v 1 согласно настоящему изобретению. Для целей настоящего раскрытия такие схемы введения считаются введением антитела к Bet v 1 “в комбинации” со вторым терапевтически активным компонентом.

Аллерген-специфическая иммунотерапия (SIT)

[00234] Используемые в настоящем документе выражения “аллерген-специфическая иммунотерапия”, “специфическая иммунотерапия”, “SIT”, “схема SIT” и тому подобное относятся к повторному введению аллергена пациенту с течением времени в качестве средства для лечения или предотвращения аллергии и аллергических ответов или для уменьшения или устранения аллергических ответов. В типичной схеме SIT небольшие количества аллергена первоначально вводят пациенту с аллергией, после чего следует введение повышенных количеств аллергена. В определенных случаях схема SIT включает в себя по меньшей мере две последовательные фазы: (1) фазу введения увеличивающихся доз и (2) поддерживающую фазу. В фазе введения увеличивающихся доз увеличивающиеся дозы аллергена вводят до тех пор, пока не будет достигнута эффективная и безопасная доза. Дозу, которую устанавливают в конце фазы введения увеличивающихся доз, затем вводят пациенту в течение поддерживающей фазы. Продолжительность фазы введения увеличивающихся доз может составлять несколько недель или несколько месяцев. Однако согласно определенным вариантам осуществления фаза введения увеличивающихся доз характеризуется существенно более короткой продолжительностью (например, менее

одной недели, менее 6 дней, менее 5 дней, менее 4 дней, менее 3 дней или менее 2 дней). Схемы SIT, включающие в себя фазу введения увеличивающихся доз, составляющую менее 5 дней, иногда называют “молниеносной” иммунотерапией или “молниеносной SIT”. Поддерживающая фаза схемы SIT может длиться несколько недель, несколько месяцев, несколько лет или неопределенно долго.

Схемы введения

[00235] В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения пациенту можно вводить несколько доз одного или нескольких антител к $\text{Bet } \nu$ 1 (комбинации антител) в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту настоящего изобретения предусматривают последовательное введение пациенту нескольких доз антитела, комбинации антител. Используемый в настоящем документе термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела или комбинации антител вводят пациенту в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Согласно настоящему изобретению предусмотрены способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела или комбинации антител с последующей одной или несколькими вторичными дозами антитела и необязательно последующей одной или несколькими третичными дозами антитела.

[00236] Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела или комбинации антител согласно настоящему изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (ее также называют "исходной дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество антитела или комбинации антител, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Тем не менее, согласно определенным вариантам осуществления количество антитела или комбинации антител, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, варьируется относительно друг друга (например, его корректируют выше или ниже в зависимости от ситуации) в течение курса лечения. Согласно определенным вариантам осуществления две или больше (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения в виде "насыщающих доз", после которых вводят последующие дозы, которые вводят реже (например, "поддерживающие дозы").

[00237] Согласно одному иллюстративному варианту осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или больше) недель после непосредственно предшествующей дозы. Используемая в настоящем документе фраза “непосредственно предшествующая доза” в последовательности нескольких введений означает дозу антитела или комбинации антител, которую вводят пациенту до введения непосредственно следующей дозы в последовательности без каких-либо промежуточных доз.

[00238] Способы согласно этому аспекту настоящего изобретения могут предусматривать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антитела или комбинации антител. Например, согласно определенным вариантам осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, согласно определенным вариантам осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления вводят пациенту две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

[00239] Согласно вариантам осуществления, включающим в себя множество вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, согласно вариантам осуществления, включающим в себя множественные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения также может быть скорректирована в течение курса лечения врачом в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

Диагностические применения антител

[00240] Антитела к Bet v 1 согласно настоящему изобретению также можно использовать для обнаружения и/или измерения Bet v 1 в образце, например, для диагностических целей. Предусмотрено, что подтверждение аллергического ответа, предположительно вызванного Bet v 1, можно осуществить путем измерения наличия какого-либо Bet v 1 путем использования любого одного или нескольких антител согласно

настоящему изобретению. Иллюстративные диагностические анализы в отношении Bet v 1 могут включать в себя, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с антителом к Bet v 1 согласно настоящему изобретению, причем антитело к Bet v 1 метят обнаруживаемой меткой или репортерной молекулой или используют в качестве лиганда захвата для селективного выделения белка Bet v 1 из образцов пациента. Альтернативно, немеченое антитело к Bet v 1 можно использовать в диагностических целях в комбинации со вторичным антителом, которое само является меченым обнаруживаемой меткой. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения Bet v 1 в образце, включают в себя иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[00241] Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах Bet v 1 в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит определяемые количества белка Bet v 1 или его фрагментов при нормальных или патологических условиях. Как правило, содержания Bet v 1 в конкретном образце, полученном от здорового/не страдающего аллергией пациента (например, пациента, не пораженного чувствительностью, ассоциированной с присутствием Bet v 1) будут измерять для первоначального установления исходного, или стандартного содержания Bet v 1. Затем это исходное содержание Bet v 1 можно сравнить с содержаниями Bet v 1, измеренными в образцах, полученных от лиц, у которых подозревают наличие чувствительности к Bet v 1 в пыльце березы или симптомов, связанных с таким состоянием.

[00242] Несмотря на то, что настоящее изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на ряд вариантов осуществления, специалистам в настоящей области техники понятно, что изменения в форме и деталях могут быть внесены в различные варианты осуществления, раскрытые в настоящем документе, не отклоняясь от сущности и объема настоящего изобретения и то, что различные варианты осуществления, раскрытые в настоящем документе, не предназначены для ограничения объема формулы настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

[00243] Следующие примеры предоставлены таким образом, чтобы средние специалисты в настоящей области техники имели полное раскрытие и описание того, как реализовать и применить способы и композиции согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количествам, температуре и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части даны по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1: Создание антител человека к Bet v 1

[00244] Иммуноген, содержащий любое из следующего, можно использовать для создания антител к Bet v 1. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению получают из организма мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как полноразмерный природный Bet v 1 (nBet v 1), который можно приобрести коммерчески (например, у Stallergenes Greer, Lenoir, NC, № по кат. XP527D3A25) или выделить из пыльцы березы (см., например, Buters, et al. (2012), *Atmospheric Environment* 55:496-505) или который можно быть получить рекомбинантным способом (см. идентификационный номер GenBank P 15494 в отношении полноразмерной аминокислотной последовательности Bet v 1) или фрагменты белка Bet v 1, с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногеном активным фрагментом природного белка. Различные конструкторы можно получить с использованием частей белка Bet v 1, известных специалистам в настоящей области техники. Эти конструкторы можно использовать отдельно или в различных комбинациях, чтобы вызывать ответы антител *in vivo*. Например, рекомбинантные конструкторы Bet v 1, такие как примеры, представленные в SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, 311 и 315, или их фрагменты, можно использовать в качестве иммуногенов.

[00245] Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению получают из организма мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как биологически активный и/или иммуногенный фрагмент природного Bet v 1 или ДНК, кодирующая его активный фрагмент. Фрагмент может быть получен из N-концевой или C-концевой части Bet v 1.

[00246] Согласно определенным вариантам осуществления рекомбинантные конструкторы белка Bet v 1, используемые в исследованиях, описанных в настоящем

документе, могут также включать в себя С-концевую метку (мус-мус-гексагистидиновая метка), как указано ниже. Согласно другим вариантам осуществления рекомбинантный конструктор белка Bet v 1 включает в себя аминокислоты G2-N160 согласно Uniprot P15494. Согласно некоторым вариантам осуществления конструктор содержит замену S85A. Белки экспрессировали в клетках яичника китайского хомячка (СНО). Экзогенная сигнальная последовательность, используемая для стимуляции экспрессии в клетках СНО, не включена в перечни последовательностей.

[00247] Согласно определенным вариантам осуществления иммуноген может представлять собой фрагмент Bet v 1 или слитый белок, который содержит любой один или несколько из следующего: i) аминокислотные остатки 23-43 Bet v 1 (см. Uniprot P15494, а также SEQ ID NO: 307); ii) аминокислотные остатки 44-56 Bet v 1 (см. Uniprot P15494, а также SEQ ID NO: 308); iii) аминокислотные остатки 2-19 Bet v 1 (см. Uniprot P15494, а также SEQ ID NO: 309); iv) аминокислотные остатки 57-70 Bet v 1 (см. Uniprot P15494, а также SEQ ID NO: 310); v) аминокислотные остатки 81-89 Bet v 1 ((см. Uniprot P15494, а также SEQ ID NO: 311) и vi) аминокислотные остатки 81-96 Bet v 1 ((см. Uniprot P15494, а также SEQ ID NO: 315).

[00248] Согласно определенным вариантам осуществления антитела, которые связываются с специфически с Bet v 1, можно получить с использованием фрагментов указанных выше областей или пептидов, которые выходят за пределы обозначенных областей на приблизительно 5 - приблизительно 20 аминокислотных остатков от одного или обоих из N- или С-конца областей, описанных в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления любую комбинацию указанных выше областей или их фрагментов можно использовать в получении специфических по отношению к Bet v 1 антител. Согласно определенным вариантам осуществления любую одну или несколько указанных выше областей Bet v 1 или их фрагментов можно использовать для получения моноспецифических, биспецифических или мультиспецифических антител.

[00249] Полноразмерные белки или их фрагменты, которые использовали в качестве иммуногенов, как указано выше, вводили напрямую, с адьювантом для стимуляции иммунного ответа, мыши VELOCIMMUNE[®], содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и kappa легкой цепей иммуноглобулина человека.

[00250] Антитела к Bet v 1 выделяют непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с миеломными клетками, как описано в патенте США № 7582298. С использованием этого способа получали несколько полностью человеческих антител к Bet v 1 (т.е. антитела, обладающие переменными доменами человека и константными доменами человека); иллюстративные антитела, образованные таким

образом, обозначили следующим образом: H4N16943P, H4N16946P, H4N16950P, H4N16960P, H4N16967P, H4N16971P, H4N16979P, H4N16987P, H4N16991P, H4N16992P, H4N17001P, H4N17015P, H4N17027P, H4N17028P, H4N17031P, H4N17033P, H4N17038P2, H4N17045P2, H4N17067P2 и H4N17082P2.

[00251] Биологические свойства иллюстративных антител, созданных в соответствии со способами настоящего примера, описаны подробно в примерах, представленных ниже.

Пример 2: Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей

[00252] В таблице 1a представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных антител к Bet v 1. В таблице 1b представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных антител к Bet v 1.

Таблица 1a: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4N16943P	2	4	6	8	10	12	14	16
H4N16946P	18	20	22	24	26	28	30	32
H4N16950P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4N16960P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4N16967P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4N16971P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4N17038P2	98	100	102	104	106	108	110	112
H4N16987P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4N16991P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4N16992P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4N17001P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4N17015P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4N17027P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4N17028P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4N17031P	226	228	230	232	234	236	238	240
H4N17033P	242	244	246	248	250	252	254	256
H4N16979P	258	260	262	264	266	268	270	272

H4H17045P2	274	276	278	280	266	268	270	272
H4H17067P2	282	284	286	288	266	268	270	272
H4H17082P2	290	292	294	296	298	300	302	304

Таблица 1b: Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H16943P	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H16946P	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H16950P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H16960P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H16967P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H16971P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H17038P2	97	99	101	103	105	107	109	111
H4H16987P	113	115	117	119	121	123	125	127
H4H16991P	129	131	133	135	137	139	141	143
H4H16992P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4H17001P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H17015P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4H17027P	193	195	197	199	201	203	205	207
H4H17028P	209	211	213	215	217	219	221	223
H4H17031P	225	227	229	231	233	235	237	239
H4H17033P	241	243	245	247	249	251	253	255
H4H16979P	257	259	261	263	265	267	269	271
H4H17045P2	273	275	277	279	265	267	269	271
H4H17067P2	281	283	285	287	265	267	269	271
H4H17082P2	289	291	293	295	297	299	301	303

[00253] Антитела, как правило, в настоящем документе называют согласно следующей номенклатуре: приставка Fc (например, “H4H”, “H2M” и т.д.) с последующим числовым идентификатором (например, “16943” “17001” и т.д.), за которым следует суффикс “P” или “P2”. Приставки H4H и H2M в обозначениях антител, используемых в настоящем документе указывают на конкретный изотип Fc-области антитела. Таким

образом, в соответствии с этой номенклатурой антитело в настоящем документе может называться, например, “H4H16943P” и т.д. так как “H4H” обозначает антитело, которое содержит Fc IgG4 человека (все переменные области являются полностью человеческими, что обозначено первой “H” в обозначении антитела). Среднему специалисту в настоящей области техники понятно, что антитело с конкретным изотипом Fc можно превратить в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши можно превратить в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае переменные домены (включая в себя CDR), которые указаны с помощью числовых идентификаторов, показанных в таблицах 1, будут оставаться прежними, и, как предполагают, свойства связывания с антигеном являются идентичными или по существу сходными независимо от природы Fc-домена.

[00254] В таблице 1с представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей полноразмерных тяжелой и легкой цепей выбранных антител к Bet v 1.

Таблица 1с: Идентификаторы аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:	
	Тяжелая цепь	Легкая цепь
H4H17038P2	316	317
H4H16987P	318	319
H4H16992P	320	321
H4H17082P2	322	323

Пример 3: Связывание антитела с Bet v 1, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса

[00255] Константы равновесия диссоциации (K_D) для связывания природного Bet v 1 с очищенными моноклональными антителами к Bet v 1 определяли с использованием биосенсора поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени (SPR-Biacore) с использованием прибора Biacore 4000. Все исследования связывания проводили в рабочем буфере, содержащем 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) при 25°C и 37°C. Поверхность сенсора Biacore вначале дериватизировали путем аминного сочетания с моноклональным мышинным антителом к Fc человека (GE, № по кат. BR-1008-39) для захвата моноклональных антител к Bet v 1. Различные концентрации природного Bet v 1 (Indoor, № по кат. NA-BV1-1) или реагента произведенного СНО рекомбинантного

Bet v 1, содержащего мутацию S85A с С-концевой мус-мус гексагистидиновой меткой (мутантный Bet v 1-ММН; SEQ ID NO: 312) вначале получали в рабочем буфере HBS-ET (100 нМ - 1,23 нМ; серийно разведенный в 3 раза) и их вводили на поверхность, содержащую моноклональные антитела к Bet v 1, захваченные антителами к Fc человека, в течение 4 минут со скоростью потока, составляющей 30 мкл/мин, при этом диссоциацию связанного с моноклональным антителом реагента Bet v 1 подвергали мониторингу в течение 10 минут в рабочем буфере HBS-ET. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем аппроксимации сенсограмм связывания в режиме реального времени к 1:1 модели связывания с ограничением переноса массы с использованием программного обеспечения для подбора аппроксимирующей кривой Scrubber 2.0с. Константы равновесия диссоциации для связывания (K_D) и диссоциативные периоды полужизни ($t_{1/2}$) рассчитывали из кинетических констант скорости следующим образом:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d}$$

[00256] Параметры кинетики связывания для природного Bet v 1 и мутантного Bet v 1-ММН с различными моноклональными антителами к Bet v 1 согласно настоящему изобретению при 25°C и 37°C показаны в таблице 2 - таблице 5.

[00257] При 25°C все моноклональные антитела к Bet v 1 согласно настоящему изобретению связывались с природным Bet v 1 со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 0,66 нМ до 13,5 нМ, как показано в таблице 2. При 37°C все моноклональные антитела к Bet v 1 согласно настоящему изобретению связывались с природным Bet v 1 со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 1,59 нМ до 27,9 нМ, как показано в таблице 3. Как при 25°C, так и при 37°C антитело изотипического контроля не демонстрировало какого-либо измеримого связывания с природным Bet v 1.

[00258] Как при 25°C, так и при 37°C 3 из 20 моноклональных антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению не связывались с мутантным Bet v 1-ММН. При 25°C 17 из 20 моноклональных антител к Bet v 1 связывались с мутантным Bet v 1-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 348 пМ до 43,8 нМ, как показано в таблице 4. При 37°C 17 из 20 моноклональных антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению связывались с мутантным Bet v 1-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 655 пМ до 106 нМ, как показано в таблице 5. Как при 25°C, так и при 37°C антитело изотипического контроля не демонстрировало какого-либо измеримого связывания с мутантным Bet v 1-ММН.

Таблица 2: Параметры кинетики связывания природного Bet v 1, связывающегося с моноклональными антителами к Bet v 1 при 25°C.

Антитело	Уровень захвата мAb (PE, резонансная единица)	100 нМ связанного природного Bet v 1 (PE)	k_a (1/M·с)	k_d (1/с)	KD (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H16943P	346 ± 1,5	71	1,64E+05	2,30E-04	1,40E-09	50
H4H16946P	355 ± 1,8	74	2,05E+05	2,01E-04	9,82E-10	58
H4H16950P	357 ± 2,3	58	9,61E+04	5,03E-04	5,23E-09	23
H4H16960P	342 ± 2,2	57	4,22E+05	6,90E-04	1,64E-09	17
H4H16967P	332 ± 0,9	27	3,76E+04	1,49E-04	3,98E-09	77
H4H16971P	343 ± 0,5	57	2,40E+05	7,81E-04	3,26E-09	15
H4H16979P	295 ± 0,8	41	2,30E+05	2,78E-04	1,21E-09	42
H4H16987P	334 ± 0,5	61	4,10E+05	1,14E-03	2,77E-09	10
H4H16991P	313 ± 0,4	57	2,95E+05	3,12E-04	1,06E-09	37
H4H16992P	351 ± 0,7	64	3,73E+05	2,48E-04	6,65E-10	47
H4H17001P	352 ± 0,6	71	3,29E+05	3,29E-04	1,00E-09	35
H4H17015P	370 ± 0,7	68	1,84E+05	2,46E-04	1,34E-09	47
H4H17027P	340 ± 0,6	48	6,24E+04	2,70E-04	4,32E-09	43
H4H17028P	350 ± 0,7	63	2,81E+05	1,07E-03	3,79E-09	11
H4H17031P	335 ± 0,7	54	1,24E+05	1,68E-03	1,35E-08	6,8
H4H17033P	336 ± 0,4	61	3,94E+05	4,69E-04	1,19E-09	25
H4H17038P2	324 ± 0,9	64	2,77E+05	3,64E-04	1,32E-09	32
H4H17045P2	368 ± 0,9	69	1,22E+05	1,49E-04	1,22E-09	78
H4H17067P2	344 ± 0,5	58	1,13E+05	4,02E-04	3,56E-09	29
H4H17082P2	366 ± 0,6	72	5,45E+05	5,97E-04	1,09E-09	19
Изотипический контроль	345 ± 0,5	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 3: Параметры кинетики связывания природного Bet v 1, связывающегося с моноклональными антителами к Bet v 1 при 37°C.

Антитело	Уровень захвата mAb (PE)	100 нМ связанного природного Bet v 1 (PE)	k_a (1/M·с)	k_d (1/с)	K_D (M)	t_{1/2} (мин)
H4H16943P	451 ± 2,7	88	2,60E+05	1,27E-03	4,89E-09	9,1
H4H16946P	469 ± 2,6	93	2,89E+05	6,01E-04	2,08E-09	19
H4H16950P	471 ± 2,1	76	1,41E+05	1,21E-03	8,57E-09	10
H4H16960P	422 ± 0,9	65	6,62E+05	1,68E-03	2,54E-09	6,8
H4H16967P	412 ± 1,9	45	5,04E+04	7,19E-04	1,43E-08	16
H4H16971P	433 ± 1,3	66	3,52E+05	2,44E-03	6,93E-09	4,7
H4H16979P	352 ± 1,3	52	3,42E+05	6,16E-04	1,80E-09	19
H4H16987P	436 ± 1,7	74	5,20E+05	4,77E-03	9,16E-09	2,4
H4H16991P	379 ± 1,0	66	5,00E+05	1,08E-03	2,16E-09	11
H4H16992P	436 ± 1,1	73	5,38E+05	8,53E-04	1,59E-09	14
H4H17001P	457 ± 0,8	87	4,85E+05	1,22E-03	2,52E-09	9,5
H4H17015P	464 ± 1,4	84	2,93E+05	7,92E-04	2,70E-09	15
H4H17027P	427 ± 0,9	67	9,81E+04	9,30E-04	9,48E-09	12
H4H17028P	435 ± 1,3	71	3,73E+05	2,90E-03	7,77E-09	3,9
H4H17031P	419 ± 1,8	63	4,85E+05	5,44E-03	2,79E-08	2,1
H4H17033P	417 ± 1,4	74	6,27E+05	1,19E-03	1,90E-09	10
H4H17038P2	406 ± 1,4	74	3,73E+05	1,62E-03	4,33E-09	7,1
H4H17045P2	465 ± 1,4	90	2,37E+05	4,41E-04	1,86E-09	26
H4H17067P2	440 ± 1,2	80	2,68E+05	1,47E-03	5,48E-09	7,9
H4H17082P2	453 ± 1,1	83	7,48E+05	1,82E-03	2,43E-09	6,3
Изотипический контроль	426 ± 1	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 4: Параметры кинетики связывания мутантного Bet v 1-ММН, связывающегося с моноклональными антителами к Bet v 1 при 25°C.

Антитело	Уровень захвата мAb (PE)	100 нМ связанного мутантного Bet v 1-ММН (PE)	k_a (1/М·с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H16943P	344 ± 0,8	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	354 ± 0,5	83	4,05E+05	1,41E-04	3,48E-10	82
H4H16950P	357 ± 0,6	70	1,51E+05	3,35E-04	2,21E-09	35
H4H16960P	343 ± 0,8	64	5,62E+05	4,43E-04	7,89E-10	26
H4H16967P	331 ± 0,3	0	NB	NB	NB	NB
H4H16971P	343 ± 0,5	58	4,07E+05	3,86E-03	9,48E-09	3,0
H4H16979P	293 ± 1,0	46	2,86E+05	2,30E-04	8,04E-10	50
H4H16987P	334 ± 0,4	46	4,90E+05	2,15E-02	4,38E-08	0,5
H4H16991P	312 ± 0,5	61	3,90E+05	2,87E-04	7,35E-10	40
H4H16992P	350 ± 0,4	70	4,59E+05	2,76E-04	6,01E-10	42
H4H17001P	351 ± 0,7	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17015P	368 ± 0,8	76	2,72E+05	2,81E-04	1,03E-09	41
H4H17027P	340 ± 0,4	63	1,10E+05	3,19E-04	2,90E-09	36
H4H17028P	349 ± 0,5	71	8,11E+05	6,93E-04	8,54E-10	17
H4H17031P	333 ± 0,5	63	1,87E+05	1,05E-03	5,61E-09	11
H4H17033P	336 ± 0,5	67	5,40E+05	4,15E-04	7,68E-10	28
H4H17038P2	324 ± 1	63	6,42E+05	6,41E-03	9,98E-09	1,8
H4H17045P2	368 ± 1,1	60	8,00E+04	4,98E-04	6,23E-09	23
H4H17067P2	344 ± 0,3	55	1,00E+05	1,17E-03	1,17E-08	9,9
H4H17082P2	366 ± 0,5	78	5,30E+05	6,12E-04	1,16E-09	19
Изотипический контроль	344 ± 0,8	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 5: Параметры кинетики связывания мутантного Bet v 1-ММН, связывающегося с моноклональными антителами к Bet v 1 при 37°C.

Антитело	Уровень захвата мAb (PE)	100 нМ связанного мутантного Bet v 1-ММН (PE)	k_a (1/М·с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H16943P	441 ± 1,3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	459 ± 1,8	97	6,03E+05	3,95E-04	6,55E-10	29
H4H16950P	461 ± 1,2	83	2,15E+05	1,25E-03	5,81E-09	9,2
H4H16960P	417 ± 1,4	72	8,79E+05	1,77E-03	2,01E-09	6,5
H4H16967P	405 ± 0,8	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	427 ± 1,2	60	6,48E+05	1,20E-02	1,86E-08	1,0
H4H16979P	348 ± 0,7	56	4,62E+05	7,30E-04	1,58E-09	16
H4H16987P	429 ± 1,1	36	7,95E+05	8,47E-02	1,06E-07	0,14
H4H16991P	376 ± 0,7	67	7,17E+05	1,06E-03	1,48E-09	11
H4H16992P	432 ± 0,6	78	7,84E+05	8,85E-04	1,13E-09	13
H4H17001P	451 ± 0,8	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17015P	458 ± 1,1	89	4,45E+05	8,99E-04	2,02E-09	13
H4H17027P	421 ± 0,8	78	1,71E+05	1,16E-03	6,80E-09	9,9
H4H17028P	430 ± 0,8	77	1,01E+06	2,35E-03	2,32E-09	4,9
H4H17031P	413 ± 1,4	71	2,78E+05	4,06E-03	1,46E-08	2,8
H4H17033P	414 ± 0,8	79	8,83E+05	1,18E-03	1,34E-09	9,8
H4H17038P2	399 ± 0,9	56	8,33E+05	2,96E-02	3,56E-08	0,39
H4H17045P2	458 ± 1,2	84	1,62E+05	2,32E-03	1,43E-08	5,0
H4H17067P2	435 ± 0,7	76	2,53E+05	4,28E-03	1,69E-08	2,7
H4H17082P2	448 ± 1	89	8,21E+05	1,90E-03	2,31E-09	6,1
Изотипический контроль	421 ± 0,7	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Пример 4: Связывание антитела с родственными аллергенами, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса

[00259] Константы равновесия диссоциации (K_D) для связывания различных родственных аллергенов с очищенными моноклональными антителами к Bet v 1 определяли с использованием биосенсора поверхностного плазмонного резонанса в режиме

реального времени (SPR-Biacore) с использованием прибора Biacore 4000. Все исследования связывания проводили в рабочем буфере, содержащем 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) при 25°C. Поверхность сенсора Biacore вначале дериватизировали путем аминного сочетания с моноклональным мышинным антителом к Fc человека (GE, № по кат. BR-1008-39) для захвата моноклональных антител к Bet v 1. Исследования связывания проводили на следующих родственных аллергенах: ольха (Aln g 1, MyBiosource, № по кат. MBS1041484), яблоко (Mal d 1, MyBiosource, № по кат. MBS1224919), морковь (Dau s 1.2, MyBiosource, № по кат. MBS1212920), сельдерей (Api g 1, MyBiosource, № по кат. MBS1171376), сельдерей (Api g 2, MyBiosource, № по кат. MBS1047880), граб обыкновенный (Car b 1 изоформа 1A и 1B, MyBiosource, № по кат. MBS1200018), граб обыкновенный (Car b 1 изоформа 2, MyBiosource, № по кат. MBS1043940), лещина (Cor A 1, MyBiosource, № по кат. MBS5304600) и белый дуб (Que a 1, MyBiosource, № по кат. MBS1258822). Различные концентрации родственных аллергенов получали в рабочем буфере HBS-ET (100 нМ - 6,25 нМ; серийно разведенный в 4 раза) и затем их вводили на поверхность, содержащую моноклональные антитела к Bet v 1, захваченные антителами к Fc человека, в течение 3 минут со скоростью потока, составляющей 30 мкл/мин, при этом диссоциацию связанных с моноклональным антителом аллергенов подвергали мониторингу в течение 8 минут в рабочем буфере HBS-ET. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем аппроксимации сенсограмм связывания в режиме реального времени к 1:1 модели связывания с ограничением переноса массы с использованием программного обеспечения для подбора аппроксимирующей кривой Scrubber 2.0с. Константы равновесия диссоциации для связывания (K_D) и диссоциативные периоды полужизни ($t_{1/2}$) рассчитывали из кинетических констант скорости следующим образом:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d}$$

[00260] Параметры кинетики связывания для родственных аллергенов с различными моноклональными антителами к Bet v 1 согласно настоящему изобретению при 25°C показаны в таблице 6 - таблице 11.

[00261] Как показано в таблице 6 при 25°C 9 из 20 антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению продемонстрировали измеримое связывание с Aln g 1 со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 1,03 нМ - 175 нМ. Другие 11 антител не продемонстрировали какого-либо измеримого связывания с Aln g 1 при исследуемых условиях.

[00262] Как показано в таблице 7 при 25°C два из 20 антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению продемонстрировали измеримое связывание с Mal d 1 со значениями K_D , составляющими 29,8 нМ и 494 нМ. Другие 18 антител не продемонстрировали какого-либо измеримого связывания с Mal d 1 при исследуемых условиях.

[00263] Как показано в таблице 8 при 25°C одно из антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению продемонстрировало измеримое связывание с Api g 1 со значением K_D , составляющим 167 нМ. Другие 19 антитела не продемонстрировали какого-либо измеримого связывания с Api g 1 при исследуемых условиях.

[00264] Как показано в таблице 9 при 25°C 8 из 20 антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению продемонстрировали измеримое связывание с изоформой 1А и 1В Car b 1 со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 1,2 нМ до 380 нМ. Другие 12 антител не продемонстрировали какого-либо измеримого связывания с изоформой 1А и 1В Car b 1 при исследуемых условиях.

[00265] Как показано в таблице 10 при 25°C 14 из 20 антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению продемонстрировали измеримое связывание с изоформой 2 Car b 1 со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 335 пМ до 564 нМ. Другие 6 антител не продемонстрировали какого-либо измеримого связывания с изоформой 2 Car b 1 при исследуемых условиях.

[00266] Как показано в таблице 11 при 25°C одно из антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению продемонстрировали измеримое связывание с Cog A 1 со значением K_D , составляющим 396 нМ. Другие 19 антител не продемонстрировали какого-либо измеримого связывания с Cog A 1 при исследуемых условиях.

[00267] Ни одно из антител согласно настоящему изобретению не продемонстрировало измеримого связывания с Dau с 1.2, Api g 2 или Que a 1 при исследуемых условиях (данные не показаны). Антитело изотипического контроля не продемонстрировало какого-либо измеримого связывания с каким-либо исследуемым аллергеном.

Таблица 6: Параметры кинетики связывания аллергена ольхи (Aln g1), связывающегося с моноклональными антителами к Bet v 1 при 25°C.

Антитело	Уровень захвата мAb (PE)	100 нМ связанного анализита (PE)	k_a (1/М·с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H16943P	675 ± 0,9	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	668 ± 1,2	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16950P	634 ± 1,7	15	9,12E+04	1,60E-02	1,75E-07	0,7
H4H16960P	681 ± 2,1	29	2,26E+05	3,32E-02	1,47E-07	0,3
H4H16967P	666 ± 3,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	668 ± 2,1	41	9,30E+04	1,18E-02	1,26E-07	1,0
H4H16979P	545 ± 0,4	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16987P	667 ± 1,6	139	2,21E+05	8,70E-04	3,94E-09	13
H4H16991P	608 ± 0,4	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16992P	653 ± 1,3	5	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17001P	630 ± 1,6	49	2,64E+05	2,78E-02	1,05E-07	0,4
H4H17015P	745 ± 3	8	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17027P	772 ± 0,4	9	9,29E+04	6,43E-03	6,92E-08	1,8
H4H17028P	708 ± 1,5	16	5,17E+04	1,90E-03	3,67E-08	6,1
H4H17031P	727 ± 1,3	59	5,29E+04	2,38E-03	4,50E-08	4,8
H4H17033P	649 ± 0,2	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17038P2	660 ± 1,3	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17045P2	746 ± 1,2	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	617 ± 2,2	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	662 ± 3,6	132	3,12E+05	3,23E-04	1,03E-09	36
Изотипический контроль	686 ± 1,3	0	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 7: Параметры кинетики связывания аллергена яблока (Mal d 1), связывающегося с моноклональными антителами к Bet v 1 при 25°C.

Антитело	Уровень захвата mAb (PE)	100 нМ связанного анализита (PE)	k_a (1/М·с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H16943P	676 ± 0,7	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	668 ± 2,2	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16950P	635 ± 1,9	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16960P	690 ± 8,2	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16967P	671 ± 3,2	-2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	667 ± 3,4	25	1,61E+05	7,95E-02	4,94E-07	0,2
H4H16979P	545 ± 0,5	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16987P	668 ± 0,8	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16991P	608 ± 1,4	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16992P	652 ± 0,8	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17001P	626 ± 0,8	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17015P	741 ± 2,6	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17027P	767 ± 1,4	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17028P	704 ± 2,3	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17031P	727 ± 1,6	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17033P	650 ± 1,6	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17038P2	658 ± 1,5	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17045P2	747 ± 1,3	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	616 ± 2	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	662 ± 1,9	112	1,25E+06	3,74E-02	2,98E-08	0,3
Изотипический контроль	686 ± 1,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 8: Параметры кинетики связывания аллергена сельдерея (Api g 1), связывающегося с моноклональными антителами к Bet v 1 при 25°C.

Антитело	Уровень захвата mAb (PE)	100 нМ связанного анализата (PE)	k_a (1/M·с)	k_d (1/с)	K _D (M)	t _{1/2} (мин)
H4H16943P	674 ± 0,7	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	666 ± 0,4	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16950P	632 ± 3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16960P	684 ± 3,6	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16967P	668 ± 4,2	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	666 ± 0,7	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16979P	546 ± 1,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16987P	668 ± 0,8	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16991P	607 ± 1,3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16992P	651 ± 2,9	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17001P	625 ± 1,3	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17015P	740 ± 1,5	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17027P	765 ± 1,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17028P	705 ± 2,2	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17031P	727 ± 1,3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17033P	648 ± 0,3	39	4,75E+05	7,91E-02	1,67E-07	0,2
H4H17038P2	659 ± 0,6	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17045P2	747 ± 0,5	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	613 ± 0,6	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	660 ± 3,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
Изотипический контроль	684 ± 3,1	-1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 9: Параметры кинетики связывания аллергена граба обыкновенного (изоформа 1А и 1В Car b 1), связывающегося с моноклональными антителами к Bet v 1 при 25°C.

Антитело	Уровень захвата mAb (PE)	100 нМ связанного анализита (PE)	k_a (1/М·с)	k_d (1/с)	K _d (М)	t _{1/2} (мин)
H4H16943P	674 ± 1	26	1,52E+05	5,78E-02	3,80E-07	0,2
H4H16946P	667 ± 1,6	63	1,43E+05	2,40E-02	1,68E-07	0,5
H4H16950P	633 ± 1,6	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16960P	687 ± 0,8	4	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16967P	666 ± 3,3	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	669 ± 4,6	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16979P	545 ± 0,4	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16987P	668 ± 0,3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16991P	608 ± 1,8	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16992P	653 ± 0,6	161	2,81E+05	3,37E-04	1,20E-09	34
H4H17001P	626 ± 1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17015P	742 ± 1,8	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17027P	767 ± 0,3	41	3,14E+04	6,73E-03	2,14E-07	1,7
H4H17028P	705 ± 0,7	159	2,10E+05	5,11E-04	2,43E-09	23
H4H17031P	726 ± 3,2	126	8,04E+04	1,11E-03	1,38E-08	10
H4H17033P	650 ± 1,3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17038P2	659 ± 0,9	105	1,51E+05	6,23E-03	4,14E-08	1,9
H4H17045P2	748 ± 1	5	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	616 ± 1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	664 ± 1,6	69	3,90E+05	3,53E-02	9,05E-08	0,3
Изотипический контроль	686 ± 0,7	0	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 10: Параметры кинетики связывания аллергена граба обыкновенного (изоформа 2 Car b1), связывающегося с моноклональными антителами к Bet v 1 при 25°C.

Антитело	Уровень захвата мAb (PE)	100 нМ связанного анализита (PE)	k_a (1/M·с)	k_d (1/с)	K _D (M)	t _{1/2} (мин)
H4H16943P	675 ± 1,6	183	1,11E+06	3,71E-04	3,35E-10	31
H4H16946P	666 ± 0,7	63	7,69E+04	1,38E-02	1,79E-07	0,8
H4H16950P	633 ± 3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16960P	682 ± 4,5	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16967P	663 ± 5,4	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	668 ± 4,1	23	2,59E+05	1,46E-01	5,64E-07	0
H4H16979P	547 ± 1,1	114	9,71E+05	2,41E-03	2,48E-09	4,8
H4H16987P	667 ± 1,3	153	1,01E+06	5,61E-03	5,56E-09	2,1
H4H16991P	607 ± 3,4	93	1,07E+06	4,04E-02	3,78E-08	0,3
H4H16992P	652 ± 0,6	156	1,40E+06	8,61E-04	6,17E-10	13
H4H17001P	625 ± 1,1	157	2,03E+06	3,20E-03	1,58E-09	3,6
H4H17015P	741 ± 1,6	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17027P	765 ± 1,8	42	5,84E+04	5,77E-03	9,89E-08	2,0
H4H17028P	703 ± 4,1	95	9,71E+04	4,37E-03	4,50E-08	2,6
H4H17031P	727 ± 1,2	160	3,95E+05	5,17E-03	1,31E-08	2,2
H4H17033P	650 ± 1,2	111	1,34E+06	4,47E-02	3,34E-08	0,3
H4H17038P2	660 ± 1,6	73	1,28E+05	6,48E-03	5,05E-08	1,8
H4H17045P2	747 ± 1,2	5	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	616 ± 1	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	661 ± 2	166	2,18E+06	1,24E-03	5,67E-10	9,3
Изотипический контроль	685 ± 1,2	0	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 11: Параметры кинетики связывания аллергена лещины (Cor A 1), связывающегося с моноклональными антителами к Bet v 1 при 25°C.

Антитело	Уровень захвата mAb (PE)	100 нМ связанного анализита (PE)	k_a (1/М·с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H16943P	673 ± 0,4	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	665 ± 0,6	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16950P	635 ± 3,3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16960P	687 ± 7	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16967P	668 ± 1,7	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	666 ± 5,8	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16979P	546 ± 1,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16987P	668 ± 0,7	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16991P	607 ± 1,3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16992P	652 ± 1,6	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17001P	626 ± 0,4	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17015P	740 ± 0,7	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17027P	766 ± 2,8	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17028P	704 ± 1,3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17031P	727 ± 1,2	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17033P	649 ± 1,5	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17038P2	659 ± 0,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17045P2	748 ± 0,8	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	614 ± 0,7	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	661 ± 0,8	20	1,06E+05	4,18E-02	3,96E-07	0,3
Изотипический контроль	685 ± 0,5	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Пример 5: Блокирование связывания Bet v 1 с аллерген-специфическим IgE антителами IgG к Bet v 1

[00268] Способность отдельных антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению или комбинаций антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению блокировать связывание Bet v 1 с захваченным на планшете IgE из плазмы/сыворотки донора-человека с аллергией определяли с использованием ELISA. Антитела испытывали

либо отдельно, либо в поликлональных смесях. Для анализа планшеты для микротитрования покрывали в течение ночи при 4°C белком внеклеточного домена FcεR1α человека (высокоаффинный рецептор для IgE), который получали с C-концевой меткой Fc мыши (hFcεR1α-mFc; SEQ ID NO: 313). Затем планшеты блокировали 0,5% BSA (масс./об.) в течение 1 часа при комнатной температуре. Плазму от доноров с аллергией разбавляли и затем захватывали общий IgE на поверхности, покрытой рецептором. Постоянное количество 0,1 нМ меченного биотином природного Bet v 1 (Indoor Biotechnologies, № по кат. NA-BV1-1) предварительно смешивали с антителами к Bet v 1, в одной концентрации 1 мкг/мл или в серийных разведениях, начиная с 10 мкг/мл или 1 мкг/мл каждого антитела и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, чтобы взаимодействие Bet v 1 с антителом достигло равновесия. Затем смесь антитело-Bet v 1 добавляли в покрытый IgE планшет в течение 1 часа. Затем планшеты промывали и количество природного Bet v 1, связанного с планшетом, обнаруживали с использованием стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (Thermo Scientific, № по кат. N200/QJ223091), в разведении 1:10000 и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты затем промывали PBS-T между каждой стадией протокола ELISA, описанного выше. Для развития колориметрической реакции в планшеты добавляли субстрат ТМВ/Н₂О₂ (BD Pharmingen, реагент А, № по кат. 51-2602КС + реагент В, № по кат. 51-2607КС) и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали с использованием 2 н. серной кислоты (H₂SO₄; VWR, № по кат. BDH3500-1). Впоследствии оптическую плотность измеряли на спектрофотометре (Victor, Perkin Elmer) при 450 нм. Процент блокирования рассчитывали с использованием самой высокой концентрации антител, используемой в каждом анализе, как описано ниже.

Блокирование, % =

$$\frac{(A_{450} \text{ без антитела}) - (A_{450} \text{ в самой высокой концентрации антитела})}{(A_{450} \text{ без антитела})} \times 100$$

[00269] 20 антител к Bet v 1 исследовали в качестве отдельных антител в отношении их способности блокировать связывание Bet v 1 с захваченным на планшете IgE их плазмы донора - человека с аллергией с использованием описанного анализа ELISA. Отдельные моноклональные антитела были способны частично блокировать связывание IgE с Bet v 1 на 8,5-64%, что подчеркивает поликлональность IgE. 7 антител показали блокирование, находящееся в диапазоне от 36 - 64%, при самой высокой исследуемой концентрации антитела, составляющей 10 мкг/мл, как показано в таблице 12.

[00270] Четыре антитела к Bet v 1, H4H17082P2, H4H17038P2, H4H16987P и H4H16992P, исследовали в анализе блокирования в одной точке. Комбинация H4H17082P2

и H4H16992P продемонстрировала больше чем 90% блокирование у 7 из 10 доноров IgE. Комбинации трех и четырех моноклональных антител продемонстрировали сходные результаты и, по-видимому, не добавили какого-либо дополнительного блокирующего эффекта по сравнению с комбинацией двух антител, H4H17082P2 и H4H16992P, как показано в таблице 13.

[00271] Четыре моноклональных антитела, H4H17082P2, H4H17038P2, H4H16987P и H4H16992P, впоследствии испытывали в качестве отдельных антител и комбинаций из 2, 3 и 4 моноклональных антител в анализе зависимости блокирования от дозы с образцами от 3 доноров IgE. Результаты показали, что комбинация двух моноклональных антител к Bet v 1, H4H17082P2 и H4H16992P, блокировала связывание Bet v 1 с аллерген-специфическим IgE больше чем 90% и близко к исходному уровню у 3 доноров, как показано в таблице 14. Исследуемые комбинации 3- и 4- антител показали сходную широту и интенсивность блокирующей активности. В качестве положительного контроля очищенный мышинный поликлональный IgG к Bet v 1 продемонстрировал >90% блокирования.

Таблица 12: Антитела к Bet v 1, блокирующие связывание Bet v 1 с аллерген-специфическим IgE

Идентификационный номер донора	23397-РВ	24606-АВ
Антитела	% блокирования связывания Bet v 1 с захваченным IgE	
H4H17082P2 МАВ2	56,6	60,3
H4H16971P	35,4	12,8
H4H17027P	23,0	28,4
H4H17028P	19,7	16,6
H4H16946P	27,6	22,8
H4H17038P2 МАВ3	49,0	55,3
H4H16950P	32,3	20,7
H4H16987P МАВ4	15,2	12,8
H4H17045P2	27,4	27,2
H4H17067P2	25,7	22,2
H4H16967P	21,8	23,5
H4H17015P	41,8	63,4
H4H16979P	33,6	12,9

H4N16991P	30,0	32,6
H4N17033P	51,8	49,0
H4N16992 MAB1	36,7	64,4
H4N16960P	8,5	17,6
H4N17031	16,7	20,5
H4N17001P	47,2	52,7
H4N16943P	47,7	52,5

Для этих анализов плазму донора с аллергией разводили 1:50.

Таблица 13: Отдельные антитела и комбинации антител, блокирующие связывание Bet v 1 с аллерген-специфическим IgE

ID донора:	23658- MD	23939- MH	23035- BL	25414- CW	25340- RR	25299- RJ	25609- MS	26532- CC	29718- MW	22627- MN
Антитела	% блокирования (при концентрации 1 мкг/мл каждого антитела)									
H4N17082P2 MAB2	62	79	52	38	81	66	51	74	49	61
H4N17038P2 MAB3	24	17	36	23	28	24	17	23	14	23
H4N16987P MAB4	27	16	-46	-4	15	9	16	4	13	12
H4N16992P MAB1	44	53	43	53	67	70	89	80	82	62
H4N17082P2 + H4N17038P2	70	85	73	57	90	78	65	83	60	79
H4N17082P2 + H4N16987P	74	88	21	45	84	69	65	75	61	76
H4N17082P2 + H4N16992P	79	93	72	77	91	91	98	94	94	96
H4N17038P2 + H4N16987P	47	31	16	28	41	29	33	29	28	47
H4N17038P2 + H4N16992P	58	62	51	77	83	75	93	87	87	77
H4N16987P + H4N16992P	61	61	-6	63	75	69	94	81	89	64

Н4Н17082Р2 + Н4Н17038Р2 + Н4Н16987Р	78	88	39	63	91	79	72	83	68	85
Н4Н17082Р2 + Н4Н17038Р2 + Н4Н16992Р	83	92	65	91	96	89	98	94	94	90
Н4Н17082Р2 + Н4Н16987Р + Н4Н16992Р	83	91	16	85	91	79	96	90	95	78
Н4Н17038Р2 + Н4Н16987Р + Н4Н16992Р	71	69	3	82	88	71	95	86	93	76
Н4Н17082Р2 + Н4Н17038Р2 + Н4Н16987Р + Н4Н16992Р	86	93	44	89	95	84	98	94	97	87
Биотинилир. Bet v 1 (без антитела) в конц. 0,1 нМ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Изотипический контроль	-3	-2	-5	-4	-1	-4	-2	-4	-2	-3

Плазму доноров с аллергией нормировали к титру или 1:20 (6 доноров), или 1:10 (3 донора), или 1:9 (1 донор) Bet v 1-специфического IgE и затем разводили 1:50 для этого анализа.

Таблица 14: Комбинации антител, блокирующие связывание Bet v 1 с аллерген-специфическим IgE

ID донора:	23939-МН	25340-RR	25609-MS
Антитело	% блокирования (при концентрации 1 мкг/мл каждого антитела)		
Н4Н17082Р2	82,9	82,7	56,4
Н4Н17038Р2	20,2	23,2	22,8
Н4Н16987Р	19,6	11,1	21,6

H4H16992P	63,3	70,2	86,9
H4H17082P2 + H4H16992P	94,8	93,8	96,5
H4H17082P2 + H4H17038P2 + H4H16992P	93,4	96,4	95,2
H4H17082P2 + H4H16987P + H4H16992P	91,5	93,1	94,2
H4H17082P2 + H4H17038P2 + H4H16987P + H4H16992P	92,6	95,4	95,7
Изотипический контроль	16,8	10,6	8,8
Очищенный мышинный IgG к Bet v 1 в конц. 333,3 нМ	92,7	93,9	94,6

Пример 6: Эпитопное картирование антител к Bet v 1, связывающихся с Bet v 1, с помощью водородно-дейтериевого (H/D) обмена

[00272] Для определения аминокислотных остатков Bet v 1 [(аминокислоты M1-N160 согласно Uniprot P15494], с которыми взаимодействуют H4H16992P2, H4H17082P2, H4H17038P2 и H4H16987P, выполняли эпитопное картирование с помощью H/D-обмена с масс-спектрометрией. Общее описание способа обмена H/D изложено, например, в Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; и Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

[00273] Эксперименты HDX-MS проводили на интегрированной платформе Waters HDX/MS, состоящей из системы Leaptac HDX PAL для мечения дейтерием, Waters Acquity M-Class (вспомогательное устройство управления растворителями) для обработки и загрузки образца, Waters Acquity M-Class (устройство управления растворителями μ Binary) для аналитического градиента колонки и масс-спектрометра Synapt G2-Si для измерения массы пептидного пептида.

[00274] Раствор для мечения получали в 10 мМ буфере PBS в D₂O при рD 7,0 (эквивалентно рН 6,6). Для мечения дейтерием 3,8 мкл природного Bet v 1 (Indoor Biotech,

№ по кат. NA-BV1-1, 28 пмоль/мкл), Bet v 1, предварительно смешанного с каждым антителом, или смесь всех 4 антител к Bet v 1 в молярном соотношении 1:1 инкубировали с 56,2 мкл D₂O-раствора для мечения в различные моменты времени (например, недейтерированный контроль = 0 секунд, меченый в течение 1 минуты, 5 минут, 10 минут и 20 минут). Дейтерирование гасили путем переноса 50 мкл образца в 50 мкл предварительно охлажденного 0,2 М TCEP, 6 М гуанидинхлорида в 100 мМ фосфатном буфере, pH 2,5 (буфер гашения), и смешанный образец инкубировали при 1,0°C в течение 2 минут. Затем подвергнутый гашению образец вводили в устройство управления Waters HDX Manager для онлайн-расщепления пепсином/протеазой XIII. Расщепленные пептиды захватывали на предварительной колонке ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм, 2,1 × 5 мм VanGuard при 0°C и элюировали на аналитической колонке ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм, 1,0 × 50 мм в течение 9 минутного градиентного разделения 5-40% В (подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде, подвижная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле). Масс-спектрометр устанавливали на напряжение на конусе, составляющее 37 В, время сканирования 0,5 с и диапазон масса/заряд 50-1700 Th.

[00275] Для идентификации пептидов из Bet v 1 данные LC- MS^E от недейтерированного образца обрабатывали и проводили поиск в базе данных, включая в себя Bet v 1 и ее рандомизированную последовательность, с помощью программного обеспечения Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Идентифицированные пептиды импортировали в программное обеспечение DynamX и фильтровали по двум критериям: 1) минимальное количество продуктов на аминокислоту: 0,3 и 2) порог файла репликации: 3. Программное обеспечение DynamX затем автоматически определило поглощение дейтерия каждым пептидом на основании времени удерживания и высокой точности массы (<10 м.д.) в нескольких временных точках с 3 повторениями в каждый момент времени.

[00276] С использованием онлайн-колонки, содержащей пепсин/протеазу XIII, в сочетании со сбором данных MS^E, в общей сложности 36 пептидов из Bet v 1 были воспроизводимо идентифицированы при отсутствии или в присутствии антитела, что составляет 91,2% охвата последовательности. Пептиды со значительно сниженным поглощением дейтерирования, когда они связаны с комбинациями 4 антител H4N16992P2, H4N17082P2, H4N17038P2, H4N16987P, проиллюстрированы на фиг. 1-4 и 5 соответственно. Зарегистрированная масса пептида соответствует среднему значению центроидной массы МН + из трех параллелей Bet v 1 в комплексе с антителом или антителами к Bet v 1.

[00277] Как показано на фигуре 1, пептиды, соответствующие аминокислотам 23-43 (FILDGDNLFPKVAPQAISSE, SEQ ID NO: 307), характеризовались более медленной скоростью дейтерирования в присутствии H4H16992P.

[00278] Как показано на фигуре 2, пептиды, соответствующие аминокислотам 44-56 (NIEGNNGPGTIKK, SEQ ID NO: 308), характеризовались более медленной скоростью дейтерирования в присутствии H4H17082P.

[00279] Как показано на фигуре 3, пептиды, соответствующие аминокислотам 2-19 (GVFNJETETTSVIPAARL, SEQ ID NO: 309), характеризовались более медленной скоростью дейтерирования в присутствии H4H17038P2.

[00280] Как показано на фигуре 4, пептиды, соответствующие аминокислотам 57-70 (ISFPEGFPFKYVKD, SEQ ID NO: 310) и 81-96 (KYNYSVIEGGPIGDTL, SEQ ID NO: 315), характеризовались более медленной скоростью дейтерирования в присутствии H4H16987P.

[00281] Как показано на фигуре 5, пептиды, соответствующие аминокислотам 23-43 (FILDGDNLFPKVAPQAISSE, SEQ ID NO: 307), аминокислотам 44-56 (NIEGNNGPGTIKK, SEQ ID NO: 308), 2-19 (GVFNJETETTSVIPAARL, SEQ ID NO: 309), аминокислотам 57-70 (ISFPEGFPFKYVKD, SEQ ID NO: 310) и 81-96 (KYNYSVIEGGPIGDTL, SEQ ID NO: 315), характеризовались более медленными скоростями дейтерирования в присутствии комбинации 4 антител к Bet v 1 (H4H16992P, H4H17082P, H4H17038P2 и H4H16987P).

[00282] Кроме того, невысокий уровень защиты наблюдали для пептида 23-43 в присутствии H4H17082P, H4H17038P2 и H4H16987P, что указывает на то, что эта область могла представлять вторичный эпитоп для этих моноклональных антител.

Пример 7: Эффект антител к Bet v 1 на модель пассивной кожной анафилаксии (РСА) *in vivo*

[00283] Для определения эффективности антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению в отношении блокирования индуцированной аллергеном дегрануляции тучных клеток использовали модель пассивной кожной анафилаксии (РСА) *in vivo*. Эта модель предусматривает интрадермальную инъекцию аллерген-специфической иммунной сыворотки в локальную область на коже с последующей внутривенной инъекцией антигена вместе с красителем. Аллергический ответ вызывает расширение капилляров и повышенную проницаемость сосудов в месте сенсibilизации, что приводит к преимущественному накоплению красителя в этом месте. Краситель можно экстрагировать из ткани и количественно определить спектрофотометрически. Экстравазацию красителя в ткань, сенсibilизированную исследуемой иммунной

сывороткой, можно затем сопоставить с экстравазацией в ткань, сенсibilизированную нерелевантной иммунной сывороткой.

[00284] Иммунные сыворотки получали для использования в анализе путем иммунизации мышей Balb/c 5 мкг природного белка Bet v 1 (Indoor Biotechnologies, № по кат. NA-BV1-1) в растворе 1 мг/мл квасцов в 1× забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) в день 0. Через неделю (день 7) сенсibilизированным мышам вводили бустер-дозу 5 мкг природного белка Bet v 1 в растворе 1 мг/мл квасцов в 1× PBS. Через две недели после бустер-дозы мышей подвергали интраназальной стимуляции через дыхательные пути с помощью 0,5 мкг природного белка Bet v 1 в 20 мкл PBS в дни 21, 24 и 28. Затем мышей умерщвляли на 31 день и собирали сыворотку. Общую концентрацию IgE в выделенной иммунной сыворотке определяли с использованием набора ELISA OptEIA™ (BD Biosciences, № по кат. 555248) в соответствии с инструкциями производителя. Конечную концентрацию иммунной сыворотки Bet v 1 разбавляли до 2600 нг/мл IgE в PBS.

[00285] Иммунные сыворотки, используемые в качестве отрицательного контроля в анализе, получали путем иммунизации мышей Balb/c с помощью 5 мкг природного белка Fel d 1, очищенного из экстракта шерсти кошки (Indoor Biotechnologies, № по кат. LTN-FD1-1), в растворе 1 мг/мл квасцов в PBS на 0 день. Мышам вводили бустер-дозу - 5 мкг белка Fel d 1 в растворе 1 мг/мл квасцов в PBS на 14 и 21 день. Через неделю после последней бустер-дозы (28 день) мышей умерщвляли и собирали сыворотку. Общую концентрацию IgE в выделенной иммунной сыворотке определяли с использованием набора ELISA OptEIA™ (BD Biosciences, № по кат. 555248) в соответствии с инструкциями производителя. Конечную концентрацию иммунных сывороток разбавляли до 2500 нг/мл IgE в PBS.

[00286] Для анализов PCA группам мышей Balb/c ($n \geq 5$ на эксперимент) сначала подкожно вводили либо антитело изотипического контроля, либо антитело к Bet v 1, либо комбинацию антител к Bet v 1 в дозе, составляющей 1 мг/кг (общая доза антитела). Через три дня после введения антитела 10 мкл либо 1,5 нг иммунной сыворотки Bet v 1, либо 3 нг иммунной сыворотки - отрицательного контроля вводили с помощью инъекции в правое и левое уши мышей в каждой группе соответственно. Через двадцать четыре часа после местного введения аллерген-специфических иммунных сывороток мышей подвергали стимуляции путем внутривенной инъекции (100 мкл на мышь) раствора 1 мкг/мл природного Bet v 1, растворенного в PBS, содержащего 0,5% (масс./об.) красителя Эванса голубого (Sigma Aldrich, № по кат. E2129). Через один час после стимуляции антигеном мышей умерщвляли, их уши отрезали, помещали в 1 мл формамида и затем инкубировали в течение 3 дней при 50-56°C для экстракции красителя Эванса голубого.

Затем ткань ушей удаляли из формамида, промокали для удаления избытка жидкости и взвешивали. Аликвоты по двести микролитров каждого экстракта формамида переносили в 96-луночные планшеты в двух параллелях и затем измеряли их оптическую плотность при 620 нм. Измеренную оптическую плотность преобразовывали в концентрацию красителя Эванса голубого с использованием стандартной кривой и представляли как нг красителя Эванса голубого на мг ткани. Средние значения \pm стандартное отклонение приведены в таблице 15 для каждой группы. Разность средних по сравнению с изотипическим контролем рассчитывали с использованием критерия множественных сравнений Бонферрони в GraphPad Prism.

[00287] Как показано в таблице 15, в первом исследовании отдельное антитело к Bet v 1, H4N17082P2, не продемонстрировало значимого снижения экстравазации красителя по сравнению с изотипическим контролем. В отличие от этого в исследовании 2 комбинация двух антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению (H4N16992P и H4N17082P2) и комбинация четырех антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению (H4N16992P, H4N17082P2, H4N17038P2 и H4N16987P) продемонстрировала значимое снижение экстравазации красителя по сравнению с лечением с помощью изотипического контроля, со снижением, составляющим 35,26 и 36,49 нг/мг соответственно. Аналогично, в исследовании 3 комбинация двух антител к Bet v 1 согласно настоящему изобретению (H4N16992P и H4N17082P2) вновь продемонстрировала значимое снижение экстравазации красителя по сравнению с лечением с помощью изотипического контроля со снижением, составляющим 41,09 нг/мг. Как было ранее продемонстрировано в исследовании 1, в исследовании 3 отдельное антитело к Bet v 1, H4N17082P2, не продемонстрировало значимое снижение экстравазации красителя по сравнению с изотипическим контролем. Однако другое отдельное антитело, H4N16992P, продемонстрировало значимое снижение экстравазации красителя по сравнению с изотипическим контролем со снижением, составляющим 25,86 нг/мг. Из проведенных исследований отдельное антитело H4N16992P, комбинация из двух антител H4N17082P2 + H4N16992P, а также комбинация из четырех антител H4N17082P2 + H4N16992P + H4N17038P2 + H4N16987P были способны блокировать дегрануляцию тучных клеток, о чем свидетельствует значимое снижение экстравазации красителя по сравнению с изотипическим контролем в модели пассивной кожной анафилаксии *in vivo*, как было определено с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Бонферрони. Антитело H4N17082P2 отдельно не могло блокировать дегрануляцию тучных клеток, на что указывает увеличение экстравазации красителя по сравнению с изотипом в двух проведенных исследованиях. Количество мышей, использованных на группу (n), указано в скобках в таблице.

Таблица 15: Эффект антител к Bet v 1 в модели пассивной кожной анафилаксии *in vivo*.

Группа лечения	Аллерген отрицательного контроля (нг Эванса голубого/мг ткани \pm SD)	Разность средних по сравнению с изотипическим контролем	Bet v 1 (нг Эванса голубого/мг ткани \pm SD)	Разность средних по сравнению с изотипическим контролем
<i>Исследование 1</i>				
H4H17082P2 (n=8)	2,1 \pm 0,9	-0,31	46,6 \pm 17,3	7,5
<i>Исследование 2</i>				
H4H17082P2 + H4H16992P (n=10)	6,3 \pm 3,8	1,807	8,3 \pm 7,7	-35,26 (****)
H4H17082P2 + H4H16992P + H4H17038P2 + H4H16987P (n=10)	7,6 \pm 5,5	3,090	7,1 \pm 4,1	-36,49 (****)
<i>Исследование 3</i>				
H4H17082P2 (n=5)	6,5 \pm 1,4	-0,311	89,4 \pm 28,3	27,37 (*)
H4H16992P (n=5)	6,4 \pm 2,1	-0,324	36,2 \pm 14	-25,86 (*)
H4H17082P2 + H4H16992P (n=5)	3,6 \pm ,31	-3,118	21 \pm 9,6	-41,09 (***)

1 мг/кг - общая концентрация антител, используемая для всех групп лечения с помощью антител

*P \leq ,05, ***P \leq ,001, ****P \leq ,0001

n= число мышей в каждой группе

Пример 8: Эффект антител к Bet v 1 по отношению к трем различным экстрактам пыльцы березы в модели пассивной кожной анафилаксии (PCA) *in vivo*

[00288] Предусмотренные в настоящем документе антитела к Bet v 1 исследовали в отношении эффективности блокирования индуцированной аллергеном дегрануляции тучных клеток в модели пассивной кожной анафилаксии (PCA) *in vivo*. Аллерген-специфическую иммунную сыворотку трансдермально вводили с помощью инъекции в локальную область на коже с последующей внутривенной инъекцией антигена вместе с красителем. Аллергический ответ вызывает расширение капилляров и

повышенную проницаемость сосудов в месте сенсибилизации, что приводит к преимущественному накоплению красителя в этом месте. Краситель можно экстрагировать из ткани и количественно определить спектрофотометрически. Экстравазацию красителя в ткань, сенсибилизированную исследуемой иммунной сывороткой, можно затем сравнить с экстравазацией в ткань, сенсибилизированную нерелевантной иммунной сывороткой.

[00289] Иммунные сыворотки к природному Bet v 1, экстракту пыльцы березы (BPE) *Betula pendula* (также известной как *Betula verrucosa*, BPE *Betula nigra* и BPE *Betula populifolia* получали для применения в анализе путем иммунизации мышей Balb/c с помощью 5 мкг природного белка Bet v 1 (Indoor Biotechnologies, № по кат. NA-BV1-1, № партии 36164) или 5 мкг BPE *Betula pendula* (Stallargenes Greer, № по кат. XP527D3A25, № партии 277329), *Betula nigra* (Stallargenes Greer № по кат. XP79D3A25, № партии 285077) или *Betula populifolia* (Stallargenes Greer № по кат. XP80D3A2.5, № партии 273622) в растворе 1 мг/мл квасцов в 1× забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) в день 0. Через неделю (день 7) сенсибилизированным мышам вводили бустер-дозу 5 мкг природного белка Bet v 1 или 5 мкг соответствующего BPE (*Betula pendula*, *nigra* или *populifolia*) в растворе 1 мг/мл квасцов в 1× PBS. Через две недели после бустер-дозы мышей подвергали интраназальной стимуляции через дыхательные пути с помощью 0,5 мкг природного белка Bet v 1 или 0,5 мкг соответствующего экстракта пыльцы березы в 20 мкл 1× PBS в дни 21, 24 и 28. Затем мышей умерщвляли на 31 день и собирали сыворотку. Общую концентрацию IgE в выделенных партиях иммунной сыворотке определяли с использованием набора ELISA OptEIA™ (BD Biosciences, № по кат. 555248) в соответствии с инструкциями производителя. Конечную концентрацию иммунных сывороток Bet v 1 разбавляли до 2500 нг/мл IgE в PBS и конечную концентрацию партий иммунных сывороток экстрактов пыльцы березы разбавляли до 3000 нг/мл для *Betula pendula*, 1900 нг/мл для *Betula nigra* и 3700 нг/мл для *Betula populifolia*.

[00290] Иммунные сыворотки, используемые в качестве отрицательного контроля в анализе, получали путем иммунизации мышей Balb/c с помощью 5 мкг природного белка Fel d 1, очищенного из экстракта шерсти кошки (Indoor Biotechnologies, № по кат. LTN-FD1-1, № партии 36099), в растворе 1 мг/мл квасцов в 1× PBS. Мышам вводили бустер-дозу - 5 мкг белка Fel d 1 в растворе 1 мг/мл квасцов в 1× PBS на 14 и 21 день. Через неделю после последней бустер-дозы (28 день) мышей умерщвляли и собирали сыворотку. Общую концентрацию IgE в выделенной иммунной сыворотке определяли с использованием набора ELISA OptEIA™ (BD Biosciences, № по кат. 555248) в соответствии с инструкциями производителя. Конечную концентрацию иммунных сывороток разбавляли до 4800 нг/мл IgE в PBS.

[00291] Для анализов РСА группам мышей Balb/c ($n \geq 4$ на эксперимент, повторяли три раза) сначала подкожно вводили либо антитело изотипического контроля, либо комбинацию двух антител к Bet v 1 в дозе, составляющей 1 мг/кг (общая доза антитела). Через три дня после введения антитела 10 мкл либо 1 нг иммунной сыворотки Bet v 1, либо 25 нг иммунной сыворотки *Betula pendula*, 25 нг иммунной сыворотки *Betula nigra* или 25 нг иммунной сыворотки *Betula populifolia* вводили с помощью инъекции в правое мышечное в каждой соответствующей группе. В левые уши вводили 1 нг или 25 нг Fel d 1 (отрицательный контроль) для соответствия концентрации иммунной сыворотки в соответствующем правом ухе. Через двадцать четыре часа после местного введения аллерген-специфических иммунных сывороток мышам подвергали стимуляции путем внутривенной инъекции (100 мкл на мышь) раствора 1 мкг/мл природного Bet v 1 (№ по кат. NA-BV1-1, № партии 36164) или 1 мкг/мл соответствующего BPE (Stallargenes Greer, № по кат. XP527D3A25, № партии 277329, № по кат. XP79D3A25, № партии 285077 и № по кат. XP80D3A2.5, № партии 273622), растворенных в $1 \times$ PBS, содержащего 0,5% (масс./об.) красителя Эванса голубого (Sigma Aldrich, № по кат. E2129). Через один час после стимуляции антигеном мышам умерщвляли, их уши отрезали, помещали в 1 мл формамида и затем инкубировали в течение 3 дней при 50°C для экстракции красителя Эванса голубого. Затем ткань ушей удаляли из формамида, промокали для удаления избытка жидкости и взвешивали. Аликвоты по двести микролитров каждого экстракта формамида переносили в 96-луночные планшеты в двух параллелях. Измеряли оптическую плотность полученных супернатантов при 620 нм. Измеренную оптическую плотность преобразовывали в концентрацию красителя Эванса голубого с использованием стандартной кривой и представляли как нг красителя Эванса голубого на мг ткани уха. Средние значения \pm стандартное отклонение приведены в таблице 16 для каждой группы. Разность средних по сравнению с изотипическим контролем рассчитывали с использованием критерия множественных сравнений Бонферрони в GraphPad Prism.

[00292] В таблице 16 продемонстрирована эффективность комбинации двух антител к Bet v 1, H4N16992P и H4N17082P2, на что указывает значимое снижение экстравазации красителя по сравнению с изотипическим контролем во всех исследованных группах. Как показано, комбинация из двух моноклональных антител к Bet v 1, H4N17082P2/H4N16992P, блокирует дегрануляцию тучных клеток в модели пассивной кожной анафилаксии *in vivo* в ответ на сенсibilизацию и последующую стимуляцию с помощью природного Bet v 1 по сравнению с изотипическим контролем, демонстрируя значимое снижение экстравазации красителя, составляющее 88,34. Аналогично, снижение экстравазации красителя также наблюдается в группе, получившей лечение с помощью

H4H17082P2/H4H16992P для всех трех экстрактов пыльцы березы по сравнению с соответствующими группами изотипического контроля со статистически значимыми снижениями, составляющими 62,52 для *Betula pendula*, 71,19 для *Betula nigra* и 91,47 для *Betula populifolia*. Разность средних по сравнению с изотипическим контролем рассчитывали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Бонферрони. Количество мышей, использованных на группу (n), указано в скобках в таблицах.

Таблица 16: Эффект антител к Bet v 1 в модели пассивной кожной анафилаксии (PCA) in vivo

Сенсибилизация и лечение	Отрицательный контроль аллерген (нг Эванса голубого/мг ткани \pm SD)	Разность средних по сравнению с изотипическим контролем	Bet v 1 или ВРЕ (нг Эванса голубого/мг ткани \pm SD)	Разность средних по сравнению с изотипическим контролем
1 нг nBet v 1 H4H17082P2+ H4H16992P (n \geq 14)	7,59 \pm 3,03	0,7623	9,56 \pm 3,53	-88,34 (****)
25 нг <i>Betula pendula</i> H4H17082P2+ H4H16992P (n \geq 14)	7,76 \pm 3,38	0,7337	15,54 \pm 8,21	-62,52 (****)
25 нг <i>Betula nigra</i> H4H17082P2+ H4H16992P (n \geq 14)	8,16 \pm 4,44	1,05	23,94 \pm 18,32	-71,19 (****)
25 нг <i>Betula populifolia</i> H4H17082P2+ H4H16992P (n \geq 14)	7,11 \pm 2,37	0,5416	10,09 \pm 5,90	-91,47 (****)

1 мг/кг - общая концентрация антител, используемая для всех групп лечения с помощью антитела

*P \leq 0,05, ***P \leq 0,001, ****P \leq 0,0001

n= число мышей на группу

Пример 9: Перекрестная конкуренция между моноклональными антителами к Bet v

1

[00293] Конкуренцию связывания в пределах панели различных моноклональных антител к Bet v 1 определяли с использованием анализа интерферометрии биослоя без меток в реальном времени на биосенсорной платформе Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере, содержащем 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, 1 мг/мл BSA, pH 7,4 (HBS-EBT) со встряхиванием планшета со скоростью, составляющей 1000 об/мин. Для оценки того, способны ли два антитела конкурировать друг с другом за связывание с их соответствующими эпитопами на рекомбинантном мутантном Bet v 1, экспрессированном с С-концевой мус-мус-гексагистиридиновой меткой (мутантный Bet v 1-ММН; SEQ ID NO: 312), приблизительно ~0,21 нМ мутантного Bet v 1-ММН вначале захватывали на наконечниках биосенсора Octet, покрытых антителами к пентагистиридиновой метке (ForteBio Inc, № по кат. 18-5122) путем погружения наконечников биосенсора в течение 90 секунд в лунки, содержащие 5 мкг/мл раствора мутантного Bet v 1-ММН. Наконечники биосенсора с захваченным антигеном затем насыщали первым моноклональным антителом к Bet v 1 (которое затем называют mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора mAb-1, в течение 4 минут. Затем наконечники биосенсора последовательно погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора второго моноклонального антитела к Bet v 1 (которое затем называют mAb-2) на 3 минуты. Наконечники биосенсора промывали в буфере HBS-EBT между каждой стадией эксперимента. Ответ связывания в режиме реального времени подвергали мониторингу в течение всего эксперимента и регистрировали ответ связывания в конце каждой стадии. Ответ связывания mAb-2 с мутантным Bet v 1-ММН, предварительно образовавшим комплекс с mAb-1, сравнивали и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных антител к Bet v 1, как показано в таблице 17.

[00294] Три из 20 моноклональных антител к Bet v 1 не связывались с мутантным Bet v 1-ММН и данные в отношении перекрестной конкуренции были признаны неубедительными.

**Таблица 17. Перекрестная конкуренция между моноклональными антителами к Vet
v 1**

mAb-1	mAb-2, которое конкурирует с mAb-1
H4H17082P2	H4H16971P
H4H16971P	H4H17082P2
	H4H17027P
	H4H17028P
	H4H16946P
	H4H17038P2
H4H17027P	H4H16971P
	H4H17028P
	H4H16946P
	H4H17038P2
	H4H16950P
H4H17028P	H4H16971P
	H4H17027P
	H4H16946P
	H4H17038P2
	H4H16950P
H4H16946P	H4H16971P
	H4H17027P
	H4H17028P
	H4H17038P2
	H4H16950P
H4H17038P2	H4H16971P
	H4H17027P
	H4H17028P
	H4H16946P
	H4H16950P
	H4H16979P
H4H16950P	H4H17027P
	H4H17028P

	H4H16946P
	H4H17038P2
	H4H17015P
H4H16987P	H4H17045P2
	H4H17067P2
	H4H16967P
H4H17045P2	H4H16987P
	H4H17067P2
	H4H16967P
	H4H17015P
H4H17067P2	H4H16987P
	H4H17045P2
	H4H16967P
	H4H17015P
H4H16967P	H4H16987P
	H4H17045P2
	H4H17067P2
	H4H17015P
	H4H16992P
H4H17015P	H4H16950P
	H4H17045P2
	H4H17067P2
	H4H16967P
	H4H16979P
	H4H16991P
	H4H17033P
	H4H16992P
H4H16979P	H4H17038P2
	H4H17015P
	H4H16991P
	H4H17033P
	H4H16992P
H4H16991P	H4H17015P
	H4H16979P

	H4H17033P
	H4H16992P
H4H17033P	H4H17015P
	H4H16979P
	H4H16991P
	H4H16992P
H4H16992P	H4H16967P
	H4H17015P
	H4H16979P
	H4H16991P
	H4H17033P
	H4H16960P
H4H16960P	H4H17031P
	H4H16992P
H4H17031P	H4H16960P
	IC*
H4H16943P	IC*
H4H17001P	IC*

*IC указывает на то, что моноклональные антитела к Bet v 1 не связывались с мутантным Bet v 1-ММН, и данные в отношении перекрестной конкуренции были признаны неубедительными.

Пример 10. Способность комбинаций антител к Bet v 1 блокировать дегрануляцию тучных клеток, индуцированную Bet v 1 в модели PCA у гуманизированных мышей

[00295] Для изучения поликлональности ответа аллерген-специфического IgE у людей с аллергией на березу использовали модель гуманизированной в отношении FcεR1α мыши для облегчения связывания IgE человека с FcεR1α на поверхности тучных клеток мыши. Поскольку IgE человека не может связываться с мышинным FcεR1α, создали генетически модифицированную мышшь, где эндогенный мышинный FcεR1α заменили соответствующей последовательностью FcεR1α человека и обозначили как *FcεR1α^{hu/hu}*. Мышей *FcεR1α^{hu/hu}* валидировали для использования в этой модели, демонстрируя поверхностную экспрессию FcεR1α человека и способность отвечать на активацию аллерген: IgE в модели пассивной кожной анафилаксии (PCA) способом, сравнимым с

мышами дикого типа. Эта модель PCA включает в себя интрадермальную инъекцию аллерген-специфических сывороток человека в локальную область на коже с последующей внутривенной инъекцией релевантного аллергена вместе с красителем. Аллергический ответ вызывает расширение капилляров и повышенную проницаемость сосудов в месте сенсibilизации, что приводит к преимущественному накоплению красителя в этом месте. Краситель можно экстрагировать из ткани и количественно определить спектрофотометрически. Экстравазацию красителя в ткани, сенсibilизированной исследуемой иммунной сывороткой, сравнивают с экстравазацией в ткани, сенсibilизированной не аллерген-специфическими сыворотками человека.

Способы

[00296] Для определения влияния антител к Bet v 1 на дегрануляцию тучных клеток в этой модели, гуманизированные в отношении FcεR1α мыши получали подкожную инъекцию изотипического контрольного антитела или комбинации антител к Bet v 1 в день 1. Для каждого донора-человека проводили два независимых эксперимента, n = 5 мышей на группу с объединенными данными. Группы состояли из следующего: не включающий в себя моноклональное антитело отрицательный контроль, отрицательный изотипический контроль, группа лечения двумя антителами к Bet v 1 REGN5713+REGN5715 и группа лечения тремя антителами к Bet v 1 REGN5713+REGN5714+REGN5715. Общая концентрация или концентрация комбинированных антител составляла 1 мг/кг или концентрация антитела изотипического контроля IgG4 (антитело к IL6R2 в качестве отрицательного изотипического контроля). Три дня спустя сыворотку от пациентов с аллергией на березу или сыворотку от пациентов без аллергии на березу (отрицательный контроль) вводили интрадермально (ID) в правое и левое уши, соответственно, позволяя аллерген-специфическому IgE связываться с FcεR1 на тучных клетках. Чтобы гарантировать, что в эксперименте использовалось одинаковое количество аллерген-специфического IgE от каждого донора, каждую инъекцию иммунной сыворотки нормализовали по концентрации Bet v 1-специфического IgE ImmunoCAP®, составляющей 10 кЕ_a/л.

[00297] Через двадцать четыре часа после местного введения аллерген-специфических антител мышей стимулировали с помощью внутривенной инъекции 1 мкг Bet v 1, разведенного в PBS, содержащем 0,5% красителя Эванса голубого. Через час после стимуляции аллергеном мышей умерщвляли. Краситель Эванса голубой экстрагировали из ушной ткани и количественно определяли спектрофотометрически с использованием стандартной кривой. (См. диаграмму используемого протокола на фиг. 6). Снижение экстравазации красителя Эванса голубого рассчитывали в среднем путем вычитания

концентрации красителя Эванса голубого (нормализованной по массе ткани уха) для уха, в которое вводили сыворотку, специфическую в отношении аллергена березы, в получавшей лечение с помощью антител группе, В(mAb, i), из группы, получавшей лечение с помощью антитела изотипического контроля, В (изотип, среднее). Затем это число разделили на разницу между В(изотип, среднее) и концентрацией красителя для уха, в которое вводили не специфическую в отношении аллергена сыворотку, в получавшей лечение с помощью антител группе [N(mAb, i)], и умножали на 100 с получением общего среднего процентного снижения экстравазации красителя (% снижения). Уравнение показано ниже:

$$\% \text{ снижения (среднее)} = 100 * [B(\text{изотип, среднее}) - B(\text{mAb, i})] / [B(\text{изотип, среднее}) - N(\text{mAb, i})]$$

[00298] Увеличение % снижения в утечке красителя в получившей лечение с помощью антитела к Bet v1 группе по сравнению с группой отрицательного изотипического контроля представляет собой меру эффективности антитела к Bet v 1 или комбинаций антител в блокировании дегрануляции тучных клеток.

Результаты

[00299] В этой модели комбинированное использование антител к Bet v 1, обозначенных H4N16992P (также обозначаемое как REGN5713), H4N17038P2 (также обозначаемое как REGN5714) и H4N17082P2 (также обозначаемое как REGN5715), продемонстрировало максимальное блокирование опосредованного IgE ответа при использовании сывороток, содержащих IgE, от 3/3 доноров с аллергией на березу (см. фиг. 7). Использование сывороток от донора с аллергией на березу 25609, H4N16992P, H4N17038P2 и H4N17082P2 в комбинации показало 95% блокаду дегрануляции тучных клеток по сравнению с изотипическим контролем (различие средних $-42,04 \pm 6,9$ ($p < 0,0001$)) и комбинированное использование H4N16992P и H4N17082P2 показало 93% блокаду дегрануляции тучных клеток по сравнению с изотипическим контролем (различие средних $-41,74 \pm 3,7$ ($p < 0,0001$)). Использование сывороток от донора с аллергией на березу 23658, H4N16992P, H4N17038P2 и H4N17082P2 в комбинации показало 90% блокаду дегрануляции тучных клеток по сравнению с изотипическим контролем (различие средних $-53,67 \pm 7,1$ ($p < 0,0001$)) и H4N16992P в комбинации с H4N17082P2 показало 74% блокаду дегрануляции тучных клеток по сравнению с изотипическим контролем (различие средних $-44,58 \pm 11,4$ ($p < 0,0001$)). В итоге, использование сывороток от донора с аллергией на березу 25414, H4N16992P, H4N17038P2 и H4N17082P2 в комбинации показало 92% блокаду дегрануляции тучных клеток по сравнению с изотипическим контролем (различие средних $-39,72 \pm 7,5$ ($p < 0,0001$)) и H4N16992P в комбинации с

H4H17082P2 показало 80% блокаду дегрануляции тучных клеток по сравнению с изотипическим контролем (различие средних $-34,27 \pm 7,8$ ($p < 0,0001$)).

Пример 11. Способность комбинаций антител к Bet v 1 блокировать активацию базофилов в анализе фосфоресцентной проточной цитометрии с использованием фосфо-Erk

[00300] Ответ IgE человека исследовали путем испытания эффекта различных комбинаций антител к Bet v 1 H4H16992P (также обозначаемое как REGN5713), H4H17038P2 (также обозначаемое как REGN5714) и H4H17082P2 (также обозначаемое как REGN5715) на ингибирование активации базофилов с использованием образцов от 8 индивидуумов с аллергией на березу. Более конкретно, для оценки связывания с FcεR и активации базофилы исследовали в функциональном анализе на основе фосфоресцентной проточной цитометрии, в котором измеряют фосфорилирование киназы ERK, приближенного показателя активации базофилов и дегрануляции (Liu, Y. et al. (2007), *J Exp Med* 204, 93-103).

Способы

[00301] Производили забор крови у пациентов с аллергией на березу ($n = 8$) и РВМС выделяли центрифугированием с плотностью на слое фикола, отмывали, ресуспендировали и высевали в виде отдельных точек в 96-луночном формате. Параллельно готовили планшет 2-кратной стимуляции, который включал в себя эффект дозы очищенного Bet v 1, а также эффекты доз антител к Bet v 1 и комбинаций антител (2,56 пМ-200 нМ), смешанных с постоянной дозой (конечная концентрация 100 пМ) очищенного природного Bet v 1. Клетки стимулировали и затем окрашивали коктейлем антител, содержащим антитела pErk-Alexa 488, CD123-BUV395 и HLA-DR-APC. После окрашивания данные получали с использованием инструмента LSR-Fortessa и проанализировали путем расчета MFI окрашивания фосфорилированного Erk в пределах гейта базофилов. Процент максимального ингибирования рассчитывали как: $100 - ((100 \times \text{максимальный ответ антитела}) / \text{ответ изотипа})$. Максимальным ответом антитела являлась средняя медианная интенсивность флуоресценции (MFI) фосфорилированного Erk в трех верхних дозах антитела на кривой зависимости ответа от дозы (плато кривой) минус исходное значение MFI (средняя для нестимулированных образцов в параллелях), а ответ изотипа представляет собой среднее всех значений MFI в эффекте дозы антитела изотипического контроля, производимого Regeneron (REGN1945 антитело к Fel d 1 IgG4^P) минус исходное значение MFI.

Результаты

[00302] Базофилы от всех 8 индивидуумов с аллергией на пыльцу березы ответили на стимуляцию Bet v 1 с различной интенсивностью. См. фиг. 8. Н4Н16992Р, Н4Н17038Р2 и Н4Н17082Р2 ингибировали по меньшей мере 70% активации базофилов у 8/8 доноров, тогда как комбинация Н4Н16992Р с Н4Н17082Р2 достигала такой же величины ингибирования у 6/8 доноров. Примечательно, что отдельные антитела при испытании отдельно демонстрировали высокую степень вариабельности в способности влиять на связывание аллергена с IgE. Н4Н16992Р достигало $\geq 70\%$ блокады у 3/8 доноров, а Н4Н17082Р2 достигало 70% блокады активации базофилов у 4/8 доноров. Н4Н17038Р2 продемонстрировало 70% блокирование только у 1/8 исследованных доноров.

Пример 12: Определение одновременного связывания трех моноклональных антител к Bet v 1 с природным Bet v 1

[00303] Этот эксперимент проводили, чтобы убедиться, что эпитопы связывания трех выбранных моноклональных антител к Bet v 1 являлись уникальными и что независимо от порядка связывания моноклональных антител стерическое препятствие не проявлялось при одновременном связывании трех антител. Кроме того, оценивали зависимость от порядка конкуренцию между тремя моноклональными антителами к Bet v 1.

[00304] Одновременное связывание трех моноклональных антител к Bet v 1 с одним и тем же Bet v 1 определяли с использованием биосенсорной платформы Biacore 3000 на основе поверхностного плазмонного резонанса без меток в режиме реального времени (GE Healthcare). Весь эксперимент проводили при 25°C в рабочем буфере, содержащем 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET). Антитела иммобилизовали на разных поверхностях сенсора CM5 с использованием химии EDC/NHS для достижения уровней иммобилизации, составляющих 5000 - 13000 PE. REGN1945 (моноклональное антитело к Fel d 1) также иммобилизовали в качестве отрицательного контроля. Природный Bet v 1 (nBet v 1), 10 нМ или 20 нМ, вводили поверх различных поверхностей сенсора, иммобилизованных моноклональными антителами к Bet v 1, в течение 10-12 секунд с последующим последовательным введением различных моноклональных антител к Bet v 1 в течение 6 минут при скорости потока, составляющей 15 мкл/мин.

[00305] Связывание различных моноклональных антител к Bet v 1 с nBet v 1, связанным с поверхностью сенсора, иммобилизованной моноклональным антителом, измеряли с использованием Scrubber 2.0с. Результаты показаны в таблице 18. Сигнал связывания менее 1 PE (RU, резонансная единица) указывает на то, что связывание не

наблюдалось при введении моноклонального антитела к Bet v 1, в то время как более высокий сигнал связывания (более 2 PE) представляет отсутствие конкуренции. Все три моноклональных антитела к Bet v 1, включенные в этот пример, были способны одновременно связываться с nBet v 1, и на реакцию связывания не влиял порядок, в котором добавляли антитела.

Таблица 18: Конкуренция одновременного связывания антител к Bet v 1

		Последовательное связывание 3 моноклональных антител к Bet v 1					
Моноклональное антитело к Bet v 1, иммобилизованное на поверхности	Связыв. nBet v 1 (PE)	mAb-1	Связыв. mAb-1 (PE)	mAb-2	Связыв. mAb-2 (PE)	mAb-3	Связыв. mAb-3 (PE)
REGN5713	10	REGN5713	0	REGN5714	59	REGN5715	44
	11		0	REGN5715	48	REGN5714	53
	10	REGN5714	59	REGN5713	-3	REGN5715	43
	10		60	REGN5715	43	REGN5713	-6
	10	REGN5715	46	REGN5713	-4	REGN5714	54
	10		46	REGN5714	54	REGN5713	-5
REGN5714	14	REGN5713	67	REGN5714	-4	REGN5715	40
	14		63	REGN5715	38	REGN5714	-5
	13	REGN5714	1	REGN5713	48	REGN5715	30
	13		1	REGN5715	35	REGN5713	42
	12	REGN5715	42	REGN5713	47	REGN5714	-3
	12		40	REGN5714	-2	REGN5713	44
REGN5715	14	REGN5713	62	REGN5714	69	REGN5715	-5
	14		60	REGN5715	-4	REGN5714	67
	13	REGN5714	73	REGN5713	56	REGN5715	-5
	13		73	REGN5715	-3	REGN5713	54
	12	REGN5715	-1	REGN5713	51	REGN5714	65
	12		0	REGN5714	69	REGN5713	47

Данные представляют собой среднее по меньшей мере 3 независимых инъекций моноклональных антител к Bet v 1 на комплекс nBet v 1 и иммобилизованное моноклональное антитело к Bet v 1.

Резюме

[00306] Независимо от порядка связывания антитела с Bet v 1, отсутствовала конкуренция, препятствующая одновременному связыванию всех трех антител, что позволяет предположить, что REGN5713, REGN5714 и REGN5715 связываются с неперекрывающимися различными эпитопами.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество, по меньшей мере, двух выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывается с природным Bet v 1 или экстрактом пыльцы березы (BPE) вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемым вспомогательными веществами, при этом антитела или их антигенсвязывающие фрагменты выбраны из группы, состоящей из:

(a) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 292; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 294; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 296; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 300; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 302; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 304;

(b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160;

(c) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; и

(d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124; LCDR2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128; и

где фармацевтическая композиция не включает комбинацию (a) и (d).

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, содержащая терапевтически эффективное количество двух выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1, содержащая терапевтически эффективное количество трех выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов.

4. Фармацевтическая композиция по п. 1, содержащая терапевтически эффективное количество четырех выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-4, причем антитела или их антигенсвязывающие фрагменты выбраны из группы, состоящей из:

(a) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 298;

(b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146 и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154;

(c) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98 и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106;

(d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114 и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122.

6. Фармацевтическая композиция по п. 5, содержащая терапевтически эффективное количество двух выделенных моноклональных антител человека.

7. Фармацевтическая композиция по п. 6, причем два выделенных моноклональных антитела человека представляют собой:

антитело, содержащее HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 298; и

антитело, содержащее HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146 и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154.

8. Фармацевтическая композиция по п.5, содержащая терапевтически эффективное количество трех выделенных моноклональных антител человека.

9. Фармацевтическая композиция по п. 8, причем три выделенных моноклональных антитела человека представляют собой:

антитело, содержащее HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 298;

антитело, содержащее HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146 и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154; и

антитело, содержащее HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98 и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106.

10. Фармацевтическая композиция по п.5, содержащая терапевтически эффективное количество четырех выделенных моноклональных антител человека.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество первого моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с природным Bet v 1 или экстрактом пыльцы березы (BPE) и терапевтически эффективное количество второго моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с природным Bet v 1 или экстрактом пыльцы березы (BPE), при этом первое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 292; HCDR2, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 294; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 296; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 300; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 302; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 304; и где

второе моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество одного выделенного моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с природным Bet v 1 или экстрактом пыльцы березы (BPE), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из:

(a) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160;

(b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; и

(c) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118; HCDR3, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128.

13. Фармацевтическая композиция по п. 12, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из:

(a) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность HCVR, представленную в SEQ ID NO: 146 и аминокислотную последовательность LCVR, представленную в SEQ ID NO: 154;

(b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность HCVR, представленную в SEQ ID NO: 98 и аминокислотную последовательность LCVR, представленную в SEQ ID NO: 106; и

(c) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность HCVR, представленную в SEQ ID NO: 114 и аминокислотную последовательность LCVR, представленную в SEQ ID NO: 122.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество, по меньшей мере, двух выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывается с природным Bet v 1 или экстрактом пыльцы березы (BPE), при этом антитела или их антигенсвязывающие фрагменты выбраны из группы, состоящей из:

(a) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160;

(b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; LCDR2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; и

(с) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128.

15. Фармацевтическая композиция по п. 14, содержащая терапевтически эффективное количество двух выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов.

16. Фармацевтическая композиция по п.14, содержащая терапевтически эффективное количество трех выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество, по меньшей мере, двух выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывается с природным Bet v 1 или экстрактом пыльцы березы (BPE), при этом антитела или их антигенсвязывающие фрагменты выбраны из группы, состоящей из:

(а) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность HCVR, представленную в SEQ ID NO: 290 и аминокислотную последовательность LCVR, представленную в SEQ ID NO: 298;

(b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность HCVR, представленную в SEQ ID NO: 146 и аминокислотную последовательность LCVR, представленную в SEQ ID NO: 154;

(с) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность HCVR, представленную в SEQ ID NO: 98 и аминокислотную последовательность LCVR, представленную в SEQ ID NO: 106; и

(d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность HCVR, представленную в SEQ ID NO: 114 и аминокислотную последовательность LCVR, представленную в SEQ ID NO: 122.

18. Фармацевтическая композиция по п. 17, содержащая терапевтически эффективное количество двух выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов.

19. Фармацевтическая композиция по п.17, содержащая терапевтически эффективное количество трех выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов.

20. Фармацевтическая композиция по п. 17, содержащая терапевтически эффективное количество четырех выделенных моноклональных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество выделенного моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с природным $V\beta 1$ или экстрактом пыльцы березы (BPE) вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемым вспомогательными веществами, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой:

(a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160; или

(b) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; или

(c) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118; HCDR3, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128.

22. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1-21, составленная для подкожного или внутривенного введения.

23. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1-22, при котором ВРЕ выбран из *Betula pendula*, *Betula nigra* или *Betula populifolia*.

24. Способ лечения пациента, который демонстрирует чувствительность или аллергический ответ по отношению к белку Fagales, аллергену Fagales, пыльце березы или ее экстракту или белку Bet v 1, или лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с чувствительностью или аллергическим ответом по отношению к белку Fagales, аллергену Fagales, пыльце березы или ее экстракту или белку Bet v 1, причем способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из п.п. 1-23.

25. Способ по п. 24, при котором экстракт пыльцы березы выбран из группы, состоящей из природного Bet v 1, ВРЕ *Betula pendula*, ВРЕ *Betula nigra* и ВРЕ *Betula populifolia*.

26. Способ по п. 24, при котором аллерген Fagales выбирают из группы, состоящей из Bet v 1, Aln g1, Cor a1, Car b1 и Que a1.

27. Применение фармацевтической композиции по любому из п.п. 1-23 в получении лекарственного средства для лечения пациента, который демонстрирует чувствительность или аллергический ответ по отношению к белку Fagales, аллергену Fagales, пыльце березы или ее экстракту или белку Bet v 1, или для лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с чувствительностью или аллергическим ответом по отношению к белку Fagales, аллергену Fagales, пыльце березы или ее экстракту или белку Bet v 1.

28. Применение по п. 27, при котором экстракт пыльцы березы выбран из группы, состоящей из природного Bet v 1, ВРЕ Betula pendula, ВРЕ Betula nigra и ВРЕ Betula populifolia.

29. Применение по п. 27, при котором аллерген Fagales выбирают из группы, состоящей из Bet v 1, Aln g1, Cor a1, Car b1 и Que a1.

30. Способ усиления эффективности и/или безопасности схемы аллерген-специфической иммунотерапии (SIT), причем способ предусматривает введение эффективного количества фармацевтической композиции по любому из п.п. 1-23, нуждающемуся в этом пациенту перед или одновременно с схемой SIT.

31. Применение фармацевтической композиции по любому из п.п. 1-23 в получении лекарственного средства для усиления эффективности и/или безопасности схемы аллерген-специфической иммунотерапии (SIT).

Пептиды Bet v 1 со значимой защитой при связывании с H4N16992P

Bet v 1	Дейтерирование – 1 мин			Дейтерирование – 5 мин		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4N16992P		Bet v 1	Bet v 1 + H4N16992P	
	Центроидн. МН ⁺	Центроидная МН ⁺	Δ	Центроидн. МН ⁺	Центроидная МН ⁺	Δ
23-38	1748.25	1747.47	-0.78	1749.37	1747.81	-1.56
23-41	2035.88	2035.14	-0.74	2037.97	2035.48	-2.49
23-43	2265.54	2264.25	-1.29	2267.30	2264.60	-2.70
26-43	1890.50	1889.99	-1.80	1891.61	1890.02	-1.58
29-43	1603.03	1602.35	-0.67	1603.78	1602.49	-1.29

Bet v 1	Дейтерирование – 10 мин			Дейтерирование – 20 мин		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4N16992P		Bet v 1	Bet v 1 + H4N16992P	
	Центроидн. МН ⁺	Центроидная МН ⁺	Δ	Центроидн. МН ⁺	Центроидная МН ⁺	Δ
23-38	1750.00	1748.05	-1.95	1750.83	1748.28	-2.55
23-41	2038.68	2035.86	-2.82	2039.74	2035.62	-4.12
23-43	2267.93	2264.97	-2.97	2268.94	2265.22	-3.72
26-43	1892.36	1890.15	-2.22	1893.15	1890.20	-2.95
29-43	1604.51	1602.69	-1.82	1605.34	1602.76	-2.59

ФИГУРА 1

Пептиды Bet v 1 со значимой защитой при связывании с H4N17082P

Bet v 1	Дейтерирование – 1 мин			Дейтерирование – 5 мин		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4N17082P2		Bet v 1	Bet v 1 + H4N17082P2	
Диапазон пептидов	Центроид. МН ⁺	Центроидн. МН ⁺	Δ	Центроидн. МН ⁺	Центроидная МН ⁺	Δ
44-56	1289.33	1286.44	-2.89	1289.83	1286.68	-3.16
44-70	2948.26	2945.90	-2.36	2949.94	2946.68	-3.26
45-56	1174.64	1172.13	-2.50	1175.00	1172.18	-2.83
57-66	1172.15	1172.31	0.16	1172.33	1172.62	0.29
57-70	1678.31	1678.21	-0.10	1678.93	1678.90	-0.03

Bet v 1	Дейтерирование – 10 мин			Дейтерирование – 20 мин		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4N17082P2		Bet v 1	Bet v 1 + H4N17082P2	
Диапазон пептидов	Центроид. МН ⁺	Центроидн. МН ⁺	Δ	Центроидн. МН ⁺	Центроидная МН ⁺	Δ
44-56	1290.49	1286.72	-3.77	1290.74	1286.91	-3.83
44-70	2950.45	2947.01	-3.45	2951.12	2947.05	-4.14
45-56	1175.04	1172.36	-2.69	1175.43	1172.49	-2.94
57-66	1172.48	1172.46	-0.02	1172.49	1172.61	0.12
57-70	1678.94	1678.82	-0.12	1679.17	1678.89	-0.28

ФИГУРА 2

Пептиды Bet v 1 со значимой защитой при связывании с H4N17038P2

Bet v 1	Дейтерирование – 1 мин			Дейтерирование – 5 мин		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4N17038P2		Bet v 1	Bet v 1 + H4N17038P2	
Диапазон пептидов	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ
2-19	1974.52	1972.83	-1.68	1975.52	1973.95	-1.57
5-10	758.44	758.01	-0.43	758.46	758.14	-0.31
5-19	1670.08	1669.3	-0.77	1670.94	1670.04	-0.9
8-19	1262.02	1261.68	-0.34	1262.96	1262.49	-0.46
11-19	929.74	929.46	-0.28	930.65	930.36	-0.29

Bet v 1	Дейтерирование – 10 мин			Дейтерирование – 20 мин		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4N17038P2		Bet v 1	Bet v 1 + H4N17038P2	
Диапазон пептидов	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ
2-19	1976.06	1974.38	-1.68	1976.36	1974.98	-1.39
5-10	758.48	758.18	-0.31	758.55	758.18	-0.36
5-19	1671.51	1670.47	-1.04	1671.91	1670.92	-0.98
8-19	1263.31	1262.9	-0.41	1263.57	1263.28	-0.29
11-19	931.1	930.7	-0.4	931.41	931.11	-0.31

ФИГУРА 3

Пептиды Bet v 1 со значимой защитой при связывании с H4N16987P

Bet v 1	Дейтерирование – 1 мин			Дейтерирование – 5 мин		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4N16987P		Bet v 1	Bet v 1 + H4N16987P	
Диапазон пептидов	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ
57-66	1172.27	1169.98	-2.38	1172.64	1170.04	-2.61
57-70	1678.61	1675.67	-2.94	1679.17	1676.05	-3.13
81-96	1731.22	1730.33	-0.89	1731.66	1730.77	-0.89
85-96	1162.24	1161.44	-0.79	1162.25	1161.74	-0.51
89-96	732.56	732.41	-0.19	732.57	732.52	-0.08

Bet v 1	Дейтерирование – 10 мин			Дейтерирование – 20 мин		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4N16987P		Bet v 1	Bet v 1 + H4N16987P	
Диапазон пептидов	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ
57-66	1172.74	1170.28	-2.46	1172.74	1170.46	-2.28
57-70	1679.38	1676.22	-3.16	1679.44	1676.44	-3
81-96	1731.67	1730.95	-0.72	1731.8	1731.27	-0.53
85-96	1162.27	1161.92	-0.34	1162.31	1162.06	-0.26
89-96	732.58	732.54	-0.08	732.62	732.53	-0.13

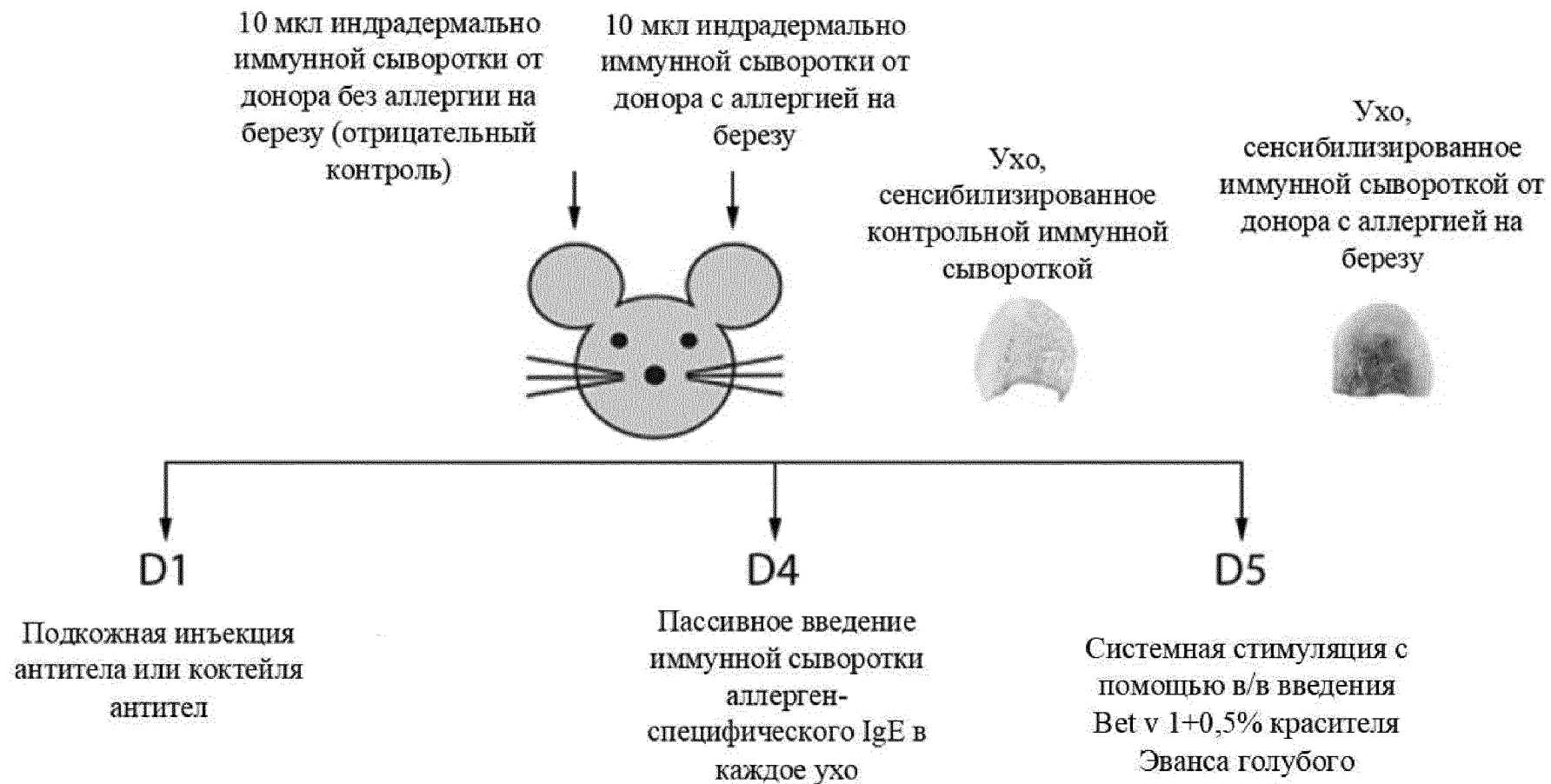
ФИГУРА 4

**Пептиды Bet v 1 со значимой защитой при связывании с комбинацией
4 антител H4N16992P, H4N17082P, H4N17038P2 и H4N16987P**

Bet v 1	Дейтерирование – 1 мин			Дейтерирование – 5 мин		
	Bet v 1	Bet v 1 + комб.		Bet v 1	Bet v 1 + комб.	
	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ
2-19	1974.69	1973.29	-1.41	1975.83	1973.96	-1.89
5-19	1670.16	1670.00	-0.41	1671.12	1670.00	-1.14
23-41	2265.84	2264.15	-1.75	2267.69	2264.35	-3.39
23-43	1228.61	1227.58	-1.04	1229.22	1227.62	-1.62
44-70	2948.40	2942.57	-5.75	2950.06	2943.03	-6.94
57-66	1171.88	1169.99	-1.44	1172.10	1169.99	-1.70
81-96	1731.58	1729.88	-1.72	1731.64	1729.99	-1.67
84-96	1325.51	1324.33	-1.24	1325.43	1324.67	-1.67

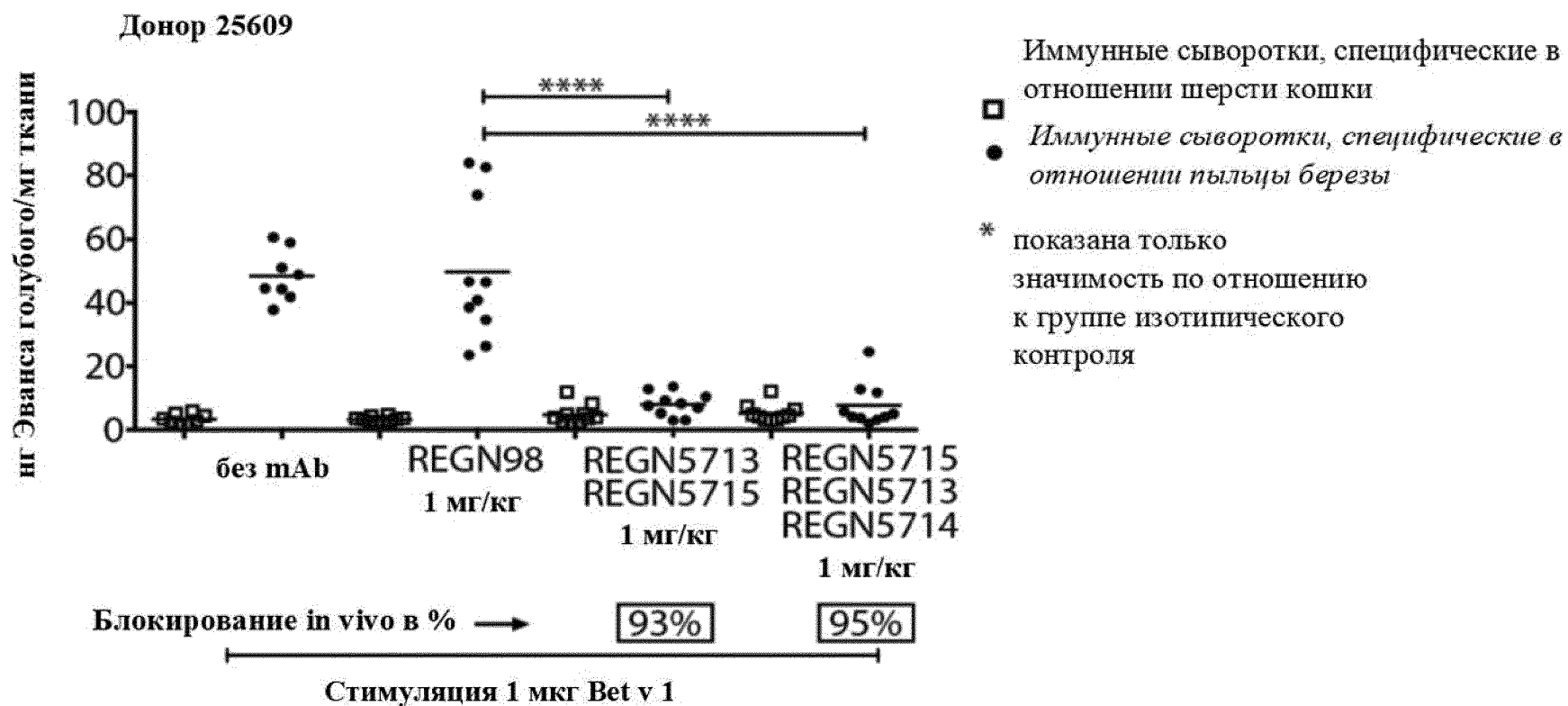
Bet v 1	Дейтерирование – 10 мин			Дейтерирование – 20 мин		
	Bet v 1	Bet v 1 + комб.		Bet v 1	Bet v 1 + комб.	
	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ	Центроид. МН ⁺	Центроид. МН ⁺	Δ
2-19	1976.61	1974.04	-2.59	1976.99	1974.04	-3
5-19	1671.77	1670.06	-1.74	1672.03	1670.12	-1.96
23-41	2268.43	2264.50	-3.98	2269.66	2264.72	-4.99
23-43	1230.15	1227.64	-2.52	1230.88	1227.71	-3.24
44-70	2950.52	2943.40	-7.03	2951.79	2943.42	-8.28
57-66	1172.18	1170.22	-1.56	1172.32	1170.09	-1.85
81-96	1731.76	1730.22	-1.57	1732.01	1730.61	-1.49
84-96	1325.53	1324.72	-1.57	1325.82	1324.98	-1.5

ФИГУРА 5



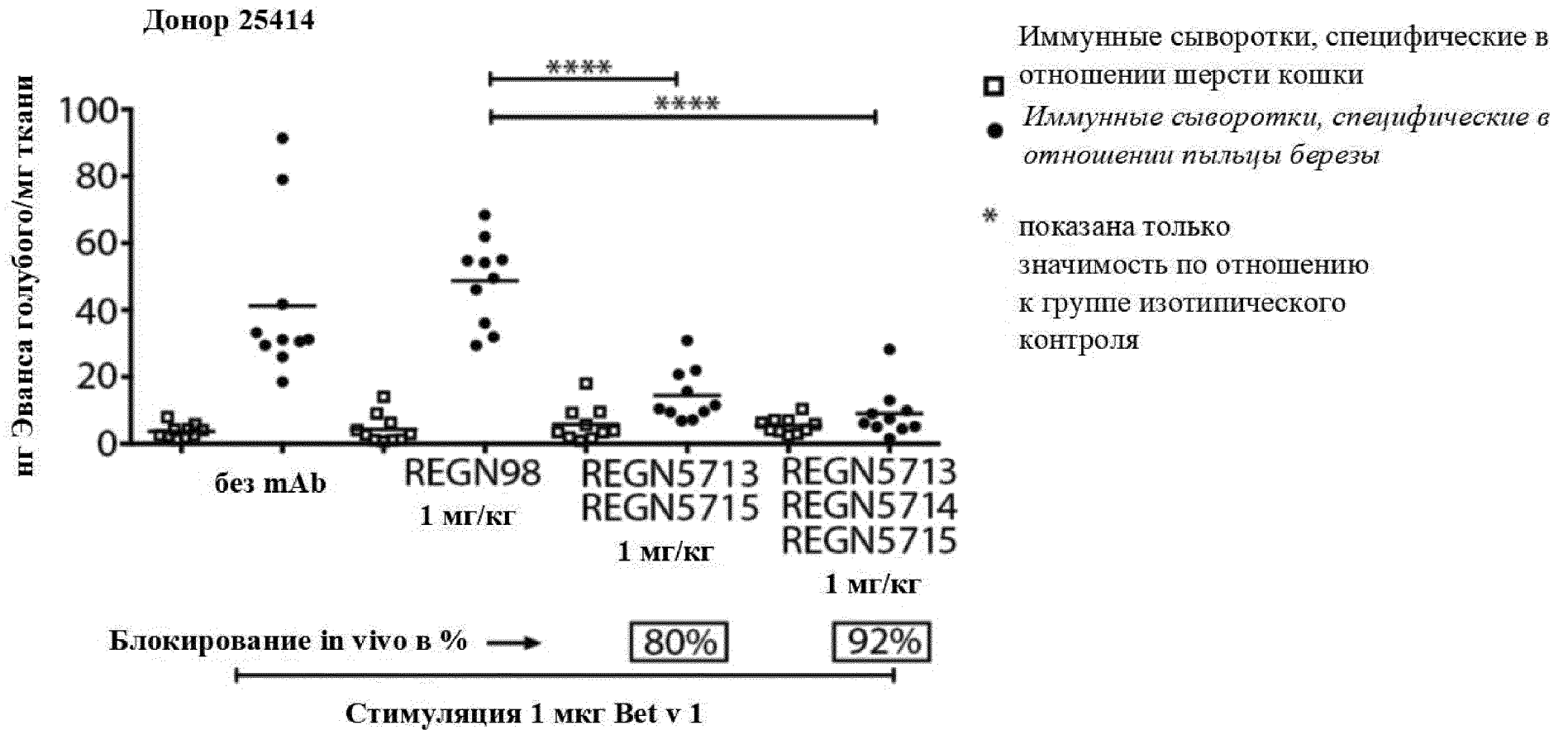
ФИГУРА 6

Модель РСА с использованием поликлонального IgE человека



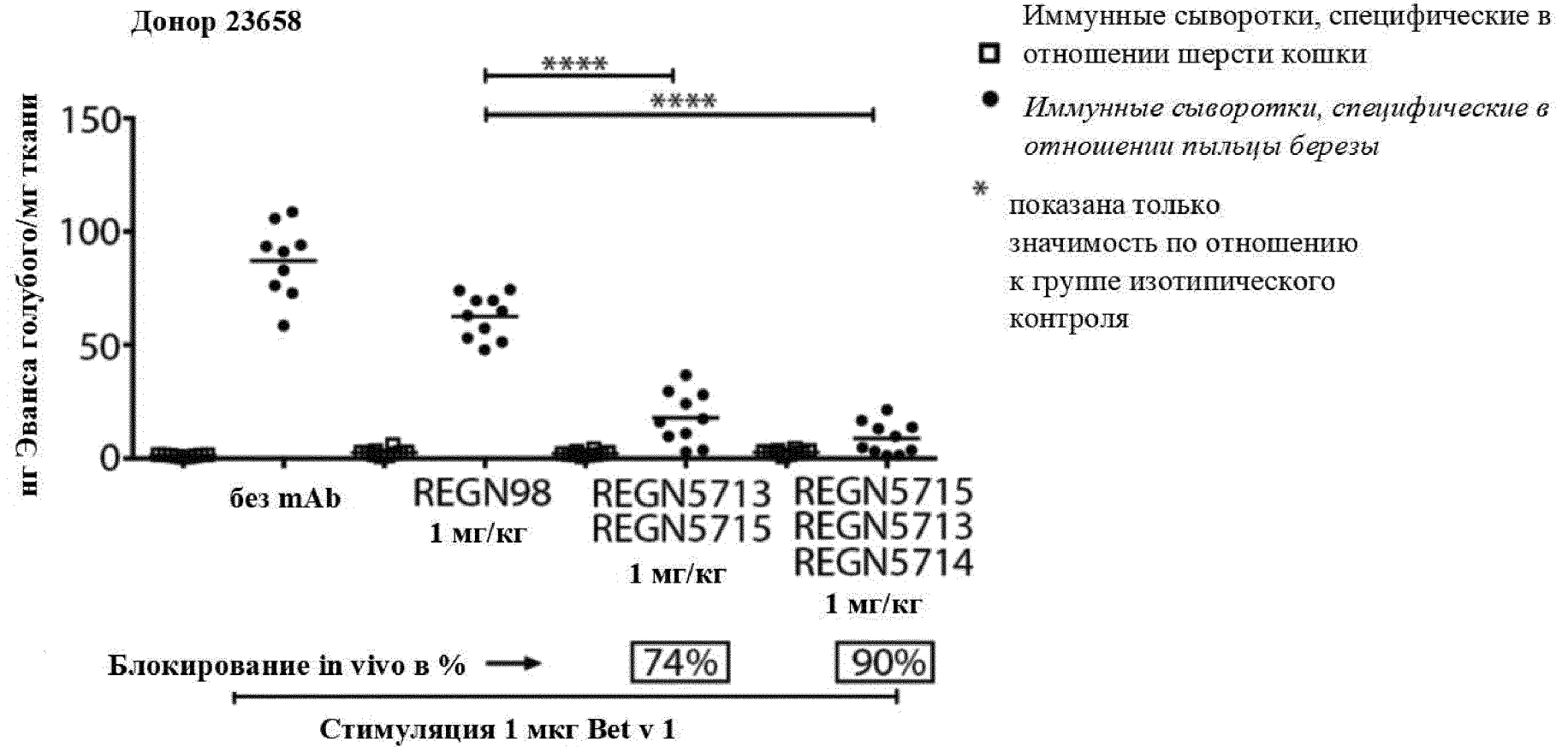
ФИГУРА 7

Модель РСА с использованием поликлонального IgE человека

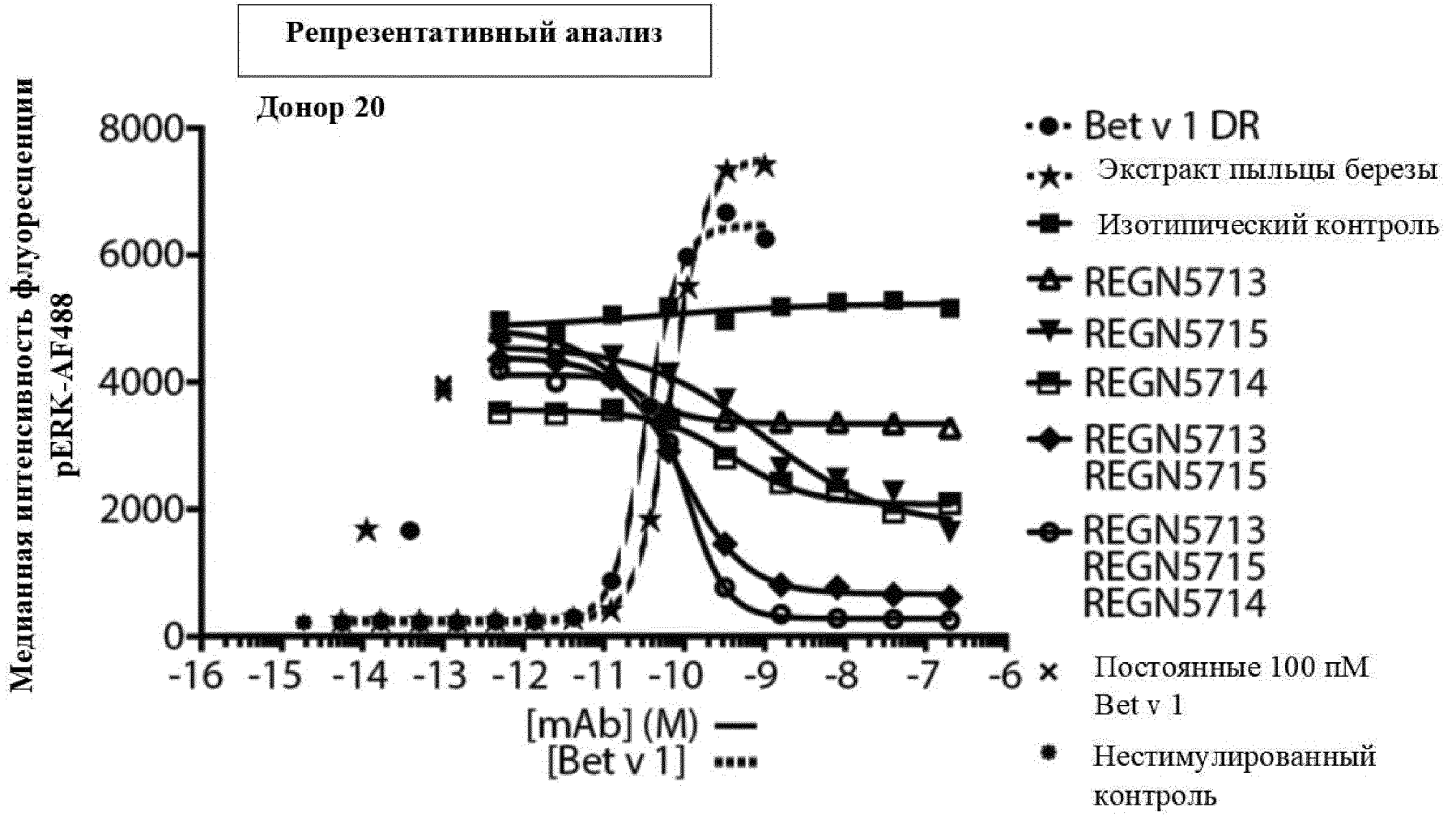


ФИГУРА 7 (продолжение)

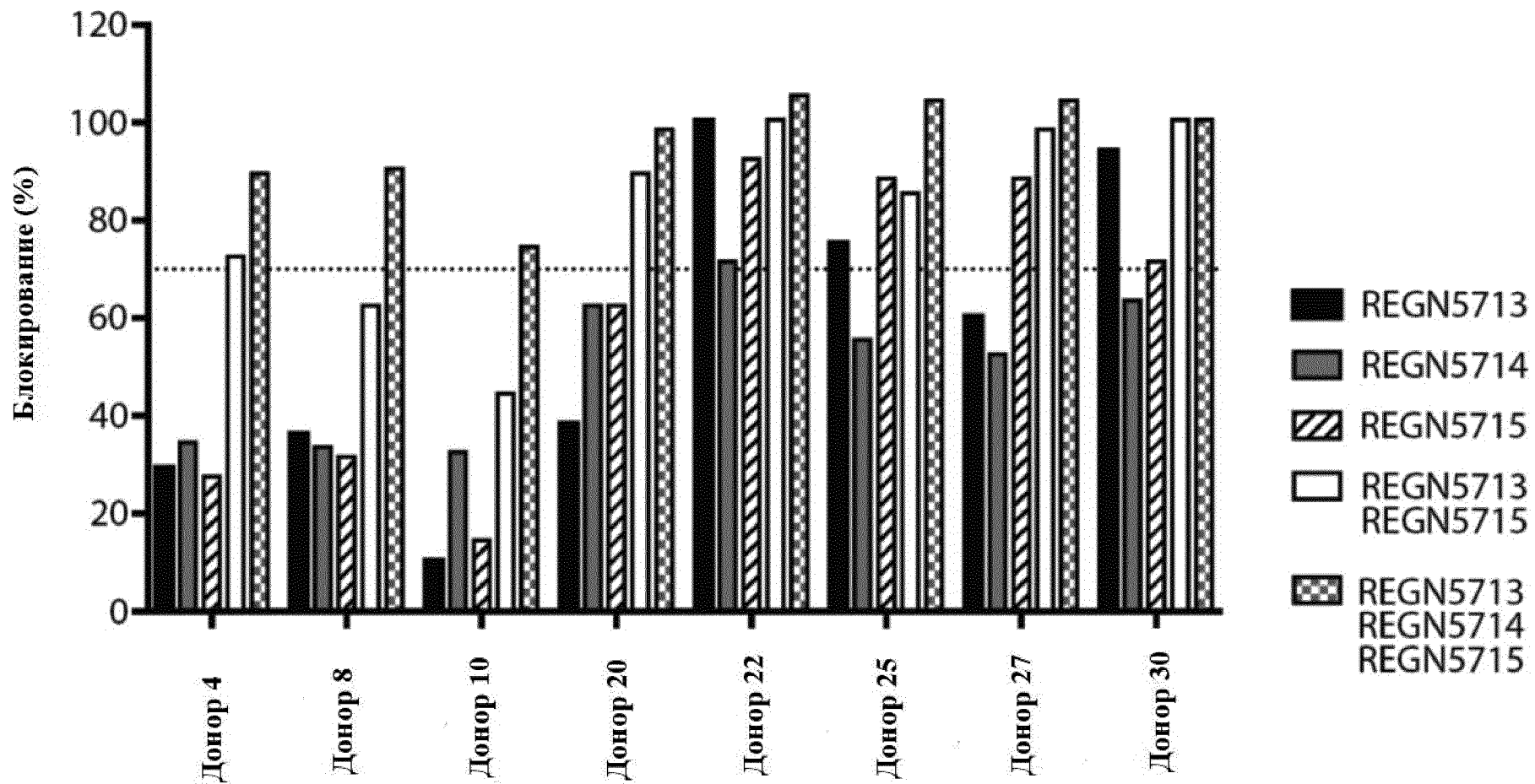
Модель РСА с использованием поликлонального IgE человека



ФИГУРА 7 (продолжение)



ФИГУРА 8



ФИГУРА 8 (продолжение)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 10301WO01	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2018/035366	International filing date (<i>day/month/year</i>) 31 May 2018 (31-05-2018)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 1 June 2017 (01-06-2017)
Applicant REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 12 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
 a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/035366

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 13ter.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 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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/US2018/035366

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-30, 38-56, 61-64(all partially)

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/035366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/16
ADD. A61K39/00

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)
C07K A61K

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)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/134350 A2 (BIOMAY AG [AT]; MAJDIC OTTO [AT]; KOHL PETRA [AT]; VALENTA RUDOLF [AT]) 29 November 2007 (2007-11-29) page 11; example 1; table 1 page 16, paragraph 2 page 17; table 6 page 17; table 7 page 25; example 3 ----- -/--	1-30, 38-56, 61-64

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 28 September 2018	Date of mailing of the international search report 22/10/2018
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Malamoussi, A
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/035366

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>VISCO V ET AL: "Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 157, no. 2, 15 July 1996 (1996-07-15), pages 956-962, XP002448850, ISSN: 0022-1767 page 959; figure 1 page 959, right-hand column, paragraph 3 page 960, right-hand column, paragraph 1 page 962, left-hand column, paragraph 2 -----</p>	1-30, 38-56, 61-64
X	<p>DENEPOUX S ET AL: "Molecular characterization of human IgG monoclonal antibodies specific for the major birch pollen allergen Bet v 1. Anti-allergen IgG can enhance the anaphylactic reaction", FEBS LETT, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 465, no. 1, 7 January 2000 (2000-01-07), pages 39-46, XP004260757, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01703-2 abstract page 41, right-hand column, paragraph 2 figure 1 page 43, right-hand column, paragraph 2 -----</p>	1-30, 38-56, 61-64
X	<p>JAKOBSEN CHARLOTTE G ET AL: "Isolation of high-affinity human IgE and IgG antibodies recognising Bet v 1 and Humicola lanuginosa lipase from combinatorial phage libraries", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 41, no. 10, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 941-953, XP002308361, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2004.05.009 abstract page 948, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 2 ----- -/--</p>	1-30, 38-56, 61-64

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/035366

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>M. LEVIN ET AL: "Human IgE against the major allergen Bet v 1 - defining an epitope with limited cross-reactivity between different PR-10 family proteins", CLINICAL & EXPERIMENTAL ALLERGY : JOURNAL OF THE BRITISH SOCIETY FOR ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 44, no. 2, 1 February 2014 (2014-02-01), pages 288-299, XP055496645, UK ISSN: 0954-7894, DOI: 10.1111/cea.12230 page 293, right-hand column, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-30, 38-56, 61-64
X	<p>LEBECQUE ET AL: "Immunologic characterization of monoclonal antibodies that modulate human IgE binding to the major birch pollen allergen Bet v 1", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNO, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 99, no. 3, 1 March 1997 (1997-03-01), pages 374-384, XP005154356, ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/S0091-6749(97)70056-3 abstract figure 2 page 379, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 380, left-hand column, paragraph 1 page 380, right-hand column, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-30, 38-56, 61-64
X	<p>A. GIERAS ET AL: "Mapping of Conformational IgE Epitopes with Peptide-Specific Monoclonal Antibodies Reveals Simultaneous Binding of Different IgE Antibodies to a Surface Patch on the Major Birch Pollen Allergen, Bet v 1", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 186, no. 9, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 5333-5344, XP055496646, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1000804 page 5334, left-hand column, paragraph 5 page 5335; table 1 page 5336, right-hand column, paragraph 2 page 5336; table IV page 5337; table V page 5342; figure 6; table VI page 5337, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-30, 38-56, 61-64

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/035366

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>EP 0 619 323 A1 (SCHERING PLOUGH CORP [FR]) 12 October 1994 (1994-10-12)</p> <p>column 14, line 15 - line 17 column 14, line 25 - line 28 column 17 - column 18</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-30, 38-56, 61-64</p>
A	<p>M. FOCKE ET AL: "Molecular composition and biological activity of commercial birch pollen allergen extracts", EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 39, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 429-436, XP055496640, GB ISSN: 0014-2972, DOI: 10.1111/j.1365-2362.2009.02109.x abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-30, 38-56, 61-64</p>
A	<p>LAFFER S ET AL: "Molecular characterization of Bip 1, a monoclonal antibody that modulates IgE binding to birch pollen allergen, Bet v 1", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 157, no. 11, 1 December 1996 (1996-12-01), pages 4953-4962, XP002448851, ISSN: 0022-1767 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-30, 38-56, 61-64</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2018/035366

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2007134350	A2	29-11-2007	AT 503297 A4	15-09-2007
			AU 2007252263 A1	29-11-2007
			CA 2649722 A1	29-11-2007
			CN 101448855 A	03-06-2009
			EP 2032603 A2	11-03-2009
			JP 2009537117 A	29-10-2009
			RU 2008149957 A	27-06-2010
			US 2010034812 A1	11-02-2010
			WO 2007134350 A2	29-11-2007
EP 0619323	A1	12-10-1994	AU 7014294 A	08-11-1994
			EP 0619323 A1	12-10-1994
			WO 9424164 A2	27-10-1994

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H16992P comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 148, 150, 152 and 156, 158, 160, respectively

2. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H17082P2 comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 292, 294, 296 and 300, 302, 304, respectively

3. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H17038P2 comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 100, 102, 104 and 108, 110, 112, respectively

4. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H16987P comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 116, 118, 120 and 124, 126, 128, respectively

5. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H16943P comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 4, 6, 8 and 12, 14, 16, respectively

6. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H16946P comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 20, 22, 24 and 28, 30, 32, respectively

7. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H16950P comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 36, 38, 40 and 44, 46, 48, respectively

8. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H16960P comprising heavy and light

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

chain CDRs with SEQ ID No 52, 54, 56 and 60, 62, 64,
respectively

9. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H16967P comprising heavy and light
chain CDRs with SEQ ID No 68, 70, 72 and 76, 78, 80,
respectively

10. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H16971P comprising heavy and light
chain CDRs with SEQ ID No 84, 86, 88 and 92, 94, 96,
respectively

11. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H16991P comprising heavy and light
chain CDRs with SEQ ID No 132, 134, 136 and 140, 142, 144,
respectively

12. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H17001P comprising heavy and light
chain CDRs with SEQ ID No 164, 166, 168 and 172, 174, 176,
respectively

13. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H17015P comprising heavy and light
chain CDRs with SEQ ID No 180, 182, 184 and 188, 190, 192,
respectively

14. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H7027P comprising heavy and light
chain CDRs with SEQ ID No 196, 198, 200 and 204, 206, 208,
respectively

15. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H17028P comprising heavy and light
chain CDRs with SEQ ID No 212, 214, 216 and 220, 222, 224,
respectively

16. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

anti-Bet v1 antibody H4H17031P comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 228, 230, 232 and 236, 238, 240, respectively

17. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H17033P comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 244, 246, 248 and 252, 254, 256, respectively

18. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H16979P comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 260, 262, 264 and 268, 270, 272, respectively

19. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H17045P2 comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 276, 278, 280 and 268, 270, 272, respectively

20. claims: 1-30, 38-56, 61-64(all partially)

anti-Bet v1 antibody H4H17067P2 comprising heavy and light chain CDRs with SEQ ID No 284, 286, 288 and 268, 270, 272, respectively

21. claims: 31-34(completely); 42-46, 61-64(partially)

pharmaceutical composition comprising a first and a second human antibody or fragment thereof, that binds to Bet v1, wherein the first antibody interacts with amino acid residues 23-44 of SEQ ID No 306 and the second with amino acids 44-69 of SEQ ID No 306

22. claims: 35-37(completely); 42-56, 61-64(partially)

pharmaceutical composition comprising a first and a second human antibody or fragment thereof, that binds to Bet v1, wherein the first antibody interacts with amino acid residues 23-43, 44-56, 2-19, 57-70, 81-89 of SEQ ID No 306

23. claims: 57-60

An isolated human monoclonal antibody of antigen-binding fragment thereof that binds Bet v1 and cross-reacts with one or more allergens selected from a list

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

24. claims: 65-70

pharmaceutical composition comprising at least two human mAbs or antigen binding fragments thereof that bind natural Bet v1 or BPE, wherein the at least two antibodies do not compete for natural BetV1 or BPE
