



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0618972-5 A2**

(22) Data de Depósito: 23/11/2006
(43) Data da Publicação: 20/09/2011
(RPI 2124)



(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/00
G01N 33/68

(54) Título: MÉTODOS DE MEDIÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOLÓGICA E PARA QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA ALERGÊNICA EM UMA PREPARAÇÃO DE VACINA

(30) Prioridade Unionista: 25/11/2005 US 60/739,408, 24/11/2005 DK PA 200501655, 24/11/2005 DK PA 200501655, 25/11/2005 US 60/739,408

(73) Titular(es): Alk-Abelló A/S

(72) Inventor(es): Hans-Henrik, Maria Mercedes Ferreira Gómez, Morten Jonas Maltesen, Rasmus Linnemann Krogh

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT DK2006000656 de 23/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/059776 de 31/05/2007

(57) Resumo: MÉTODOS DE MEDIÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOLÓGICA E PARA QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA ALERGÊNICA EM UMA PREPARAÇÃO DE VACINA. A presente invenção refere-se a um método de medição da atividade imunológica de uma preparação de vacina na forma de uma mistura de uma ou mais enzimas alergênicas e um adjuvante de sal metálico que contém oxigênio, em que a mistura compreende uma fase líquida e uma fase sólida, e em que pelo menos uma parte da(s) enzima(s) alergênica(s) é adsorvida na fase sólida, o método compreendendo as etapas de medir a atividade enzimática da mistura em um ensaio de atividade enzimática e usar a medição obtida como indicação da atividade imunológica da preparação de vacina, ou usar a mediação obtida para quantificar a quantidade de enzima alergênica.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS DE MEDIÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOLÓGICA E PARA QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA ALERGÊNICA EM UMA PREPARAÇÃO DE VACINA"**.

5 CAMPO TÉCNICO

A presente invenção refere-se a um método in vitro de medição da atividade enzimática de uma ou mais enzimas alergênicas em uma preparação de vacina e, desse modo, obter uma indicação da atividade imunológica e/ou uma quantificação da quantidade da enzima alergênica na preparação de vacina.

10 ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

A interação de proteínas com superfícies é um fenômeno de significância tanto fisiológica quanto tecnológica amplamente reconhecido. Um importante exemplo é a adsorção de alérgenos protéicos no adjuvante hidróxido de alumínio em vacinas contra alergia. Um adjuvante é um composto
15 que atua aumentando a resposta imune a vacinação. O efeito adjuvante de hidróxido de alumínio tem sido intensamente investigado e numerosas teorias com relação ao mecanismo têm sido propostas.

Vacinas contra alergia, por exemplo injeção subcutânea, poderão ser preparadas misturando uma solução aquosa de um alérgeno e um
20 veículo em fase sólida, por exemplo gel de hidróxido de alumínio, para produzir uma mistura, na qual pelo menos uma parte do alérgeno é adsorvida na fase sólida e parte ou nada do alérgeno encontra-se na fase líquida. O veículo em fase sólida poderá funcionar como adjuvante, isto é, ele potencializa a resposta imune do alérgeno, embora o mecanismo da potencialização
25 nem sempre seja totalmente entendida. Também, o mecanismo e natureza da adsorção do alérgeno no veículo em fase sólida não são sempre totalmente entendidos e poderão depender fortemente do tipo de alérgeno envolvido. Teoricamente, entretanto, a adsorção em géis de hidróxido de alumínio envolve parcialmente forças eletrostáticas. No caso de proteínas, acredita-se que os grupos fosfatos de proteínas fosforiladas também intera-
30 gem com o gel de hidróxido de alumínio e possivelmente substitui em certo grau os grupos hidróxidos na estrutura do gel.

A capacidade de adsorção de proteína de hidróxido de alumínio tem sido estudada intensivamente com as proteínas-modelo ovoalbumina (OA) e albumina do soro bovino (BSA). Recentemente, foram realizados estudos relativos ao impacto estrutural de adsorção de proteína em hidróxido de alumínio. Medições de emissão de fluorescência juntamente com calorimetria de varredura diferencial indicam que importantes alterações estruturais ocorrem na adsorção de OA e BSA em hidróxido de alumínio (Jones e outros, *Effects of Adsorption to Aluminium Salt Adjuvants on the Structure and Stability of Model Protein Antigens*, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, pp. 13406-13414, 2005). Outro estudo, ao contrário, indica que a presença de hidróxido de alumínio em um experimento com ELISA ajudou a manter OA na conformação nativa (Houen e outros, *A Non-denaturing Enzyme Linked Immunosorbent Assay With Protein Preadsorbed Onto Aluminium Hydroxide*, *Journal of Immunological Methods*, Vol. 200, pp. 99-105, 1997). OA adsorvido em hidróxido de alumínio antes de transferência à superfície plástica da cavidade de uma placa de microtitulação, mantida sua capacidade de ligar-se a anticorpos monoclonais, elevou-se no sentido da forma nativa de OA. Ao contrário, OA não pré-incubado com hidróxido de alumínio ligado a anticorpos monoclonais elevou-se contra albumina desnaturada termicamente. Contudo, essas técnicas não fornecem qualquer informação sobre proteínas individuais presentes em uma mistura de proteínas.

O efeito de hidróxido de alumínio sobre a estrutura e estabilidade de alérgenos é importante a partir de diversas perspectivas. Epitopos conformativos poderão perder-se durante adsorção e a imunogenicidade poderá ser alterada como consequência de armazenamento por período de tempo mais longo.

O grau de adsorção varia com a natureza do alérgeno específico em questão. No caso de um alérgeno na forma de extrato de um material biológico, por exemplo um extrato de alérgenos de pólen de grama, o extrato contém vários íons e moléculas diferentes, o que potencialmente interfere na ligação dos alérgenos com o veículo em fase sólida.

O ácaro do pó doméstico (HDM), *Dermatophagoides pteronyss-*

sinus, é uma importante fonte de alérgenos inalados. Os alérgenos protéicos Der p 1 e Der p 2 são considerados ser os dois mais potentes alérgenos dos alérgenos Der p. A estrutura e atividade enzimática de Der p 1 encontra-se bem caracterizada. Diversos estudos *in vitro* sugerem que a atividade de protease de cisteína de Der p 1 aumenta a potência do alérgeno, por exemplo mediante clivagem de proteínas de junção firme no epitélio pulmonar e clivagem de CD23 (receptor de IgE de baixa afinidade) em células B humanas (Jacquet e outros, *Biochemical and Immunological Characterization of a Recombinant Precursor from of the House Dust Mite Allergen Der p 1 Produced by Drosophila cells*, *Clinical and Experimental Allergy*, Vol. 30, pp. 784-793, 2000). Vacinas contra HDM baseadas em adjuvante de hidróxido de alumínio contêm extrato de HDM purificado como ingrediente farmacêutico ativo (API).

A atividade alergênica e o potencial para induzir reações alérgicas poderão ser testados, por exemplo, por injeção intradérmica em animais sensibilizados e por medição da alteração de vários sintomas (Kildsgaard e outros, *Assessment of the in vivo allergenic potency of new allergy vaccines by intradermal testing in sensitised mice*, *Clinical Immunology and Allergy in Medicine Proceedings of the 21st EAACI Congress 2002*, Nápoles, Itália). Entretanto, tais métodos *in vivo* são laboriosos e levam tempo, e eles necessitam do uso de animais de teste, o que é indesejável.

Até agora tem sido prática comum avaliar a atividade imunológica de uma vacina *in vitro* com base em uma medição da atividade imunológica da solução de alérgeno usada para a preparação da vacina em veículo em fase sólida pronta para usar.

WO2005/022157 descreve um método *in vitro* de avaliação da atividade imunológica de uma preparação de vacina na forma de uma mistura de um antígeno molecular e um veículo, no qual a mistura compreende uma fase líquida e uma fase sólida, à qual pelo menos uma parte do antígeno acha-se ligada, compreendendo o método as etapas de i) submeter a vacina a uma medição da atividade imunológica selecionada do grupo que consiste em a) capacidade de ligação com anticorpos usando um imunoen-

saio que emprega um anticorpo específico a antígenos ligado a uma fase sólida de anticorpos, b) capacidade de ativar células efetadoras e c) potencial para induzir anafilaxia; e ii) usar os resultados da medição para avaliar a atividade imunológica da vacina.

- 5 A natureza de adsorção de alérgenos em adjuvantes de sais metálicos que contêm oxigênio é muito complexa e amplamente desconhecida, e espera-se também que varie a quantidade de diferentes alérgenos e diferentes sais metálicos que contêm oxigênio. O objetivo da presente invenção é proporcionar um novo método *in vitro* de avaliação e quantificação da
10 atividade imunológica de preparações de vacina contra alergia com base em adjuvantes de sais metálicos que contêm oxigênio, tais como vacinas prontas para usar.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

- De acordo com um aspecto da invenção, proporciona-se um
15 método de medição da atividade imunológica de uma preparação de vacina na forma de uma mistura de uma ou mais enzimas alergênicas e um adjuvante de sal metálico que contém oxigênio, em que a mistura compreende uma fase líquida e uma fase sólida, e em que pelo menos uma parte da(s) enzima(s) alergênica(s) é adsorvida na fase sólida, compreendendo esse
20 método as etapas de medir a atividade enzimática da mistura em um ensaio de atividade enzimática e usar a medição obtida como indicação da atividade imunológica da preparação de vacina.

- De acordo com um aspecto adicional da invenção, proporciona-se um método para quantificação da quantidade de enzima alergênica em
25 uma preparação de vacina na forma de uma mistura de uma ou mais enzimas alergênicas e um adjuvante de sal metálico que contém oxigênio, em que a mistura compreende uma fase líquida e uma fase sólida, e em que pelo menos uma parte da(s) enzima(s) alergênica(s) é adsorvida na fase sólida, compreendendo esse método as etapas de medir a atividade enzimática da mistura em um ensaio de atividade enzimática e usar a medição obtida para quantificar a quantidade de enzima alergênica.
30

DESCRIÇÃO CONCISA DAS FIGURAS

A figura. 1 mostra um esquema de fluxo da purificação de Der p 1.

A figura. 2a mostra fluorescência do substrato sintético Z-FR-AMC e a relação entre sinal de fluorescência e concentração de substrato.

5 A figura. 2b mostra curvas padrões de AMC: a) curva-padrão de AMC em AMC a 500 μ M e b) faixa linear de a).

A figura. 3 mostra um estudo da enzima ótima e concentração de substrato em que a) mostra atividade como função da concentração de substrato e b) mostra atividade como função da concentração de enzima.

10 A figura. 4 mostra A_{280} de 100 μ g/mL de papaína $\pm$ 1,14 mg/mL de hidróxido de alumínio e 1,14 mg/mL de hidróxido de alumínio isoladamente.

A figura. 5 mostra o curso do tempo de sedimentação de 1,14 mg/mL de hidróxido de alumínio.

15 A figura. 6 mostra o efeito de hidróxido de alumínio sobre AMC. A_{350} de uma amostra de controle foi comparado com A_{350} de uma amostra de sobrenadante.

A figura. 7 mostra um estudo de tempo de AMC na presença e ausência de hidróxido de alumínio.

20 A figura. 8 mostra espectros de absorbância dos substratos Boc-QAR-AMC e Z-FR-AMC.

A figura. 9 mostra a influência de hidróxido de alumínio sobre o substrato Z-FR-AMC medida como a) medição de ponto final A_{325} e b) medição de atividade de papaína.

25 A figura. 10 mostra a influência de hidróxido de alumínio sobre o substrato Boc-QAR-AMC medida como a) medição de ponto final A_{325} e b) medição de atividade de papaína.

A figura. 11 mostra a influência de hidróxido de alumínio sobre atividade de papaína com concentração constante do inibidor específico de protease de cisteína E64.

30 A figura. 12 mostra uma revisão geral de amostras do experimento de adsorção com papaína e hidróxido de alumínio.

A figura. 13 mostra uma revisão geral de amostras do experimento de adsorção com Der p 1 e hidróxido de alumínio.

A figura. 14 mostra atividade de Der p1 de diferentes amostras na presença e ausência de hidróxido de alumínio.

5 A figura. 15 mostra uma curva de Michaelis-Menten para Der p1 na presença de hidróxido de alumínio.

A figura. 16 mostra inibição de ligação de IgE. Linha descontínua: Der p1 eluído de hidróxido de alumínio (Elu), linha contínua: Der p 1 de controle na ausência de hidróxido de alumínio (Con 1).

10 DEFINIÇÕES

A expressão "método *in vitro*", como usado neste relatório descritivo, significa um método que poderá ser realizado externamente a um organismo vivo.

15 A expressão "atividade imunológica", como usado neste relatório descritivo, significa qualquer resposta do sistema imune específica a alérgenos, incluindo respostas imunes mediadas por imunoglobulina.

As expressões "fase sólida" e "fase líquida" de uma preparação de vacina, como usado neste relatório descritivo, significam as fases que resultam de um processo de separação de uma suspensão do adjuvante de
20 sal metálico que contém oxigênio em um solvente líquido, por exemplo água, em uma fase sólida e uma fase líquida, o processo de separação sendo, por exemplo, centrifugação, extração ou sedimentação simples.

A expressão "adsorvido", como usado neste relatório, significa
25 qualquer ligação não-covalente, acoplamento, aderência ou ligação, incluindo adsorção por forças eletrostáticas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método *in vitro* de medição da atividade enzimática de uma enzima alergênica e, desse modo, obtenção de uma indicação da atividade imunológica e/ou uma quantificação da quan-
30 tidade de uma enzima alergênica em uma preparação de vacina.

Em um aspecto, a invenção proporciona, assim, um método de medição da atividade imunológica de uma preparação de vacina na forma de

uma mistura de uma ou mais enzimas alergênicas e um adjuvante de sal metálico que contém oxigênio, em que a mistura compreende uma fase líquida e uma fase sólida, e em que pelo menos uma parte da(s) enzima(s) alergênica(s) é(são) adsorvida(s) na fase sólida, compreendendo esse método as etapas de medir a atividade enzimática da mistura em um ensaio de atividade enzimática e usar a medição obtida como indicação da atividade imunológica da preparação de vacina.

Em um aspecto da invenção, o termo "pelo menos uma parte de" refere-se ao fato de que pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85% ou pelo menos 90%, das enzimas alergênicas são adsorvidos na fase sólida.

Em um aspecto da invenção, a atividade imunológica é a capacidade de a preparação de vacina dar origem a uma resposta imune mediada por uma imunoglobulina específica a alérgenos, incluindo qualquer classe, subclasse ou combinação destas, incluindo IgA, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, em particular IgG e/ou IgE.

Embora hidróxido de alumínio seja o adjuvante mais comumente usado em vacinas, o que acontece com os alérgenos quando adsorvidos em sua superfície nunca foi totalmente caracterizado. Uma compreensão de como adsorção em hidróxido de alumínio afeta a estrutura e atividade de alérgenos é essencial a seu uso em vacinas, bem como à compreensão do mecanismo de estimulação imune por adjuvante.

Atividade enzimática é em geral diretamente relacionada com a estrutura da enzima. Se a estrutura é alterada, por exemplo por exposição a calor ou condições ácidas, a atividade será provavelmente afetada. Uma população de proteínas homogêneas pode ser descrita pelo seguinte equilíbrio de dois estados simplificado(s):

$$N \rightleftharpoons D, \quad K_{D-N} = \frac{[D]}{[N]} = \frac{k_u}{k_f}$$

em que N é a proteína na forma nativa, D é a forma desnaturada, k_u e k_f são as constantes de velocidade da cinética de desenovelamento e reenovelamento, respectivamente. Entre a forma nativa e a forma desnaturada poderão ocorrer vários estados de transição intermediários. A partir desse modelo simples, a definição de desnaturação pode ser estabelecida como: qualquer alteração temporária ou permanente na estrutura tridimensional de uma proteína. Assim, quando mudam as propriedades físico-químicas do ambiente circundante, uma alteração do panorama de energia livre que representa o espaço de configuração disponível na proteína pode ocorrer dependendo de quão persistente é a alteração.

Atração eletrostática em qualquer superfície de uma fase sólida pode levar a uma adsorção da proteína. A adsorção de uma proteína em uma superfície poderá induzir alterações conformativas na proteína, deslocando desse modo o mínimo de energia global da proteína. No caso de uma enzima, isso poderia resultar em uma alteração de sua atividade enzimática. Assim, uma mudança na atividade enzimática poderia ser uma medida sensível de alterações estruturais resultantes de adsorção em uma fase sólida.

O sistema proteína-hidróxido de alumínio foi totalmente investigado devido ao efeito adjuvante do hidróxido de alumínio. A literatura mostra que proteínas de pl ácido ligam-se a hidróxido de alumínio, mas o efeito da ligação sobre atividade enzimática estão os presentes inventores cientes de que nunca foi até agora investigado.

A presente invenção baseia-se na verificação de que é possível realizar medições de atividade enzimática em uma preparação de vacina que compreende enzima(s) alergênica(s) e um adjuvante de sal metálico que contém oxigênio.

A presente invenção baseia-se adicionalmente no reconhecimento de que essas medições de atividade enzimática da preparação de vacina podem ser usadas como uma indicação da atividade imunológica da preparação de vacina, uma vez que uma alteração na atividade enzimática

pode estar ligada a uma mudança na conformação da molécula de enzima conforme presente na preparação de vacina, o que novamente está ligado à atividade imunológica da preparação de vacina.

A capacidade de realizar essas medições torna possível avaliar o impacto da adsorção do alérgeno no adjuvante de sal metálico que contém oxigênio, por meio de medição da atividade enzimática antes e após adsorção no veículo em fase sólida e, desse modo, obtenção de uma medição da atividade imunológica após adsorção, uma vez que, conforme explicado acima, espera-se que uma alteração na atividade enzimática venha a ter um impacto na atividade imunológica.

O método de acordo com a invenção pode também ser usado para quantificar a quantidade de enzima(s) alergênica(s) em uma preparação de vacina.

Um aspecto adicional da invenção proporciona, assim, um método para quantificação da quantidade de enzima alergênica em uma preparação de vacina na forma de uma mistura de uma ou mais enzimas alergênicas e um adjuvante de sal metálico que contém oxigênio, em que a mistura compreende uma fase líquida e uma fase sólida, e em que pelo menos uma parte da(s) enzima(s) alergênica(s) é adsorvida na fase sólida, compreendendo esse método as etapas de medir a atividade enzimática da mistura em um ensaio de atividade enzimática e usar a medição obtida para quantificar a quantidade de enzima alergênica.

Em um aspecto da invenção, a quantificação da enzima alergênica é realizada comparando a atividade enzimática medida com um padrão bem caracterizado. Em um aspecto adicional da invenção, a quantificação do alérgeno enzimático é realizada por titulação de sítios ativos. Titulação de sítios ativos exige o uso de um inibidor dessa atividade enzimática particular o qual se liga à enzima irreversivelmente ou pelo menos com uma afinidade muito alta.

30 PREPARAÇÃO DE VACINA

A preparação de vacina submetida ao método da presente invenção poderá ser qualquer preparação pronta para uso na forma de uma

mistura que compreende uma ou mais enzimas alergênicas e um adjuvante de sal metálico que contém oxigênio, em que a mistura compreende uma fase líquida e uma fase sólida, à qual pelo menos uma parte da enzima alérgica é adsorvida, ou qualquer preparação de vacina tal como esta para preparar uma formulação pronta para usar. A preparação de vacina poderá adicionalmente compreender um ou mais alérgenos que não apresentam uma atividade enzimática.

A preparação pronta para usar poderá destinar-se a administração parenteral ou a administração via mucosa.

Administração parenteral inclui administração intravenosa, intramuscular, intra-articular, subcutânea, intradérmica, epicutânea/transdérmica e intraperitoneal. Vacinas para administração via injeção poderão ser formuladas de modo a serem adequadas para injeção por agulha ou para injeção sem agulha.

Administração via mucosa inclui administração oral, nasal, vaginal, sublingual, ocular, retal, urinária, intramamária, pulmonar, otolar (isto é, via ouvido) ou bucal.

A vacina poderá ser na forma de um *spray*, um aerossol, uma mistura, uma suspensão, uma dispersão, uma emulsão, um gel, uma pasta, um xarope, um creme, uma pomada, implantes (ouvido, olho, pele, nariz, reto e vagina), preparações intramamárias, vagitórios, supositórios ou uteritórios.

ENZIMA ALERGÊNICA

No presente contexto, o termo "enzima alérgica" é qualquer proteína que induz reação alérgica, isto é, reações mediadas por IgE após sua exposição repetida a um indivíduo e que apresenta uma atividade enzimática, isto é, sendo capaz de catalisar ou acelerar uma reação química.

Como todos os catalisadores, enzimas funcionam baixando a energia de ativação de uma reação, permitindo assim que a reação prossiga muito mais rápido. Enzimas poderão acelerar reações por um fator de muitos milhares. Uma enzima, como qualquer catalisador, permanece inalterada pela reação completa e pode, portanto, continuar a funcionar. Porque enzi-

mas, como todos os catalisadores, não afetam a energia relativa entre os produtos e reagentes, elas não afetam o equilíbrio de uma reação. Contudo, a vantagem de enzimas, em comparação com a maioria de outros catalisadores, é sua estereo, regio e quimiosseletividade e especificidade.

5 Exemplos de alérgenos que ocorrem naturalmente incluem alérgenos de pólen (alérgenos de pólen de árvore, erva, erva daninha e grama), alérgenos de inseto (alérgenos inalantes, de saliva e de veneno, por exemplo alérgenos de ácaros, barata e maruins, alérgenos de veneno de himenópteros), alérgenos de pêlo de animal e de caspa (de, por exemplo, cão, gato, cavalo, rato, camundongo etc.), e alérgenos de alimentos. Alérgenos importantes de pólen de árvores, gramas e ervas originam-se tanto das ordens taxonômicas Fagales, Oleales e Pinales quanto das platanáceas, incluindo, entre outras, bétula (*Betula*), amieiro (*Alnus*), aveleira (*Corylus*), carpa (*Carpinus*) e oliveira (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* e *Juniperus*), plátano (*Platanus*), a ordem das *Poales*, incluindo, entre outras, gramas dos gêneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* e *Sorghum*, as ordens das *Asterales* e *Urticales*, incluindo, entre outras, ervas dos gêneros *Ambrosia*, *Artemisia* e *Parietaria*. Outros importantes alérgenos de inalação são aqueles provenientes de ácaros do pó doméstico (HDM) dos gêneros *Dermatophagoides* e *Euroglyphus*, ácaros do armazenamento, por exemplo *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* e *Tyrophagus*, aqueles provenientes das baratas, maruins e pulgas, por exemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* e *Ctenocephalides*, e aqueles provenientes de mamíferos tais como gato, cão e cavalo, alérgenos de venenos, incluindo aqueles que se originam de insetos que ferroam ou picam tais como aqueles da ordem taxonômica *Hymenoptera*, incluindo abelhas (superfamília *Apidae*), vespas (superfamília *Vespidea*) e formigas (superfamília *Formicoidae*). Alérgenos de inalação importantes de fungos são, entre outros, aqueles que se originam dos gêneros *Alternaria* e *Cladosporium*.

30 Em um aspecto da invenção, a(s) enzima(s) alergênica(s) é (são) selecionada(s) do grupo que consiste em alérgenos de pólenes de árvores, alérgenos de pólenes de gramas, alérgenos de pólenes de ervas, alérge-

nos de ácaros, alérgenos de venenos, pêlos de animais e alérgenos de caspas, e alérgenos de alimentos. Em um aspecto adicional da invenção, a(s) enzima(s) alérgênica(s) é (são) alérgeno(s) de ácaros do pó doméstico.

Uma lista não exaustiva de enzimas alérgênicas é mostrada na

5 tabela 1.

	Atividade Enzimática	Alérgeno	Organismo	
10	Proteases de Cisteína	Der p 1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	HDM
		Der f 1	<i>Dermatophagoides farinae</i>	HDM
		Blo t 1	<i>Blomia tropicales</i>	Ácaro
		Act c 1	<i>Actinidia chinensis</i>	Kiwi
		Car p 1	<i>Carica papaya</i>	Papaia
15	Proteases de serina	Der p 3	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	HDM
		Der p 6	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	HDM
		Der p 9	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	HDM
		Cia h 9	<i>Cladosporium herbarum</i>	Fungos
20		Blo T 6	<i>Blomia Tropicalis</i>	Ácaro
		Asp fl 13	<i>Aspergillus flavus</i>	Fungos
		Asp f 13	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungos
		Asp p 18	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungos
25		Tri r 4	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Fungos
		Rho m 2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Fungos
		Epi p 1	<i>Epicoccum purpurascens</i>	Fungos
		Api m 7	<i>Apis mellifera</i>	Abelha melífera
30		Pol d 4	<i>Polistes dominulus</i>	Vespa
		Cuc m 1	<i>Cucumis melo</i>	Melão

almiscarado

	Metaloproteases	Asp f 5	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungos
	Proteases aspárticas	Asp f 10	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungos
5		Blag g 2	<i>Blatella germanica</i>	Barata alemã
	Enolases	Cyn d 22w	<i>Cynodon dactylon</i>	Grama das Bermudas
		Alt a 6	<i>Alternaria alternata</i>	Grama
10		Cla h 6	<i>Cladosporium herbarum</i>	Grama
		Asp f 22w	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungos
		Pen c 22w	<i>Penicillium citrinum</i>	Fungos
		Rho m 1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Fungos
	Amilases	Der p 4	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	HDM
15		Blo t 4	<i>Blomia tropicales</i>	Ácaro
		Hor v 16	<i>Hordeum vulgare</i>	Cevada
		Hor v 17	<i>Hordeum vulgare</i>	Cevada
	Glutathiona transferases	Der p 8	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	HDM
20		Blag g 5	<i>Blatella germanica</i>	Barata alemã
	Arginina quinases	Der p 20	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	HDM
25		Pen m 2	<i>Penaeus monodon</i>	camarão- tigre negro
	Fosfolipases	Api m 1	<i>Apis mellifera melífera</i>	Abelha
30	gá	Bom p 1	<i>Bombus pennsylvanicus</i>	Mangan-
		Dol m 1	<i>Dolichovespula maculata</i>	White

			face
			hornet
			(um tipo
			de vespa)
5	Pol a 1	<i>Polistes annularies</i>	Vespa
	Vesp c 1	<i>Vespa crabo</i>	Vespão
			europeu
	Ves m 1	<i>Vespula maculifrons</i>	Yel
			lowjacket
10	Ves v 1	<i>Vespula vulgaris</i>	Yel
			lowjacket
Desidrogenases	Alt a 8	<i>Alternaria alternata</i>	Fungos
	Alt a 10	<i>Alternaria alternata</i>	Fungos
	Hala f 4	<i>Malassezia furfur</i>	Fungos

15 Uma das principais fontes de alérgenos são HDMs. Em 2000 um total de 13 diferentes espécies de HDMs foram identificadas em todos os continentes, exceto a Antártica. HDMs pertencem ao filo *Arthropoda*, como se dá, por exemplo, com aranhas e escorpiões. Três espécies constituem 90% da fauna de HDMs, a saber *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Euroglyphus maynei*.

20 Para *D. pteronyssinus*, os alérgenos que mediam a resposta alérgica são encontrados nas fezes e dos restos fisicamente dessecados do *D. pteronyssinus*. Quatorze diferentes grupos de alérgenos de *D. pteronyssinus* são identificados (Tabela 2). Embora nem todos sejam completamente caracterizados, tamanho e função da maioria encontram-se estabelecidos e

25 ensaios imunológicos determinaram a reatividade de IgE *in vitro*.

Como é evidente da tabela 2, diversos HDMs são enzimas alérgicas tais como, por exemplo, Der p 1, Der p 3, Der p 6 e Der p 9.

TABELA 2. GRUPOS DE ALÉRGENOS DE *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS* – PESO MOLECULAR E FUNÇÃO.

	Alérgeno	PM (kDa)	Função
	Grupo 1	25	Protease de cisteína
5	Grupo 2	14	Secreção epitelial
	Grupo 3	25	Tripsina
	Grupo 4	57	Amilase
	Grupo 5	15	ND
	Grupo 6	25	Quimiotripsina
10	Grupo 7	31	ND
	Grupo 8	26	Glutathione-S-transferase
	Grupo 9	30	Protease de serina colagenolítica
	Grupo 10	37	Tropomiosina
	Grupo 11	92	Paramiosina
15	Grupo 12	14	ND
	Grupo 13	15	Proteína de ligação com ácido graxo
	Grupo 14	189	Apolipoforina

ND: Não disponível

A definição formal de um alérgeno importante é qualquer antígeno que se liga a soro humano com IgE em mais de 50% dos pacientes em um grupo clinicamente sensível. Os alérgenos de HDM Der p 1 e Der p 2 são ambos alérgenos importantes e são considerados os mais potentes dos alérgenos de HDM.

Vários experimentos *in vitro* indicam que a atividade proteolítica de Der p 1 poderia desempenhar um papel essencial no desenvolvimento da reação alérgica a HDM. Acredita-se que Der p 1 rompa as firmes junções entre as células epiteliais mediante oclusão por clivagem e eleve a permeabilidade da mucosa bronquial por meio de degradação de α -antitripsina. Isso poderia facilitar um aumento de acesso ao antígeno subepitelial que se apresenta nas células, o que poderia levar a um aumento de resposta alérgica. Adicionalmente, Der p 1 cliva CD23 (o receptor de IgE de baixa afinidade que regula a produção de IgE) e CD25 (o receptor de IL-2) na superfície de

células B e T. Isso orienta a resposta de células T a uma resposta de Th2 e finalmente a níveis elevados de IgE e uma resposta alérgica mais grave.

Enzimas proteolíticas, referidas como proteases ou sinonimamente peptidases, mediam o desdobramento de proteínas. Isso é feito por proteólise limitada em que um número limitado de ligações peptídicas é clivado ou por proteólise ilimitada em que proteínas são degradadas em seus constituintes de aminoácidos. Enzimas proteolíticas, como a maior parte de todas as outras enzimas, são classificadas pelo sistema de numeração da Comissão de Enzimas (EC) com um número que indica função e especificidade a substratos. As enzimas proteolíticas são divididas, de acordo com o sistema de numeração da EC, em duas subclasses, a saber exopeptidases e endopeptidases. Estas últimas são também referidas como proteinases.

As exopeptidases, por exemplo amino e carboxipeptidases, clivam aminoácidos simples do término N ou C da proteína, considerando que endopeptidases clivam ligações na proteína. Para endopeptidases, a ligação particular clivada é dependente da especificidade ou da preferência por aminoácidos distintos no substrato proteína. Assim, uma endopeptidase poderia apresentar uma preferência em clivar ligações peptídicas vizinhas a um resíduo hidrofóbico volumoso, considerando que outras preferem resíduos longos carregados ou mesmo dois ou mais resíduos química ou estruturalmente relacionados. A estrutura efetiva em torno do sítio ativo da protease dita a especificidade ou preferência. Os resíduos em torno do sítio de clivagem do substrato são denotados por $-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-$, a extensão $-P_1-P_1'$ sendo o sítio de clivagem. Similarmente, os resíduos da protease alinhados com o substrato são denotados por $-S_3-S_2-S_1-S_1'-S_2'-S_3'-$.

Quatro diferentes tipos de endopeptidases são descritas. Estas são as proteases de serina, proteases de cisteína, aspartil proteases e metaloproteases. Em cada caso as proteases geram um nucleófilo que ataca o peptídeo carbonila do substrato protéico.

As proteases de cisteína, que são hidrolases ativas em relação a ligações peptídicas por meio de um resíduo de cisteína, pertencem à subclasse 3.4.22 no sistema de numeração da EC. Quarenta proteases de ciste-

ina são correntemente classificadas nesse sistema, cobrindo enzimas como caspase-1, separase, algumas catepsinas e papaína (Car p 1). Várias outras proteases de cisteína foram identificadas e caracterizadas, mas não foram ainda classificadas no sistema de numeração da EC.

- 5 Além do sistema de numeração da EC, proteases são também classificadas em clãs e famílias com base na relação filogenética. Isto é, sua estrutura molecular e homologia de seqüências. Presentemente, o banco de dados MEROPS contém informação detalhada sobre 1.816 diferentes proteases. Nesse sistema, proteases são anotadas por uma letra que indica o tipo
- 10 catalítico (S, C, T, A, G, M ou U, para serina, cisteína, treonina, protease aspártica, protease glutâmica, metaloprotease ou protease desconhecida, respectivamente) seguida de um número arbitrário. As proteases de cisteína são divididas em cinco clãs. Pelo sistema, Car p 1 pertence ao clã CA, família C1 e recebe o nome C.01.001, em contraste com 3.4.22.2 no sistema de
- 15 numeração da EC.

- Os resíduos catalíticos responsáveis pela atividade de proteases de cisteína são bem conservados: uma cisteína (Cis), uma histidina (His) e uma asparagina (Asn) constituem a chamada tríade catalítica. Esses três resíduos geram um ânion tiolato nucleofílico de Cis. Um par de íons tiolato-
- 20 imidazólio é gerado a partir de His e Cis, o qual ataca a carbonila peptídica do substrato. Asn ajuda a orientar o íon imidazólio de His em posições favoráveis pelas várias etapas do mecanismo catalítico. A catálise acontece de uma maneira seqüencial. Primeiro, a enzima é temporariamente acilada pelo substrato protéico por meio do ânion tiolato. Segundo, uma parte do substrato
- 25 protéico é clivada seguida de desacilação e da adição de água. Finalmente, os resíduos do sítio ativo da protease de cisteína são reconstituídos em sua forma original.

- Além dos resíduos catalíticos, vários outros resíduos desempenham papéis importantes. Uma glutamina (Gln) constitui parte do que é
- 30 chamado buraco de oxiânions. Essa estrutura ajuda a estabilizar o estado intermediário de transição do substrato durante catálise. Vários resíduos hidrofóbicos mantêm um ambiente não-polar em torno de Asn, protegendo-o

de solvente externo. Estes são dois triptofanos (Trp), duas valinas (Val) e uma fenilalanina (Fe), todos resíduos conservados.

A catálise realizada por proteases de cisteína é fortemente dependente de um ambiente redutor, uma vez que a cisteína reativa é propensa a oxidação. Por essa razão, ensaios enzimáticos com proteases de cisteína poderão ser conduzidos com um agente redutor, por exemplo ditioneitol (DTT), cisteína livre ou β -mercaptoetanol.

A protease de cisteína Car p 1 da planta *Carica papaya* é a protease de cisteína mais estudada e bem entendida. Car p 1 é um membro da família C1 de proteases de cisteína que usualmente são secretadas e produzidas como pró-formas inativas. Car p 1 consiste em uma única cadeia de polipeptídeos de 212 aminoácidos com três pontes de dissulfeto. A cadeia de polipeptídeos é dobrada para formar uma proteína globular constituída de dois domínios interativos que delimitam uma fenda entre eles. Os resíduos de sítios ativos Cys25 e His159 localizam-se nessa fenda em domínios opostos. O domínio que abriga Cys25 é dominado por motivos estruturais α -helicoidais, considerando que o domínio que abriga His159 é dominado por motivos estruturais β -foliares. O terceiro resíduo catalítico Asn175 é residente em estreita proximidade com His159 em sequência e estrutura terciária.

À parte Cys25 que coordena a carbonila do substrato, Asn175 e Gln19 ajudam a manter o substrato no devido lugar para catálise por ligação de hidrogênios e constituem o núcleo do buraco de oxianions mencionado. O pH ótimo da atividade proteolítica de Car p 1 é de 6,0 – 7,0.

Der p 1, um importante alérgeno de HDM que se origina de suas fezes, é também um membro da família C1 de proteases de cisteína. Embora não ocupe um lugar no sistema de numeração da EC, ele é classificado no banco de dados de peptidases *MEROPS* com o número C.01.073. Der p 1 é excretado como uma pró-enzima no trato gastrointestinal de HDMs e é ativado por meio de remoção proteolítica do pró-peptídeo que forma a enzima madura que consiste em 222 aminoácidos com três pontes de dissulfeto. O quadro de leitura aberta codifica um peptídeo de sinal de 18 aminoácidos além de um pró-peptídeo de 80 aminoácidos. Der p 1 é estruturalmente mui-

to similar a Car p 1 e eles apresentam uma homologia estrutural de 80%, apesar de uma homologia de seqüências de 26%. O pH ótimo da atividade proteolítica de Der p 1 é de 7,0 – 8,0.

Em um aspecto da invenção, a(s) enzima(s) alergênica(s) é (são) uma ou mais selecionadas do grupo que consiste em Der p 1, Der p 3, Der p 6 e Der p 9.

Em outro aspecto da invenção, pelo menos uma das enzimas alergênicas é uma protease de cisteína tal como Der p 1.

Em outro aspecto ainda da invenção, pelo menos uma das enzimas alergênicas é uma protease de cisteína tal como uma ou mais selecionadas do grupo que consiste em Der p 3, Der p 6 ou Der p 9.

Em outro aspecto ainda da invenção, a preparação de vacina compreende pelo menos duas espécies diferentes de alérgenos, quer se originem da mesma fonte alérgica, quer se originem de diferentes fontes alergênicas, por exemplo alérgenos do grupo 1 e do grupo 3 de diferentes ácaros.

A enzima alergênica incorporada na preparação de vacina poderá ser na forma de um extrato, um alérgeno purificado, um alérgeno modificado, um alérgeno recombinante ou um mutante de um alérgeno recombinante. Um extrato alergênico poderá além dos alérgenos conter vários outros íons e moléculas. Um extrato alergênico poderá naturalmente conter uma ou mais isoformas do mesmo alérgeno, considerando que um alérgeno recombinante tipicamente representa somente uma isoforma de um alérgeno. A preparação de vacina poderá adicionalmente compreender um ou mais alérgenos que não apresentam uma atividade enzimática e/ou uma ou mais enzimas que não apresentam atividade alergênica.

Em um aspecto da invenção, a(s) enzima(s) alergênica(s) é (são) na forma de um extrato. Em outro aspecto da invenção, é medida a atividade enzimática de um importante alérgeno do extrato.

Em um aspecto ainda adicional da invenção, poderá ser medida a atividade enzimática de uma ou mais enzimas alergênicas em um extrato total.

Em outro aspecto da invenção, o alérgeno é um alérgeno recombinante. Em um aspecto adicional da invenção, o alérgeno é um mutante de baixa ligação com IgE que ocorre naturalmente ou um mutante recombinante de baixa ligação com IgE

- 5 Em um aspecto adicional da invenção, o alérgeno de baixa ligação com IgE é um alérgeno de acordo com WO 99/47680, WO 02/40676 ou WO 03/096869.

INIBIDORES DE ENZIMAS

- 10 A atividade enzimática pode ser afetada por outras moléculas tais como inibidores que são moléculas que diminuem ou abolem atividade enzimática.

- Um grande número de inibidores de proteases, tanto naturais quanto sintéticos, é descrito. Inibidores inativam a enzima por meio de diferentes mecanismos, por exemplo modificação covalente direta dos resíduos catalíticos ou por proteção do sítio ativo para entrada de substrato. O primeiro tipo de mecanismo é freqüentemente representado por pequenas moléculas com um grupo reativo a resíduos catalíticos, bloqueado desse modo, irreversivelmente, a atividade. Um exemplo de tal inibidor é o inibidor específico de protease de cisteína E-64, que se liga covalentemente à cisteína catalítica por meio de um grupo epóxido reativo. Esse último tipo de inibidor é freqüentemente uma estrutura macromolecular que se associa à enzima por interações não-covalentes múltiplas. Um exemplo de tal inibidor é o inibidor de tripsina de soja (SBTI), específico a proteases de serina. SBTI é uma proteína de 190 aminoácidos que ocorre naturalmente, que cobre a fenda do sítio ativo e, desse modo, os resíduos catalíticos, por ligação de hidrogênios, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas com a superfície da enzima.
- 15 catalíticos ou por proteção do sítio ativo para entrada de substrato. O primeiro tipo de mecanismo é freqüentemente representado por pequenas moléculas com um grupo reativo a resíduos catalíticos, bloqueado desse modo, irreversivelmente, a atividade. Um exemplo de tal inibidor é o inibidor específico de protease de cisteína E-64, que se liga covalentemente à cisteína catalítica por meio de um grupo epóxido reativo. Esse último tipo de inibidor é freqüentemente uma estrutura macromolecular que se associa à enzima por interações não-covalentes múltiplas. Um exemplo de tal inibidor é o inibidor de tripsina de soja (SBTI), específico a proteases de serina. SBTI é uma proteína de 190 aminoácidos que ocorre naturalmente, que cobre a fenda do sítio ativo e, desse modo, os resíduos catalíticos, por ligação de hidrogênios, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas com a superfície da enzima.
- 20 lítica por meio de um grupo epóxido reativo. Esse último tipo de inibidor é freqüentemente uma estrutura macromolecular que se associa à enzima por interações não-covalentes múltiplas. Um exemplo de tal inibidor é o inibidor de tripsina de soja (SBTI), específico a proteases de serina. SBTI é uma proteína de 190 aminoácidos que ocorre naturalmente, que cobre a fenda do sítio ativo e, desse modo, os resíduos catalíticos, por ligação de hidrogênios, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas com a superfície da enzima.
- 25 sítio ativo e, desse modo, os resíduos catalíticos, por ligação de hidrogênios, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas com a superfície da enzima.

- Em um aspecto da invenção, a preparação da vacina compreende diversas enzimas alergênicas. A fim de medir apenas a atividade de uma das enzimas alergênicas, poderia ser necessário usar inibidores correspondentes, dependendo do tipo de atividade enzimática que se deseja inibir. Em um aspecto adicional da invenção, é usado um inibidor para inibir
- 30 uma das enzimas alergênicas, poderia ser necessário usar inibidores correspondentes, dependendo do tipo de atividade enzimática que se deseja inibir. Em um aspecto adicional da invenção, é usado um inibidor para inibir

uma ou mais das enzimas alergênicas na preparação da vacina.

O uso de inibidores específicos em relação à enzima alergênica em questão é útil para obter uma caracterização melhor e identificação da atividade enzimática, bem como para a quantificação da quantidade de enzima ativa presente na preparação (por exemplo, titulação de sítios ativos). Em um aspecto da invenção, o inibidor de protease de cisteína utilizado é selecionado do grupo que consiste em E64 (L-trans-epoxissuccinil-L-leucilamino(4-guanidino)butano) e outros epóxidos. Em um aspecto adicional da invenção, o inibidor é E64.

10 SUBSTRATOS

A fim de ser capaz de medir a atividade enzimática de uma enzima alergênica adsorvida na fase sólida em um ensaio de atividade enzimática, deve ser identificado um substrato e, se necessário, um inibidor específico à enzima alergênica em questão.

Em um aspecto da invenção, o substrato no ensaio de atividade enzimática é específico à enzima em questão, o que significa que nenhuma outra enzima na mesma fonte alergênica é capaz de converter esse substrato em produto. Como exemplo, o substrato Z-Leu-Leu-Glu-MCA é específico a proteases de cisteína, por exemplo Der p 1, e não é clivado pelas outras proteases sabidas estar presentes nessa fonte alergênica (extratos de HDM), tais como as proteases de serina Der p 3, Der p 6 ou Der p 9. Em um aspecto da invenção, um substrato específico a uma enzima alergênica é usado para medir a atividade enzimática da enzima alergênica. Em um aspecto adicional da invenção, o substrato usado é Z-LeuLeuGlu-MCA.

25 ADJUVANTE DE SAL METÁLICO QUE CONTÉM OXIGÊNIO

Um adjuvante é um composto que atua para intensificar a resposta imune sobre vacinação.

O sal metálico que contém oxigênio a ser utilizado de acordo com a invenção poderá ser qualquer sal metálico que contém oxigênio que proporcione o efeito desejado quando formulado em um sistema de transferência. Exemplos de tais substâncias que contêm oxigênio são hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio, sulfato de potássio-

alumínio, fosfato de cálcio, Maalox (mistura de hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio), hidróxido de berílio, hidróxido de zinco, carbonato de zinco, cloreto de zinco e sulfato de bário.

Exemplos de sais metálicos adequados que contêm oxigênio são, por exemplo, aqueles em que o cátion é selecionado de Al, K, Ca, Mg, Zn, Ba, Na, Li, B, Be, Fe, Si, Co, Cu, Ni, Ag, Au e Cr.

O ânion do composto que contêm oxigênio poderá ser um ânion orgânico ou inorgânico, ou uma combinação de ânions orgânicos e inorgânicos. Exemplos de sais metálicos adequados que contêm oxigênio são, por exemplo, aqueles em que o ânion é selecionado de sulfatos, hidróxidos, fosfatos, nitratos, iodatos, bromatos, carbonatos, hidratos, acetatos, citratos, oxalatos e tartratos, bem como formas mistas destes. Os sais metálicos que contêm oxigênio compreendem adicionalmente complexos de coordenação. Uma definição de complexos de coordenação é dada em, por exemplo, *The Handbook of Chemistry and Physics* (Manual de Química e Física), 56 Ed., Seção B, Capítulo 7 (1975-76).

No presente contexto, a expressão "formas mistas" pretende incluir combinações de vários ânions, bem como combinações com, por exemplo, cloretos e sulfetos.

Embora o sistema de transferência compreenda um sal metálico que contêm oxigênio, considera-se que o oxigênio poderia ser substituído por outro átomo do Grupo VIA tal como S, Se ou TE.

Sais metálicos que contêm oxigênio podem ser caracterizados por meio de uma variedade de parâmetros físico-químicos tais como propriedades de adsorção, solubilidade e dissolução, carga iônica medida como ponto isoelétrico pI (pH em que a carga líquida da substância é zero para um composto passível de dissociação), constantes de dissociação, coordenação complexa, configurações eletrônicas, valência, orbitais de ligação e orbitais antiligação, propriedades de depósito, propriedades de adesão, características superficiais, características das partículas e adjuvanticidade.

Acredita-se que a substância biologicamente ativa seja adsorvida (ou acoplada) no sal metálico que contêm oxigênio e que essa adsorção

contribua para a eficácia da vacina. Diversos fatores poderão ser importantes ou influenciar a adsorção entre a substância ativa e o sal metálico que contém oxigênio (vide, por exemplo, P.M. Callahan e outros, *Pharmaceutical Research*, Vol. 8, No. 7.851.858 (1991), e *Vaccine Design. The Subunit and Adjuvant Approach*). Esses fatores incluem pH, a extensão de tempo em que a reação de adsorção é realizada em relação a condições de mistura, concentrações dos vários componentes nas vacinas, recipientes, temperatura, armazenamento, tampão e excipientes. Verificou-se adicionalmente que a adsorção da substância ativa poderá ser influenciada pela carga líquida/total do sal metálico e a carga da substância ativa, ambas as quais são dependentes do pH. Uma característica adicional que se acredita ser de importância é a solubilidade dos sais metálicos que contêm oxigênio.

O sal metálico que contém oxigênio poderá adicionalmente apresentar um efeito de depósito. Um efeito de depósito significa que a substância ativa será liberada gradualmente da vacina. A substância ativa será, assim, retida com o(s) sal (sais) metálico(s) que contém (contêm) oxigênio e gradualmente liberada dele(s). Acredita-se que isso apresente vários efeitos benéficos, por exemplo estimulação prolongada, liberação benéfica de fármaco e proteção das substâncias biológicas interativas contra condições ambientais. Acredita-se adicionalmente que o sal metálico que contém oxigênio possa possuir certas propriedades de captura, retendo desse modo a substância ativa a ser liberada.

Uma outra característica de sais que contêm oxigênio é a proteção da substância ativa, seja mantendo o pH ideal para a substância ativa no microambiente, evitando assim degradação ácida, ou pela proteção da substância ativa contra degradação enzimática, permitindo desse modo que a substância seja liberada.

Adicionalmente, alguns dos sais metálicos que contêm oxigênio apresentam uma capacidade de tamponamento. Essa capacidade poderá resultar em um microambiente *in vivo* na formulação de vacina, o qual protege a substância ativa do ambiente degradável. Isso poderá, por exemplo, ser uma vantagem para o estômago ou intestino, onde há um risco de degrada-

ções ácida e enzimática, respectivamente.

Alguns sais metálicos que contêm oxigênio, por exemplo hidróxido de alumínio, apresentam a forma de um gel suspenso em um solvente, tipicamente água. Quando se agita o gel, isto é, a fase sólida, ocorrerá uma distribuição uniforme em todo o volume da suspensão, encerrando, portanto, toda a água, isto é, a fase líquida, presente. Quando deixado em repouso ou quando submetido a um processo de separação, tal como centrifugação, uma parte da água será separada do gel. A quantidade de água separada dependerá do processo de separação usado, bem como do tipo e concentração do sal metálico que contém oxigênio utilizado.

Em um aspecto da invenção, o sal metálico que contém oxigênio é selecionado do grupo que consiste em hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio e fosfato de cálcio.

Em um aspecto da invenção, o sal metálico que contém oxigênio é hidróxido de alumínio. A fórmula molecular do hidróxido de alumínio é $\text{Al}(\text{OH})_3$. Isso, contudo, subestima a verdadeira complexidade do composto. A composição estrutural molecular é um octaedro. Alumínio está no centro do plano de simetria da bipirâmide, hidróxidos nas interseções conectivas e moléculas de água em todo o resto. O octaedro individual combina estruturas macromoleculares de octaedros frouxas. À medida que mais octaedros se combinam, a razão de alumínio para oxigênio aproxima-se assintoticamente de 1:3, à medida que mais hidrogênio da água é deslocado.

A aparência física do hidróxido de alumínio é uma suspensão em gel com fluidez decrescente de acordo com teor crescente de alumínio. O gel agrega-se e, portanto, sedimenta-se quando armazenado devido à sua alta densidade, deixando uma fase aquosa acima dele. O tamanho típico das partículas de um agregado de hidróxido de alumínio situa-se na área de dois para três μm . Hidróxido de alumínio apresenta um ponto de carga zero (PZC) de 9,1. O PZC é equivalente ao pI em proteína, que é o valor de pH em que a molécula apresenta uma carga líquida total de zero. Os pIs de Car p 1 são 8,75 e para Der p 1, 4,6-6,6 (dependendo dos diferentes isômeros de Der p 1).

Adicionalmente, mostra-se que o microambiente que circunda o adjuvante de hidróxido de alumínio apresenta um pH diferente daquele da solução em massa. Isso se deve à atração de ânions, incluindo hidroxilas, que formam uma camada dupla que envolve as partículas de adjuvante.

5 A base da adsorção de proteínas em hidróxido de alumínio é principalmente mediada por sua diferença de cargas. Uma diferença substancial no PZC para pl sob pH constante é necessária a fim de estabelecer as interações eletrostáticas exigidas para a adsorção. Isso é sustentado pelo potencial de Nernst ou pelo potencial superficial para hidróxido de alumínio
10 dado por

$$\text{Potencial superficial} = 59 \text{ mV} \cdot (\text{PZC} - \text{pH})$$

Proteínas com um pl menor que PZC serão capazes de ligar-se a hidróxido de alumínio. Quanto maior a diferença entre PZC e pH, maior é o potencial do adjuvante de hidróxido de alumínio e mais intensa a interação
15 eletrostática entre hidróxido de alumínio e proteína, uma vez que o pl da proteína é menor que o PZC do hidróxido de alumínio.

Outras interações incluem ligações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio, mas não são elas mesmas suficientes para orientar a adsorção se nenhuma diferença significativa de cargas existe
20 entre as moléculas. Assim, em teoria, Car p 1 não deverá, ou pelo menos em baixo grau, adsorver-se em hidróxido de alumínio, considerando que Der p 1 deverá ser adsorvido devido a grande diferença de cargas em comparação com hidróxido de alumínio.

ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

25 A finalidade do ensaio de atividade enzimática é obter uma curva de progresso de uma reação catalisada por enzima. A velocidade inicial é estimada como a taxa inicial de formação de produto ou a diminuição inicial na concentração de substrato. Isso pode ser obtido de diferentes maneiras, dependendo da reação enzimática, as mais populares sendo absorvância,
30 fluorescência ou alteração de pH. Uma curva de progresso de enzima é a concentração de produto como função do tempo. No presente contexto, o termo "ensaio de atividade enzimática" refere-se a qualquer ensaio apropria-

do, dependendo da enzima alergênica a ser medida. Pelo método escolhido, deverá ser possível seguir e quantificar o consumo de substrato e/ou a geração de produto, por métodos que sejam compatíveis e não alterados pela presença do veículo em fase sólida, por exemplo por métodos espectroscópicos tais como absorbância, fluorescência, FTIR (Espectrometria de Infravermelho por Transformadas de Fourier), por métodos imunológicos, por exemplo ELISA, e similares. Antes de decidir sobre um ensaio, é prática padrão para aquele versado na técnica verificar se a presença da fase sólida não interfere na catálise enzimática, com as condições de ensaio (por exemplo, ligando o substrato e/ou o produto, alterando as condições de pH, etc.), ou com o próprio método de medição, de uma maneira que afete os resultados medidos, como, por exemplo, exemplificado nos exemplos dados neste relatório.

Em um aspecto da invenção, o ensaio é um ensaio de fluorescência no qual a formação de produto é medida em função do tempo. O substrato pode ser feito de um peptídeo sintético ligado a um grupo fluorescente que é extinto pelo peptídeo e apresenta intensidade de fluorescência relativamente baixa enquanto ligado ao peptídeo, tais como os substratos de protease de cisteína Boc-Gln-Ala-Arg-MCA, Z-Leu-Leu-Glu-MCA ou Z-Fe-Arg-MCA, nos quais MCA é o grupo fluorescente. Quando uma enzima cliva a ligação entre o grupo fluorescente e a seqüência de peptídeos, a fluorescência aumenta dramaticamente. O peptídeo pode ser projetado para satisfazer as exigências de especificidade da enzima.

Quando a enzima alergênica, em um aspecto da invenção, é uma protease de cisteína, o resíduo ativo de cisteína precisa estar em sua forma reduzida a fim de que a protease seja enzimaticamente ativa. Nesse aspecto da invenção, a enzima alergênica é incubada com um agente redutor para ativar a enzima alergênica. É importante que o agente redutor esteja presente em uma concentração suficiente de modo a reduzir totalmente o resíduo de cisteína em sítios ativos, mas não em um excesso de concentração tal que reduza as pontes de dissulfeto da enzima.

Em um aspecto da invenção, é medida a atividade enzimática

da mistura de fase líquida e fase sólida da preparação de vacina. Em um aspecto adicional da invenção, a preparação de vacina é submetida a um processo de separação para separar a fase líquida e a fase sólida a fim de tornar possível medir a atividade enzimática da fase sólida e da fase líquida separadamente. A separação pode ser realizada por meio de qualquer método apropriado. Em um aspecto da invenção, o processo de separação é realizado por centrifugação, extração ou sedimentação simples. Dependendo do ensaio enzimático específico usado e da qualidade da amostra da fase sólida, pode ser necessário usar, por exemplo, soluções tampões a fim de obter uma amostra apropriada antes de medir a atividade enzimática da(s) enzima(s) alergênic(a)s.

Em um aspecto da invenção, a preparação de vacina é submetida somente a uma medição da atividade enzimática de enzima alergênica na mistura da fase líquida e da fase sólida (medição 1).

Em um aspecto adicional da invenção, a preparação de vacina é submetida somente a uma medição da atividade enzimática de enzima alergênica na fase líquida após uma separação da fase líquida da fase sólida (medição 2).

Em um aspecto adicional da invenção, a preparação de vacina é submetida somente a uma medição da atividade enzimática de enzima alergênica na fase sólida após uma separação da fase líquida da fase sólida (medição 3).

Em um aspecto ainda adicional da invenção, a preparação de vacina é submetida tanto a uma medição da atividade enzimática da mistura da fase líquida e da fase sólida (medição 1), e a uma medição de atividade enzimática de enzima alergênica na fase líquida (medição 2).

Em um aspecto ainda adicional da invenção, a preparação de vacina é submetida tanto a uma medição da atividade enzimática de enzima alergênica na fase líquida (medição 2), e a uma medição da atividade enzimática de enzima alergênica na fase sólida (medição 3).

A distribuição das enzimas alergênicas entre a fase líquida e a fase sólida é um parâmetro que é característico para cada enzima alergênica

e, portanto, poderá servir para caracterizar o estado e a atividade imunológica de uma preparação de vacina. Conseqüentemente, a finalidade dos aspectos acima da invenção que envolvem medições da atividade enzimática de várias combinações de diferentes fases da preparação de vacina e/ou de toda a preparação de vacina é fornecer informação adicional sobre a atividade imunológica da preparação de vacina.

Em outro aspecto da invenção, é medida a atividade enzimática de uma solução de enzimas alergênicas usada para preparar a preparação de vacina com adjuvante, e a medição dessa solução é comparada com a medição obtida para a preparação de vacina com adjuvante a fim de avaliar o efeito sobre a atividade enzimática da preparação de vacina com adjuvante.

Em outro aspecto ainda da invenção, a preparação de vacina é submetida à medição de atividade enzimática imediatamente após preparação e após um ou mais períodos de armazenamento, e a indicação da atividade imunológica da preparação de vacina baseia-se em uma comparação daquelas e dessas últimas medições.

Em outro aspecto da invenção, a indicação da atividade imunológica da preparação de vacina baseia-se em uma comparação da medição obtida para a preparação de vacina com adjuvante e de medições correspondentes anteriores do mesmo tipo de preparação de vacina com adjuvante ou de outro tipo de preparação de vacina.

MÉTODOS E MATERIAIS

PREPARAÇÃO DE VACINAS COM ADJUVANTE DE GEL DE ALUMÍNIO COM ALÉRGENOS

Alérgeno liofilizado é dissolvido em tampão aquoso e diluído até uma concentração desejada. "Alidrogl" (1,3%) é adicionado à solução de alérgeno obtida enquanto sob agitação e, em seguida, água estéril é adicionada. A solução resultante é deixada permanecer em repouso até o dia seguinte e, em seguida, tampão é adicionado lentamente enquanto sob agitação para produzir o gel final de hidróxido de alumínio com alérgeno.

IMUNELETROFORESE ROCKET

OBJETIVO

Esse método foi usado para quantificar uma dada proteína mediante medição da propagação de complexo proteína-anticorpos após eletroforese em um gel de agarose contendo anticorpos orientados contra a proteína sob investigação.

TEORIA

Esse método baseia-se na mobilidade de complexo proteína-anticorpos em um gel de agarose durante eletroforese. Os anticorpos são incorporados no gel de agarose durante polimerização e a proteína de amostra é então aplicada aos poços. As proteínas deslocam-se de acordo com sua mobilidade eletroforética encontrando os anticorpos no gel e formando complexos. Esses complexos desenvolvem-se em tamanho à medida que os antígenos encontram cada vez mais antígenos, limitando desse modo a migração através dos poros do gel até nenhuma migração adicional ocorrer. Os complexos são visualizados corando o gel. A área delimitada pelos complexos é proporcional à quantidade de proteína aplicada ao poço. A quantificação é realizada em relação a uma preparação padrão interna aplicada em uma série de diluições no mesmo gel.

APARELHOS:

Banho-maria controlado por termostato aquecido a 56-60°C
 Aparelho de eletroforese (2 recipientes com tampões, 2 eletrodos, superfície resfriada e câmara)
 Alimentação de energia, Immuno Power 320, Kebo Lab A/S
 Insuflados de ar quente, Team International HL2

25 MATERIAIS E REAGENTES:

Placa de vidro: 7 x 10 cm
 Wicks de papel: papel de filtro, tamanho padrão: 21 x 10 cm, Watman
 Tampão para recipientes com eletrodos e gel de agarose:
 Ácido 5,5-dietilbarbitúrico 0,1 M, Veronal, Tris 0,40 M, Sigma,
 Lactato de cálcio 2 mM, Purum
 Gel de agarose contendo anticorpos:

Agarose 1% (p/v), tipo HAS, Litex

Anticorpo: Rb-a-Derp1, ALK-Abelló A/S

SOLUÇÃO DE CORAÇÃO:

- 5 Azul Brilhante de Coomassie R-250 6 mM, Pierce, ácido acético a 10%, Bie & Berntsen, em etanol a 43,2%

SOLUÇÃO DE DESCORAÇÃO:

Ácido acético a 10%, Bie & Berntsen, em etanol a 43,2%

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- 10 Uma placa de vidro foi colocada sobre uma superfície nivelada e limpa com etanol. 11 mL de agarose foram pipetados em um tubo de ensaio em um banho de água a 56°C, 15 µL de anticorpos foram adicionados e a solução foi misturada com moderação por inversão. A agarose foi derramada sobre a placa de vidro cuidadosamente evitando formação de bolhas de ar. Após gelação, uma série de poços foi perfurada a 1,5 cm da borda inferior da placa. A placa foi colocada sobre a superfície resfriada do aparelho de eletroforese. Pontes de ligação de 5 camadas de papel de filtro foram estabelecidas e a tensão através do gel ajustada em 2 V/cm. 10 µL de amostra foram aplicados aos poços. Uma outra placa de vidro foi colocada no alto das pontes de ligação de papel de filtro para evitar condensação de água no gel e eletroforese foi continuada da noite para o dia.

- 25 Após a eletroforese ser conduzida, a placa de vidro foi colocada sobre papel de vidro e os poços cheios de água destilada. Em seguida, o gel foi coberto com papel de filtro úmido e prensado sob diversas camadas de papel de filtro seco, uma placa de vidro espessa e uma carga de 3-4 kg. Após dez minutos o procedimento foi repetido. A placa foi então colocada em um recipiente com NaCl 0,1 M por 15-30 minutos seguido de prensagem conforme descrito acima. Após esse procedimento, a placa foi secada em uma corrente de ar quente e as placas coradas por 5 min em solução de coração de Coomassie. A placa foi imersa em água destilada por alguns segundos a fim de remover excesso de solução de coração. Finalmente a placa foi descorada por 2 minutos em banhos sucessivos até a descoloração desejada ser atingida. A placa foi secada com ar quente e digitalização do gel

foi efetuada pelo *software* Gel-Pro Analyzer 3.1.

PURIFICAÇÃO DE DER P 1

OBJETIVO

A finalidade é a purificação de Der p 1 a partir de extrato de *D. pteronyssinus*.

TEORIA

A purificação de Der p 1 envolve diversas etapas. Aplicação de dois tipos de etapas cromatográficas por afinidade conduz ao Der p 1 purificado. A primeira cromatografia foi realizada em uma coluna de SBTI-agarose. A finalidade dessa etapa é a remoção de proteases de serina contaminantes presentes no extrato, proporcionando um extrato mais estável.

A segunda etapa da purificação é realizada em uma coluna de sefarose 4C1B8. 4C1B8 é um anticorpo monoclonal de camundongo específico a Der p 1 (de *Martin Chapman*). O Der p 1 é eluído mediante aplicação de um gradiente de pH.

Fluxograma da purificação é mostrado na figura 1.

Uma purificação adicional em uma coluna de SBTI é realizada a fim de remover completamente traços da protease de serina de Der p 3 que se co-purifica na etapa anterior. As frações que contêm Der p 1 foram coletadas e concentradas por ultrafiltração.

APARELHOS:

Sistema explorador *FPLC ÄKTA*, Amersham Biosciences

Centrífuga Sorval RC 3B Plus, Du Pont

MATERIAIS E REAGENTES:

Purificação por afinidade:

Colunas: coluna de SBTI-agarose para Der p 1 (SBTI-agarose), volume da coluna (VC), 1 mL.

Coluna de CNBr-sefarose 4C1B8 mAb para Der p 1 (4C1B8-sefarose), VC, 5 mL.

Extrato de ácaros do pó doméstico de *D. pteronyssinus* Tampões para purificação cromatográfica:

A11: Solução salina tamponada com fosfato (PBS), Bie & Bernt-

sen

A2: PBS, NaCl 0,5 M, Merck

B1: Glicina 0,1 M, pH 11, Sigma, NaCl 0,5 M, Merck

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA:

- 5 Dispositivos de filtro para centrífuga, Amicon Ultra-15 15 mL, Millipore.

TROCA DE TAMPÃO:

Coluna de dessalgação PD 10, Amersham Biosciences

Procedimento Experimental

10 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

- 120 mg de extrato de Der p foram dissolvidos em 10 mL de tampão A11. A amostra foi filtrada com um filtro de baixa ligação de proteína de 0,22 µm. A fim de reduzir possível proteólise de Der p 1, todas as operações foram realizadas a 5°C. Todos os tampões usados foram resfriados a 5°C também.

CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE EM COLUNA DE SBTI-AGAROSE

- A coluna de SBTI-agarose foi equilibrada com tampão A11 e 5 mL da amostra preparada foram injetados na coluna. Amostras de 50 µL de frações foram tomadas para investigação posterior e congeladas separadamente. As frações da vazão contendo Der p 1 foram reunidas para purificação posterior.

CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE EM COLUNA DE 4C1B8-SEFAROSE

- A coluna foi equilibrada com tampão A11 e 5 mL de amostra (*pool* purificado por SBTI-agarose) foram injetados na coluna. O material não-especificamente ligado foi eluído com tampão A2. Em seguida, Der p 1 foi eluído com um gradiente de tampão B1. Tampão de Fosfato 800 mM, pH 7, foi pipetado nos tubos de coleta (200 µL/mL de fração) destinados à coleta de Der p 1 a fim de neutralizar o eluato alcalino. Amostras de 50 µL de frações foram removidas e congeladas separadamente para investigação posterior. Frações do pico de eluição foram reunidas e congeladas.

As frações contendo Der p 1 foram reunidas e submetidas a uma segunda cromatografia em SBTI-agarose, sob as mesmas condições

descritas anteriormente.

PROCESSOS DE PÓS-PURIFICAÇÃO

O *pool*, em torno de 140 mL, da segunda purificação em coluna de SBTI foi concentrado por ultrafiltração, usando filtros para centrífuga *Amicon* Ultra-15 15 mL. Os filtros foram lavados com tampão de PBS e o Der p 1 reunido centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos reduzindo o volume para 5 mL.

O tampão foi mudado para Tris 50 mM, pH 7, usando a coluna de dessalgação PD-10 recheada com Sephadex G-25 para separar altos pesos moleculares (PM > 5.000) de substâncias com baixos pesos moleculares (PM < 1.000).

ABSORBÂNCIA

OBJETIVOS

Esse método é utilizado para avaliar concentração total de proteínas

TEORIA

Os aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina absorvem luz ultravioleta. Entretanto, somente triptofano e tirosina absorvem a 280 nm, e triptofano absorve 5 vezes mais luz que tirosina. Isso é devido à transição $n \rightarrow n^*$ no anel indol do triptofano, no qual fenilalanina e tirosina contêm um grupo fenila. A absorbância de uma proteína correlaciona-se linearmente com a quantidade de triptofano e tirosina na proteína, com o comprimento do caminho da luz e com a concentração de proteína. Essa relação é chamada lei de Lambert-Beer e é dada por:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Em que A é a absorbância, ϵ é o coeficiente de absorção molar da proteína (determinado pela quantidade de triptofano e tirosina na proteína), l é o comprimento do caminho da luz e c é a concentração de proteína. Assim, a partir de uma medição de absorbância pode-se estimar a concentração de proteína se o coeficiente de absorvidade molar é conhecido.

APARELHOS

Espectrômetro *Lambda 800 UV/VIS*, Perkin-Elmer®

100-QS, cadinhode quartzo, comprimento do caminho, 1 cm, Hellma®

MATERIAIS E REAGENTES

- 5 Bis-Tris a 50 mM, pH 6,5, Sigma
 Tris a 50 mM, pH 7,0, Sigma
 Tampão de fosfato a 50 mM, pH 7,0, Merck
 Solução Helmanex a 2%, Hellma

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- 10 O espectrofotômetro foi ligado 30 min antes de usar para um período de aquecimento. O comprimento de onda do espectrofotômetro foi ajustado a 280 nm e o instrumento zerado sob uma amostra em branco contendo a matriz da amostra verdadeira. O cadinho de quartzo foi lavado primeiro com uma solução Helmanex a 2% e, em seguida, 4 vezes com água MQ, e, depois, secado com ar a alta pressão. Após secagem com ar, o exterior do cadinho foi limpo com lenço de limpar lentes. Esse procedimento foi realizado entre cada medição de amostra. Após limpeza do cadinho, 200 µL de amostra foram transferidos para o cadinho e a absorbância medida.

ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA (ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA)

APARELHOS

- 20 *Spectra MAX GeminiXS, Molecular Devices*
 Placa de poliestireno negra não-aderente de 96 poços, Corning
 Centrífuga *Sepatech, Heraeus*
 Misturador, *Janke & Kunkel*

MATERIAIS E REAGENTES

- 25 Der p 1 purificado
 Papaína purificada (Car p 1), Sigma
 Boc-QAR-AMC a 10 mM, Bachem
 Z-FR-AMC a 10 mM, Bachem
 E-64 0,70 a mM em DMF, Merck
 30 DTT a 1 M, Sigma
 EDTA a 100 mM, Bie & Berntsen
 Tampão Tris a 50 mM, pH 7,0, Sigma

Tampão Bis-Tris a 50 mM, pH 6,5, Sigma

Tampão de fosfato a 50 mM, Merck

6,686 mg/mL de hidróxido de alumínio, Brenntag Biosector

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- 5 Soluções de estoque de DTT 1 a M e EDTA 100 a mM foram produzidas no começo do período experimental, congeladas a -20°C e usadas por todo o período do projeto. A cada dia um novo tampão foi produzido contendo o agente redutor DTT e EDTA das soluções de estoque. Para uma descrição de condições de ensaio, vide tabela 4. DTT é continuamente oxidado pelo oxigênio no ar e, portanto, um novo tampão tem de ser produzido a cada dia. Para se beneficiar de medições de altas vazões, uma placa de microtitulação de 96 poços foi utilizada e cada poço tinha um volume de ensaio de 200 µL. A placa de microtitulação era opaca para evitar contaminação cruzada de fluorescência emitida entre poços. O substrato foi diluído até a concentração final no tampão produzido de novo contendo DTT e EDTA e transferido para a placa de microtitulação. A enzima foi diluída no mesmo tampão e incubada por 10 min no caso de papaína e 20 min no caso de Der p 1, para sua ativação. Mistura, transferência e incubação foram realizada a temperatura ambiente. Após incubação, a solução de enzima foi transferida para a placa de microtitulação e as medições foram iniciadas. As medições foram realizadas por 10 min com um total de 36 medições para cada poço e mistura automática entre cada medição.

TABELA 4. CONDIÇÕES PARA ENSAIO ENZIMÁTICO

Variáveis	Papaína	Der p 1
25 Substrato	Z-FR-AMC	Boc-QAR-AMC
Inibidor	E-64	E-64
DTT	1-5 a mM	5 a mM
EDTA	1-5 a mM	1 a mM
Tampão	Bis-Tris 50 a mM	Tris 50 a mM
30 Temperatura	37°C	37°C
pH	6,5	7,0
Tempo de incubação, ativação	10 min	20 min

O volume de ensaio não foi dividido igualmente para cada experimento. Assim, os volumes específicos para enzima, substrato, tampão e inibidor foram diferentes de experimento para experimento, dependendo da finalidade do experimento (Tabela 5).

5 **TABELA 5. VOLUMES DE ENSAIO ENZIMÁTICO**

	Variáveis	Atividade	Cinética	Titulação de sítios ativos
	Enzima	50 µL	50 µL	50 µL
	Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
	Inibidor	-	-	-
10	Tampão	50 µL	50 µL	-
	Total	200 µL	200 µL	200 µL

Após medição da atividade enzimática, a inclinação máxima da curva de progresso foi estimada usando o *software SoftMax® PRO Life Sciences Edition, Molecular Devices, 2001*. Após estimar a velocidade inicial dos experimentos, eles foram transferidos para Prism e analisados.

ENSAIO DE LIGAÇÃO DE IGE

Ensaio de inibição de IgE para alérgeno em solução e para alérgeno adsorvido e depois eluído de um adjuvante de gel de hidróxido de alumínio.

20 Esse ensaio avalia a capacidade que um alérgeno tem de ligar-se a IgE de soros de pacientes alérgicos nessa fonte de alérgenos. Nesse contexto, esse ensaio foi usado para avaliar a influência da ligação de um alérgeno a hidróxido de alumínio sob sua capacidade de ligar-se a IgE e, portanto, sob sua atividade alergênica.

MÉTODO

25 Experimentos de inibição de IgE foram realizados em um instrumento centauro ADVIA. Diluições em série (realizadas com TECAN (P-05-07F294)) do inibidor (antígeno em solução ou vacina com adjuvante em gel de antígenos) foram misturadas com uma quantidade fixa de antígeno biotinado e adicionalmente incubadas com IgE absorvido em uma fase sólida. A
30 quantidade de alérgeno biotinado ligado à fase sólida foi estimada como a luz emitida após incubação com estreptavidina marcada com éster acridíni-

co. Os dados brutos foram processados em Excel e transferidos para GraphPad Prism v. 4.0 para análise final (ajuste de curva, traçado de gráfico e comparações estatísticas). Os dados foram ajustados sob uma função logística de quatro parâmetros:

$$Y = B + \frac{T - B}{1 + 10^{(\log_{10} EC_{50} - \log_{10} X) \cdot \text{Inclinação}}}$$

- 5 e curvas ajustadas foram consideradas paralelas se a Inclinação de Hill (HS) dos ajustes individuais não diferiam significativamente.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- Devido à natureza do hidróxido de alumínio, não é possível avaliar ligação de IgE na presença de hidróxido de alumínio. Portanto, o efeito de adsorção de Der p 1 em hidróxido de alumínio sobre Der p 1 foi avaliado após eluição do Der p 1. Uma amostra de 500 µL de 165 µg/mL de Der p 1 foi incubada com 100 µL de 6,868 mg/mL de hidróxido de alumínio por 1 hora a 4°C. Após a adsorção, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm. O pélete foi ressuspenso em 300 µL de tampão de fosfato 50 a mM e
- 10 incubado por 2 horas a fim de eluir de hidróxido de alumínio o Der p 1 adsorvido. Um controle de 300 µL de 165 µg/mL de Der p 1 sem hidróxido de alumínio foi tratado da mesma maneira. Uma amostra de extrato de Der p foi preparada para incubação com IgE sérico pooled.

EXEMPLO 1

- 20 OTIMIZAÇÃO DO SUBSTRATO E ENZIMA

1.1 FLUORESCÊNCIA DO SUBSTRATO

- Embora a fluorescência de AMC extinga-se enquanto ligado ao peptídeo, alguma fluorescência pode ainda ser medida. A influência de fluorescência do substrato no ensaio foi avaliada mediante realização de medições de fluorescência do substrato sob diferentes concentrações. Con-
- 25 trações de 0 µM a 200 µM do substrato foram usadas e fluorescência de ponto final foi medida (figura 2a).

A regressão linear que descreve a relação entre concentração e fluorescência do substrato apresenta a inclinação de:

$$\beta_1 = 39.07 \pm 1.02 \frac{\text{RFU}}{\mu\text{M}(\text{Substrate})}$$

Isso indica que a fluorescência decresce 39,07 RFU toda vez que 1 μM de substrato é clivado. Uma vez que 1 μM de substrato produz 1 μM de AMC, o aumento de fluorescência de AMC produzido é de 4106 RFU, o que significa que o aumento líquido de fluorescência, quando o substrato é hidrolisado produzindo AMC, é:

$$\beta_{\text{net}} = 4106 \frac{\text{RFU}}{\mu\text{M}} - 39.07 \frac{\text{RFU}}{\mu\text{M}} = 4067 \frac{\text{RFU}}{\mu\text{M}}$$

Todas as medições de fluorescência foram convertidas em uma concentração de AMC produzido, após a curva-padrão apresentada na figura 2b.

1.2 CONCENTRAÇÕES DE ENZIMA E SUBSTRATO

Estudos preliminares de enzima otimizada e concentração de substrato para o ensaio de atividade enzimática foram realizados. Todos os experimentos foram realizados com DTT 1 a mM e EDTA 5 a mM em concentrações de ensaio. Da literatura, papaína deverá estar presente em faixa de nM e o substrato em faixa de μM , dependendo do substrato (Schulz e outros; *A Sensitive Fluorescent Assay for Measuring the Cysteine Protease Activity of Der p 1, a Major Allergen from the House Dust Mite Dermatophagoides pteronyssinus*, *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*, Vol. 51, pp. 222-224, 1998; John e outros, *Functional Effects of the Inhibition of the Cysteine Protease Activity of the Major House Dust Mite Allergen Der p 1 by a Novel Peptide-based*, *Clinical and Experimental Allergy*, Vol. 30, pp. 784-793, 2000; Szabelski e outros, *Influence of Me_2SO and Incubation Time on Papain Activity Studied Using Fluorogenic Substrates*, *Acta Biochemica Polonica*, Vol. 48:4, pp. 995-1002, 2001). Para otimizar as condições exatas, foi utilizado um projeto experimental 3 x 3 (figura 3).

Para a concentração de enzima a 1 nM, o sinal medido em RFUs foi aproximadamente igual ao LOQ do ensaio (LOQ = 2,44 RFU s). Isso torna as medições com enzima 1 a nM muito não confiável. Para a so-

lução de papaína 2,5 nM, as medições foram pelo menos 2,3 vezes o LOQ, e para a solução de papaína a 10 nM, foram 10,6 vezes. Esses resultados sustentam uma correlação linear entre as medições de atividade e a concentração de papaína (vide figura 3(b)). A curva de progresso da solução de papaína a 10 nM com substrato a 200 μ M (que forneceu a mais alta atividade) mostrou que o RFU não excedeu 15.000 até 4 min. Essa foi uma faixa razoável para o RFU, uma vez a velocidade inicial é medida nos primeiros dois minutos e a correlação entre RFU e concentração de AMC é ainda linear. Ao mesmo tempo, a correlação entre a concentração de substrato e a atividade enzimática medida foi não linear, indicando que as concentrações de substrato usadas neste experimento foram maiores que K_M . A partir desses resultados, foram escolhidas concentrações de substrato abaixo de 200 μ M e concentrações de papaína a 10 nM, uma vez que a atividade medida foi pelo menos uma ordem de magnitude maior que o LOQ.

15 EXEMPLO 2

EXPERIMENTOS PRELIMINARES SOBRE ADSORÇÃO DE HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO

2.1 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA NA PRESENÇA DE HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO

20 Para estabelecer se foi possível determinar a concentração de proteína por espectroscopia de absorção em uma amostra contendo hidróxido de alumínio, foram realizadas medições de absorção de papaína na presença e ausência de hidróxido de alumínio.

A absorbância das amostras contendo hidróxido de alumínio apresentou um alto nível de espalhamento de luz, que era esperado dada a turbidez da solução (figura 4). Uma vez que diluição da amostra resulta em concentrações de proteína menores que o limite de quantificação, esse método não é válido para estimativa de proteína sob as condições dadas. Portanto, concentração de proteína em uma amostra contendo hidróxido de alumínio foi determinada indiretamente, subtraindo a quantidade de proteína não ligada a hidróxido de alumínio (na fase líquida) da quantidade de proteína na preparação de controle (na ausência de hidróxido de alumínio).

2.2 SEDIMENTAÇÃO DE HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO

Para investigar se o hidróxido de alumínio sedimenta durante o intervalo de tempo do ensaio enzimático, sedimentação foi medida como A_{400} em função do tempo. O perfil de sedimentação gravitacional mostrou um limite de sedimentação em 40 min. (figura 5). Uma vez que o ensaio enzimático completa-se em 10 min, sedimentação não ocorre no ensaio.

EXEMPLO 3

COMPONENTES DO ENSAIO

A fim de verificar se componentes do ensaio adsorvem em hidróxido de alumínio, afetando desse modo o resultado do ensaio enzimático, os experimentos de ligação seguintes foram realizados (Tabela 6).

Mediação	AMC	Z-FR-AMC	Boc-QAR-AMC	E-64*
Ponto final	X	X	X	
Atividade		X	X	X

Tabela 6. Visão geral de métodos utilizados para avaliar a influência de hidróxido de alumínio sobre os componentes do ensaio. *E-64 não mostrou qualquer absorção distinta de luz entre 200 nm e 900 nm.

Todos os ensaios enzimáticos que descrevem possíveis interações com hidróxido de alumínio foram realizados com papaína, sob uma concentração final a 5 nM. EDTA foi adicionado sob 1 mM e DTT sob concentrações finais a 5 mM. A concentração de hidróxido de alumínio foi de 1,14 mg/mL. Uma vez que a medição de absorção de 1,14 mg/mL de hidróxido de alumínio apresenta um alto nível de espalhamento de luz, medições de pontos finais são realizadas apenas em amostras sem hidróxido de alumínio. Para todos os experimentos relativos a influência de hidróxido de alumínio sobre componentes do ensaio, adsorção de hidróxido de alumínio foi realizada por 15 min, 30 min e 60 min.

3.1 AMC

Avaliou-se se AMC, o produto do ensaio, adsorve em hidróxido de alumínio em função do tempo. Medições de AMC em triplicata sob A_{350} foram realizadas em um controle sem hidróxido de alumínio e em uma amostra de sobrenadante, ou fase líquida (figura 6), em função do tempo. O

sobrenadante é obtido de um experimento de adsorção se 2 μM de AMC em 1,14 mg/mL de hidróxido de alumínio foram misturados, e, em seguida, a fração de fase sólida foi separada da fase líquida por centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm. Uma ANOVA de duas vias dos resultados mostrou que os dois fatores, absorbância e tempo (valor de $p = 0,40$ e valor de $p = 0,066$, respectivamente), não apresentaram efeito significativo sobre os resultados. O termo de interação entre fatores (valor de $p = 0,70$) não mostrou efeito significativo. Assim, AMC não adsorveu significativamente em hidróxido de alumínio sob as condições dadas por um período de tempo até uma hora.

Para verificar se a presença de hidróxido de alumínio extinguiu a fluorescência de AMC, foi conduzido um experimento em que a fluorescência de AMC a 1 μM foi medida com e sem hidróxido de alumínio, em função do tempo. Isso indicou que nenhuma extinção ocorreu durante o tempo do ensaio (figura 7). Essa concentração de AMC é equivalente à concentração de AMC no ensaio enzimático gerada por papaína e Der p 1.

3.2 SUBSTRATOS

Examinou-se se os substratos usados, Z-FR-AMC e Boc-QAR-AMC, adsorveram-se em hidróxido de alumínio. Com essa finalidade, os substratos foram misturados com 1,14 mg/mL de hidróxido de alumínio. A fase líquida (sobrenadante) foi separada da fase sólida por centrifugação. A concentração de substrato no sobrenadante foi comparada com a concentração de substrato em uma preparação sem hidróxido de alumínio (controle) em função do tempo, de duas maneiras:

a) Comparando a absorção sob 325 nm (para ambos os substratos, a absorção máxima ocorreu em 325 nm (figura 8)) em ambas as preparações. Determinações foram realizadas em triplicata, utilizando uma concentração de substrato a 40 μM (figuras 9a e 10a).

b) Medindo a atividade enzimática de papaína quando misturada com o controle na ausência de hidróxido de alumínio, do substrato na presença de hidróxido de alumínio (mistura) e no sobrenadante da mistura. Determinações foram realizadas em triplicata, utilizando uma concentra-

ção de substrato a 30 μ M (figuras 9b e 10b).

Uma ANOVA de duas vias dos resultados de absorbância de Z-FR-AMC indicou que o fator de absorbância (valor de $p = 0,88$) não apresentou efeito significativo (figura 9a). O fator de tempo (valor de $p < 0,0001$), por outro lado, apresentou um efeito significativo sobre o resultado. Inspeção do diagrama de barras, entretanto, mostra maior variação no ponto de tempo de 60 min. Quando analisado somente para pontos de tempo de 15 min e 30 min, o fator de tempo, na verdade, torna-se não-significativo (valor de $p = 0,95$). Essa é uma análise razoável e confirma a validade da configuração do ensaio.

Para o ensaio de atividade, foi realizada a análise estatística do fator de hidróxido de alumínio como uma ANOVA de uma via (figura 9b). A razão para excluir o fator de tempo é que preparações de enzima independentes foram usadas para cada ponto de tempo, confundindo, desse modo, tempo e concentração enzimática. A ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre as médias de todos os resultados de atividade ($p = 0,11$). Isso sustenta adicionalmente que as medições de absorbância indicam não adsorção de Z-FR-AMC em hidróxido de alumínio.

Uma ANOVA de duas vias dos resultados de absorbância de Boc-QAR-AMC indicou que nem o fator de absorbância (valor de $p = 0,72$), nem o fator de tempo (valor de $p = 0,24$) ou o fator de interação apresentaram qualquer efeito significativo sobre o resultado (figura 10a).

Para o ensaio de atividade, a investigação estatística foi realizada da mesma maneira que para Z-FR-AMC por uma ANOVA de uma via, com relação à resposta de atividade apenas (figura 10b). A ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre as médias de todos os resultados de atividade ($p = 0,98$). Isso sustenta que as medições de absorbância indicam não adsorção de Boc-QAR-AMC em hidróxido de alumínio.

30 3.3 E-64

Para verificar se o inibidor de protease de cisteína E-64 adsorveu em hidróxido de alumínio, ensaios enzimáticos foram realizados sobre

um controle de E-64 a 12,5 nM sem hidróxido de alumínio, uma mistura de E-64 e hidróxido de alumínio, e um sobrenadante da mistura, após ter sido separado da fase sólida por centrifugação. Essa concentração de E-64 não inibiu completamente a atividade enzimática. É possível, portanto, avaliar a

5 ligação de E-64 com hidróxido de alumínio por atividade enzimática.

Foi realizada uma ANOVA de uma via que não indicou nenhuma diferença significativa entre as médias (valor de $p = 0,79$), portanto nenhuma adsorção ocorreu (figura 11). Pontos de tempo confundem-se com concentração de enzima devido à preparação de enzima separada.

10 3.4 SUMÁRIO DA INFLUÊNCIA DE HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO SOBRE COMPONENTES DO ENSAIO ENZIMÁTICO

Em conclusão aos experimentos relativos à influência de hidróxido de alumínio sobre componentes do ensaio enzimático, verificou-se que hidróxido de alumínio não influencia quaisquer dos componentes do ensaio,

15 AMC, Z-FR-AMC, Boc-QAR-AMC e E-64, seja em medições de pontos finais, seja em medições de atividade enzimática.

EXEMPLO 4

4.1 ADSORÇÃO DE PAPAÍNA EM HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO

Após validação do ensaio enzimático com e sem a presença de

20 hidróxido de alumínio, um projeto experimental foi produzido para investigar os parâmetros cinéticos de papaína e uma possível influência de hidróxido de alumínio sobre eles. Uma vez que se esperava que papaína adsorvesse somente em pequeno grau em de hidróxido de alumínio (pl em torno do PZC de hidróxido de alumínio), ela foi escolhida como controle negativo. Isso re-

25 fletirá o possível efeito da presença de hidróxido de alumínio no meio de ensaio sobre os resultados cinéticos, quando a maior proporção das moléculas de enzima não está ligada ao adjuvante. Uma visão geral da preparação de amostra é dada na figura 12.

Uma solução de 3 mL com 100 µg/mL de papaína e 1,14 mg/mL

30 de hidróxido de alumínio foi preparada. Essa solução foi colocada por 1 h a 4°C para permitir adsorção de papaína em hidróxido de alumínio. Após adsorção, 500 µL foram tomados para análise adicional e o resto da mistura foi

centrifugado por 10 min a 4.000 rpm. O restante das amostras analisadas seguiu o esquema de fluxo na figura 12. Adicionalmente, foi preparado um controle (Con) contendo papaína em tampão Bis-Tris na ausência de hidróxido de alumínio. O controle foi o mesmo da mistura de hidróxido de alumínio incubada por 1 h a 4°C e analisado depois.

Amostras foram analisadas com os seguintes métodos:

- Determinação de concentração de proteína (enzima) ($A_{280\text{nm}}$ e titulação de sítios ativos)

- Medições de atividade enzimática

10 4.2 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE PAPAÍNA

A concentração de proteína das diferentes amostras foi avaliada de duas maneiras:

4.2.1 A_{280}

Essas medições foram convertidas em concentração de proteína pela lei de Lambert-Beer usando um coeficiente de absorção molar para papaína de 2,46 mg/mL. Uma vez que não é tecnicamente possível determinar concentração de proteína a partir de A_{280} na presença de hidróxido de alumínio, a concentração de papaína em Mix1 e Mix2 foi estimada indiretamente. A concentração de proteína em Mix1 foi a mesma que em Con e a concentração de proteína em Mix2 foi a diferença entre Con e Sup1. Uma ANOVA dos resultados não mostrou diferença entre Con e Sup1 (valor de $p = 0,615$), indicando que papaína não adsorve significativamente em hidróxido de alumínio. As concentrações estimadas de papaína no controle e a quantidade adsorvida em hidróxido de alumínio são mostradas na Tabela 7.

25 As medições de proteína não respondem por todos os 100 µg/mL que foram a concentração estimada no Con. A perda de proteína poderia ser devido à estimativa errônea da concentração original de papaína na solução de estoque. Essa concentração foi medida pelo fabricante e, assim, não no mesmo instrumento do resto das amostras.

Prepara- ção	K_M (μM)	$V_{m\acute{a}x.}$ (ng/mL.s)	Concen- tração de proteína ^a	$k_{cat.}^a$ (1/s)	Concen- tração de prote- ína ^b	$k_{cat.}^b$ (1/s)
Controle	22	373,9	70,8 ng/mL	5,13	33,7 ng/mL	11,41
Adsorvido	21	44,1	3,0 ng/mL*	14,58	3,4 ng/mL	12,18

Tabela 7. Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x.}$, K_M e $k_{cat.}$ ($V_{m\acute{a}x.}/$ Concentração de proteína), bem como concentração de proteína para papaína. ^a Concentração de proteína determinada por A_{280} . ^b Concentração de proteína determinada por titulação de sítios ativos. * Concentrações de proteína obtidas são determinadas indiretamente (vide texto). Controle representa uma preparação de papaína na ausência de hidróxido de alumínio. Adsorvido refere-se a uma preparação de papaína adsorvida em hidróxido de alumínio (mistura 2).

4.2.2 TITULAÇÃO DE SÍTIOS ATIVOS

A titulação de sítios ativos foi usada para estimar a quantidade de enzima ativa nas diferentes amostras. Essa quantidade está em contraste com a concentração de proteína estimada a partir de A_{280} , a qual representa o teor de proteína total da amostra. As condições de ensaio usadas são indicadas na Tabela 8 abaixo.

Esses resultados mostram que aproximadamente 7% (Mix3) da papaína ativa foram adsorvidos em hidróxido de alumínio, enquanto 91% (Sup1 + Sup2) estavam em solução. Isso está em acordo com os resultados obtidos na avaliação de atividade de enzima nas amostras; vide seção 4.3.1.

4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Dois tipos de ensaios enzimáticos foram realizados: (i) medições de atividade usando uma concentração fixa de substrato para avaliar atividade enzimática e (ii) cinética de Michaelis-Menten para estimar os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x.}$ e K_M .

Todos os ensaios de atividade foram conduzidos com tampão Bis-Tris, pH 6,5, DTT a 5 mM, EDTA 1 a mM e Z-FR-AMC como substrato.

Uma visão geral dos diferentes ensaios enzimáticos realizados é dada na Tabela 8.

Parâmetro de Análise	Atividade	Cinética de Michaelis-Menten	Titulação de sítios ativos
Diluição (Con, Mix1, Sup1)	2.048, 1.024, 512, 256	1.024	1024
Diluição (Mix2, Sup2, Mix3)	2.048, 1.024, 512, 256	128	128
Concentração de substrato	30 μ M	12,5 μ M, 25 μ M, 37,5 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M,	30 μ M
Concentração de inibidor			0,0 nM, 0,25 nM, 0,50 nM, 1,0 nM, 1,5 nM, 2,0 nM, 3,0 nM, 4,0 nM
Tempo de incubação com DTT	10 min	10 min	60 min*

Tabela 8. Especificações de ensaios de enzima para experimento de adsorção de papaína. Medições de atividade são combinações simples de enzima e substrato a fim de avaliar o nível de atividade em amostras. Medições da cinética de Michaelis-Menten de atividade enzimática com diferentes concentrações de substrato são usadas para estimar $V_{\text{máx}}$ e K_M . Todas as medições foram efetuadas em triplicata.

* Incubação tanto com DTT quanto com E-64.

10 4.3.1 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As medições de atividade foram usadas para analisar quantitativamente a quantidade de papaína adsorvida em hidróxido de alumínio e a quantidade distribuída livremente na solução. 96% de atividade em Mix1 foram verificados em solução (Sup1 + Sup2), enquanto 8% da atividade de

papaína foram adsorvidos em hidróxido de alumínio (Mix3). A atividade do controle é 17% menor que a atividade de Mix1. Isso poderia ser devido a uma perda de atividade da proteína no controle durante o intervalo de tempo do experimento. Essa perda foi evitada pela presença de hidróxido de alumínio.

A fim de avaliar adicionalmente essa observação, novos experimentos foram conduzidos nos quais a atividade de papaína foi acompanhada em função do tempo na ausência de hidróxido de alumínio. Papaína foi misturada com tampão Bis-Tris a 50 mM até uma concentração final de 10 µg/mL em um volume total de 500 µL. A mistura foi incubada a 4°C e amostras foram tomadas a 0,30 e 60 min. As amostras foram diluídas e incubadas por 10 min em tampão contendo DTT e subsequentemente atividade foi medida após adição de substrato. Os resultados analisados com ANOVA de uma via mostraram que houve uma significativa diferença entre os 3 pontos de tempo (valor de $p = 0,015$) e por meio de teste de comparação de Newman-Keuls, verificou-se que 60 min diferem dos outros dois pontos de tempo e foram menores que 7%. Esses resultados sugerem que durante os 60 min de incubação entre papaína e hidróxido de alumínio papaína na amostra de controle perdeu 7% de sua atividade. Perda adicional ocorre até o início do ensaio enzimático.

4.3.2 PARÂMETROS CINÉTICOS DE MICHAELIS-MENTEN

Os parâmetros de Michaelis-Menten K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram avaliados nas diferentes amostras.

Os valores estimados de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ das diferentes amostras são mostrados na Tabela 7 acima. Teste de Bartlett não indicou diferença significativa entre variâncias de K_M (valor de $p = 0,758$) nas amostras e uma ANOVA de uma via foi usada para comparar médias. O teste com ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre estimativas de K_M (valor de $p = 0,999$), indicando que a afinidade com o substrato não se altera quando papaína está na presença e ausência de hidróxido de alumínio.

$V_{m\acute{a}x}$ em solução (Sup1 + Sup2) é 97% daquele em Mix1, enquanto $V_{m\acute{a}x}$ em Mix3 corresponde a um de 7%.

$V_{m\acute{a}x}$ é específico para uma enzima definida e é linearmente dependente da concentração de enzima no ensaio. A normalização de $V_{m\acute{a}x}$ pela concentração de enzima fornece o parâmetro k_{cat} , que é apenas dependente das características da atividade da enzima. A Tabela 7 acima mostra os valores estimados de k_{cat} para as diferentes amostras, calculado a partir dos valores de concentração de enzima obtidos de titulação de sítios ativos e A_{280} .

Os valores de k_{cat} obtidos de determinação de concentração de proteína sob A_{280} foram aproximadamente metade daqueles obtidos com titulação de sítios ativos no controle, indicando que metade da proteína nas amostras era inativa. Os valores de k_{cat} de Con, Mix1, Sup1, Mix2 e Mix3 são comparáveis quando a concentração de enzima foi calculada por titulação de sítios ativos, sugerindo que a presença de hidróxido de alumínio não afeta as propriedades cinéticas da papaína. Os valores de k_{cat} de Con, Mix1, Sup1 e Sup2 são também comparáveis quando a concentração de enzima é calculada a partir de A_{280} . No entanto, a determinação indireta de concentração de proteína em Mix2 produz o valor de k_{cat} mais impreciso.

O fato de que os parâmetros cinéticos avaliados na presença e ausência de hidróxido de alumínio não são significativamente diferentes indica que a presença de hidróxido de alumínio não afetou a reação enzimática. Em conclusão, esses resultados mostram que é possível medir as propriedades enzimáticas de uma enzima na presença de hidróxido de alumínio, quando a maior parte da enzima (93%) não se ligou ao adjuvante.

EXEMPLO 5

5.1 ADSORÇÃO DE DER P 1 EM HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO

De acordo com a teoria de adsorção de proteínas em hidróxido de alumínio, esperava-se que Der p 1 fosse adsorvido (pI abaixo do PZC do hidróxido de alumínio). O efeito dessa adsorção na atividade e estrutura de Der p 1 foi examinado.

Uma visão geral da preparação de amostra é fornecida na figura 13. Uma solução de 3 mL com 100 $\mu\text{g/mL}$ de Der p 1 e 1,14 mg/mL de hidróxido de alumínio foi preparada. Essa solução foi colocada por 1 h a 4°C

para permitir adsorção de Der p 1 em hidróxido de alumínio. Após adsorção, 500 µL foram tomados para análise adicional e o resto da mistura foi centrifugado por 10 min a 4.000 rpm. Uma etapa de eluição foi realizada por 1 h a 4°C, na qual o pélete de Mix2 foi ressuspensão em tampão de fosfato. Adicionalmente, dois controles (Con1 e Con2) contendo Der p 1 em tampão de Tris na ausência de hidróxido de alumínio foram preparados. Con1 foi analisado no começo do experimento e Con2 no fim das 2 horas de experimento.

As amostras foram analisadas com os seguintes métodos:

- Determinação de concentração de proteína ($A_{280\text{ nm}}$ e RIE)
- Medições de atividade enzimática
- Ligação de IgE

5.2 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE DER P 1

A determinação de concentração de Der p 1 nas diferentes amostras foi avaliada por A_{280} e RIE.

5.2.1 A_{280}

A fim de quantificar teor protéico, absorbância a 280 nm foi medida em amostras sem hidróxido de alumínio (Con1, Con2, Sup e Elu). As medições de absorbância foram convertidas em concentração de proteína pela lei de Lambert-Beer usando um coeficiente de absorção molar para Der p 1 de 1,72 mg/mL conforme mostrado na Tabela 8a.

Preparação	K_M (μM)	$V_{\text{máx.}}$ (ng/mL.s)	Concentração de proteína ^a	$k_{\text{cat.}}^a$ (1/s)	Concentração de proteína ^c	$k_{\text{cat.}}^c$ (1/s)
Controle	47	0,25	10,4	0,024	13,9	0,018
Adsorvido	56	0,15	7,1*	0,022	7,8	0,019
Eluído	51	0,11	4,0	0,025	7,6	0,014

Tabela 8a. Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{\text{máx.}}$, K_m e $k_{\text{cat.}}$ ($V_{\text{máx.}}$ /Concentração de proteína), bem como concentração de proteína para Der p 1. ^a Concentração de proteína determinada por A_{280} . ^c Concentração de proteína determinada por RIE. * Concentrações de proteína obtidas são determinadas indiretamente (vide texto). Controle representa uma preparação de Der p 1 na ausência de hidróxido de alumínio. Adsorvido refere-se a uma preparação de Der p 1 adsorvida em hidróxido de alumínio (mistu-

ra 2).

Concentração de proteína em Mix1 e Mix2 foi estimada indiretamente. A concentração de proteína em Mix1 foi considerada a mesma que em Con1 e a concentração de proteína em Mix2 foi a diferença entre Con1 e Sup. Um teste t não mostrou diferença significativa entre as concentrações de proteína em Con1 e Con2 (valor de $p = 0,092$). 32% do teor de proteína em Con1 foram verificados em Sup, indicando um grau de adsorção de aproximadamente de 70%. Da proteína adsorvida, 56% foram eluídos de hidróxido de alumínio usando tampão de fosfato.

10 5.2.2 RIE

Outro método aplicado para quantificar teor de proteína foi RIE. As amostras Con1, Con2, Sup e Elu foram avaliadas juntamente com três padrões de Der p 1 (125 ng, 250 ng e 500 ng). As concentrações de Der p 1 estimadas no controle, a quantidade adsorvida em hidróxido de alumínio, bem como a quantidade eluída, são mostradas na Tabela 8a.

Os valores estimados foram gerados a partir da curva-padrão de regressão linear dos três padrões (concentração como função de área de precipitado). 44% do teor de proteína em Con1 foram verificados em Sup, indicando indiretamente um grau de adsorção de aproximadamente 56%. Da proteína adsorvida, 98% foram eluídos de hidróxido de alumínio usando tampão de fosfato. A concentração de Con1 e Con2 foi externa à área de previsão da curva-padrão; e é, portanto, provavelmente aquela em que a concentração de Der p 1 é subestimada. Isso pode explicar o alto grau de eluição de Der p 1 a partir de hidróxido de alumínio, uma vez que a concentração de Der p 1 adsorvido é estimada como a diferença entre Con1 e Sup.

25 5.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Diferentes tipos de ensaios enzimáticos foram realizados: (i) medições de atividade usando uma concentração fixa de substrato para avaliar atividade enzimática e (ii) cinética de Michaelis-Menten para estimar os parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_M .

Todos os ensaios de atividade foram conduzidos com tampão Tris, pH 7,0, DTT 5 mM, EDTA 1 mM e Boc-QAR-AMC como substrato. Uma

visão geral dos diferentes ensaios enzimáticos realizados é dada na Tabela 9.

Parâmetro de Análise	Medição de atividade	Cinética de Michaelis-Menten
Diluição (Con1, Mix1, Sup, Mix2, Elu, Con2)	4 e 8	8
Concentração de substrato	100 μM	25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM ,
Concentração de inibidor		
Tempo de incubação	20 min	20 min

Tabela 9. Especificações de ensaios de enzima para experimento de adsorção de Der p 1. Medições de atividade são combinações simples de enzima e substrato a fim de avaliar o nível de atividade em amostras. Medições da cinética de Michaelis-Menten de atividade enzimática com diferentes concentrações de substrato são usadas para estimar $V_{\text{máx}}$ e K_M . Todas as medições foram efetuadas em triplicata.

* Incubação tanto com DTT quanto com E-64.

5.3.1 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As medições de atividade de Der p 1 na ausência e presença de hidróxido de alumínio foram usadas para quantificar a quantidade de Der p 1 adsorvida em hidróxido de alumínio e a quantidade distribuída livremente na solução. Os resultados das medições de atividade são resumidas na figura 14.

A atividade de Der p 1 não-adsorvido em Sup a 33% da atividade de em Mix1. 66% da atividade de Der p 1 foram adsorvidos em hidróxido de alumínio e 67% dessa atividade foram desorvidos após eluição a partir de Mix2 com tampão de fosfato.

A fim de monitorar a estabilidade de Der p 1 durante o período de experimento, a atividade de Con1 foi medida no início do experimento e a de Con2 no fim. Eficácia de uma ANOVA de uma via sobre Con1, Con2 e Mix1 não mostrou diferença significativa entre as médias (valor de $p = 0,76$). Isso indica que nem tempo nem presença de hidróxido de alumínio influencia a atividade de Der p 1 sob essas condições.

5.3.2 PARÂMETROS CINÉTICOS DE MICHAELIS-MENTEN

Os parâmetros de Michaelis-Menten K_M e $V_{m\acute{a}x.}$ foram avaliados nas diferentes amostras.

A figura 15 mostra uma curva típica de Michaelis-Menten para Der p 1 na presença de hidróxido de alumínio. Os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x.}$ são mostrados na Tabela 8a. Teste de Bartlett não indicou diferença significativa entre variâncias de K_M (valor de $p = 0,11$) e uma ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre as médias das amostras (valor de $p = 0,62$). Isso indica que a afinidade de Der p 1 com Boc-QAR-AMC não se altera na presença de hidróxido de alumínio.

$V_{m\acute{a}x.}$ de Con2 é 14% menor que $V_{m\acute{a}x.}$ em Con1 (teste t, valor de $p = 0,0024$), indicando que Der p 1 havia perdido atividade durante o período de tempo do experimento. Teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls não mostrou diferença significativa entre $V_{m\acute{a}x.}$ de Con1 e Mix1 ($p > 0,05$), sugerindo que hidróxido de alumínio não teve influência na atividade de Der p 1. Adicionalmente, parece que hidróxido de alumínio impediu a perda de atividade no tempo observado de Con1 a Con2. $V_{m\acute{a}x.}$ em Sup e Mix2 é de 30% e 62% de $V_{m\acute{a}x.}$ em Mix1, respectivamente. 68% da atividade em Mix2 foram verificados em Elu.

Os valores de $k_{cat.}$ de Der p 1 foram estimados a partir dos valores obtidos de $V_{m\acute{a}x.}$ e as concentrações de proteína obtidas dos diferentes métodos (A_{280} e RIE) conforme mostrado na Tabela 8a; valores de $k_{cat.}$ das diferentes amostras são comparáveis quando a concentração de proteína foi estimada por A_{280} e RIE.

Em conclusão, os valores de K_M e $k_{cat.}$ obtidos para Der p 1 não foram significativamente diferentes na ausência de hidróxido de alumínio e quando a maior parte das moléculas de Der p 1 (60-70%) é adsorvida no hidróxido de alumínio. Esses dados sustentam que é possível medir a atividade enzimática de uma enzima adsorvida em hidróxido de alumínio fazendo uma avaliação do impacto que a adsorção de uma enzima em hidróxido de alumínio tem sobre a atividade/estrutura da enzima possível.

5.4 LIGAÇÃO DE IGE

Avaliou-se a influência de hidróxido de alumínio na capacidade

de Der p 1 na ausência de hidróxido de alumínio (Con1) e de Der p 1 ligado e eluído a partir de hidróxido de alumínio (Elu) ligar-se a IgE de soros de pacientes alérgicos a HDM.

- 5 A inibição do sinal de Der p 1 padrão, marcado com biotina, mediante uso de concentrações crescentes de Der p 1 em Con1 e Elu sob avaliação seguiu uma curva descendente sigmoidal (figura 16).

- 10 Comparando a curva de Con1 com Elu, é evidente que os níveis inferiores são idênticos, portanto inibição completa é possível em ambos os casos. Isso indica que todos os epitopos de IgE em Con1 estavam ainda presentes em Elu. Um teste t de uma amostra comparando as inclinações de Hill de Con1 e Elu mostrou que as médias não foram significativamente diferentes ($p = 0,83$), o que indica que a afinidade de IgE por epitopos sobre Der p 1 foi conservada após ligação com hidróxido de alumínio.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de medição da atividade imunológica de uma preparação de vacina na forma de uma mistura de uma ou mais enzimas alergênicas e um adjuvante de sal metálico que contém oxigênio, em que a mistura
5 compreende uma fase líquida e uma fase sólida, e em que pelo menos uma parte da(s) enzima(s) alergênica(s) é adsorvida na fase sólida, sendo o referido método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de medir a atividade enzimática da mistura em um ensaio de atividade enzimática e usar a medição obtida como indicação da atividade imunológica da preparação
10 ção de vacina.

2. Método para quantificação da quantidade de enzima alergênica em uma preparação de vacina na forma de uma mistura de uma ou mais enzimas alergênicas e um adjuvante de sal metálico que contém oxigênio, em que a mistura compreende uma fase líquida e uma fase sólida, e em que
15 pelo menos uma parte da(s) enzima(s) alergênica(s) é adsorvida na fase sólida, sendo o referido método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de medir a atividade enzimática da mistura em um ensaio de atividade enzimática e usar a medição obtida para quantificar a quantidade de enzima alergênica.

20 3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que um substrato específico para uma enzima alergênica é usado para medir a atividade enzimática da enzima alergênica.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que um inibidor é usado para inibir uma ou mais das enzimas alergênicas na preparação de vacina.
25

5. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 2 e 4, caracterizado pelo fato de que a(s) enzima(s) alergênica(s) é (são) na forma de um extrato.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma das enzimas alergênicas é
30 uma protease de cisteína.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

5, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma das enzimas alergênicas é uma protease de serina.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a(s) enzima(s) alergênica(s) é (são) uma ou mais selecionadas do grupo que consiste em Der p 1, Der p 3, Der p 6 e Der p 9.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a enzima alergênica é Der p 1.

10 6 e 8-9, caracterizado pelo fato de que o substrato usado é Z-LeuLeuGlu-MCA.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o sal metálico que contém oxigênio é hidróxido de alumínio.

15 12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a preparação de vacina é submetida a uma medição da atividade enzimática de enzima alergênica na fase líquida (medição 2) e/ou a uma medição da atividade enzimática de enzima alergênica na fase sólida (medição 3).

Etapas na purificação de Der p 1 por afinidade

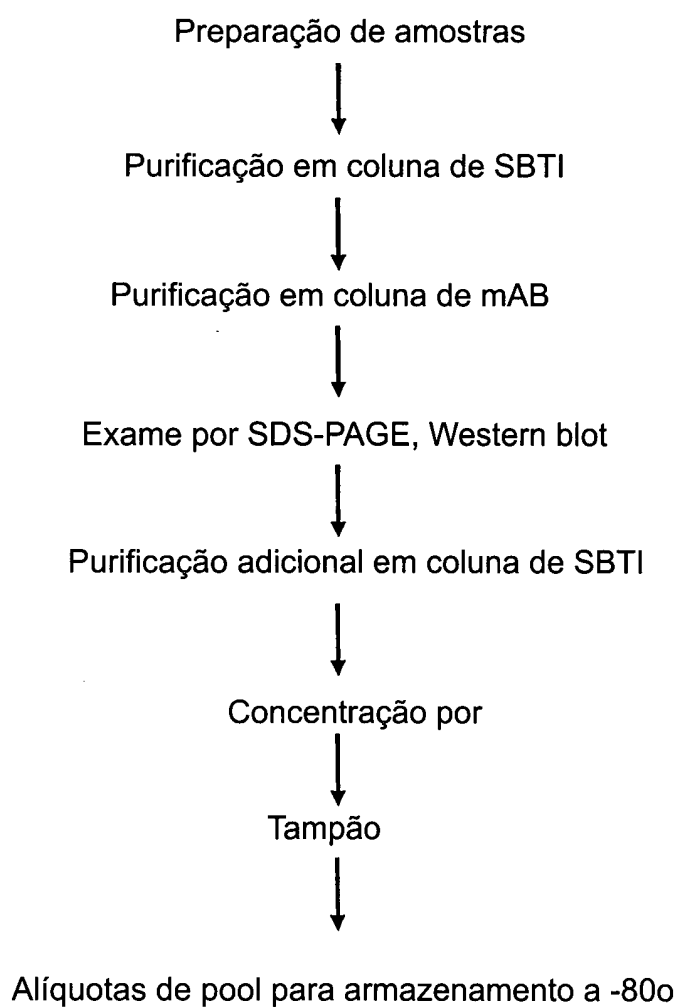


FIG. 1

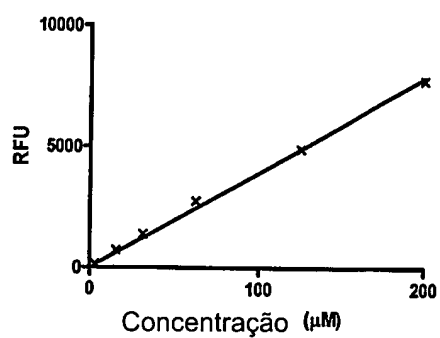


FIG. 2a

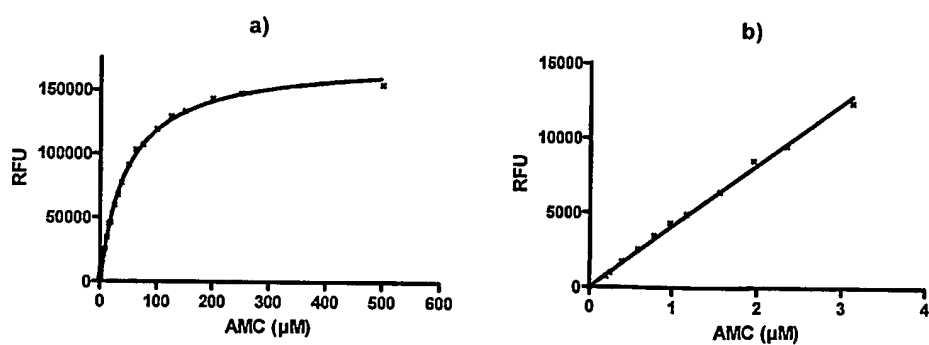


FIG. 2b

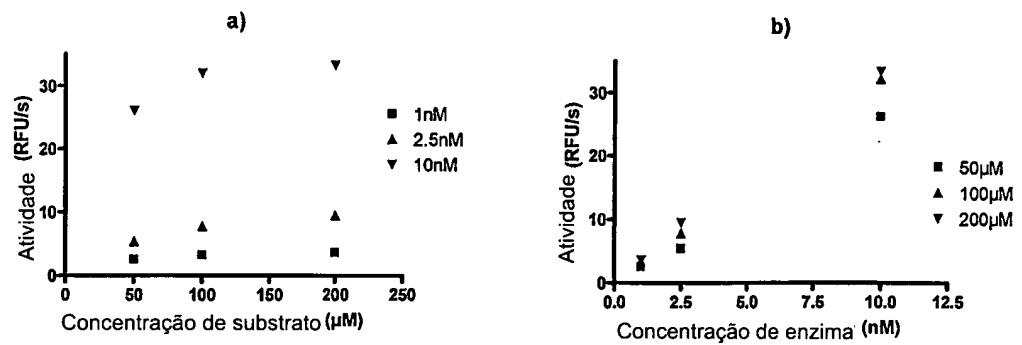


FIG. 3

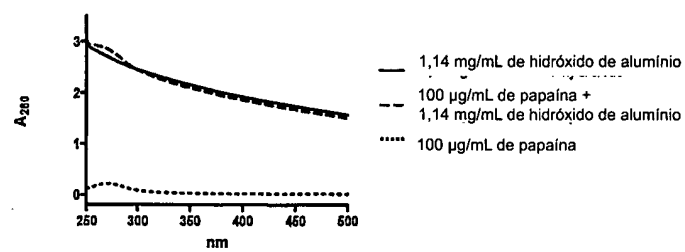


FIG. 4

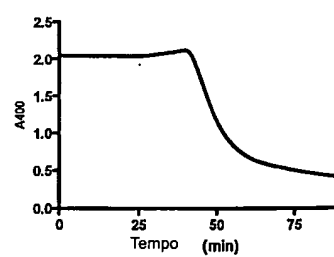


FIG. 5

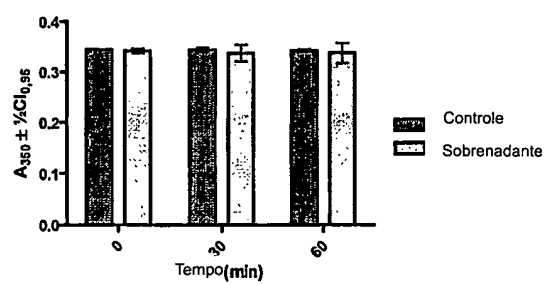


FIG. 6

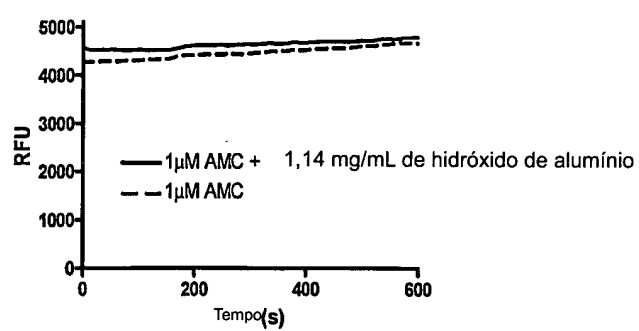


FIG. 7

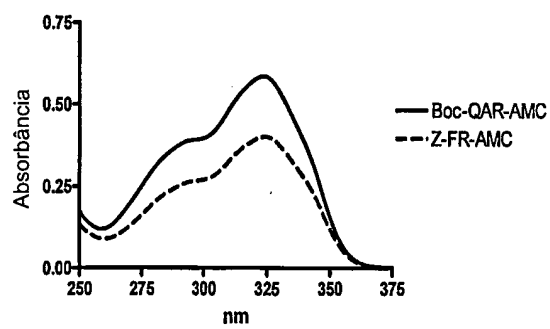


FIG. 8

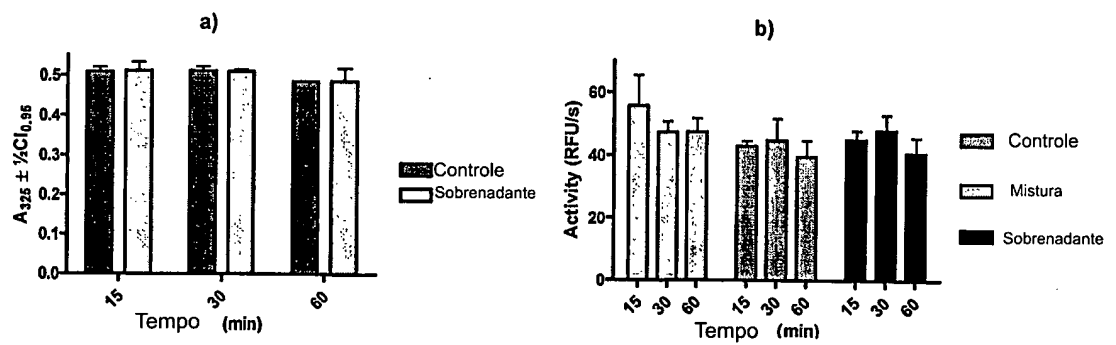


FIG. 9

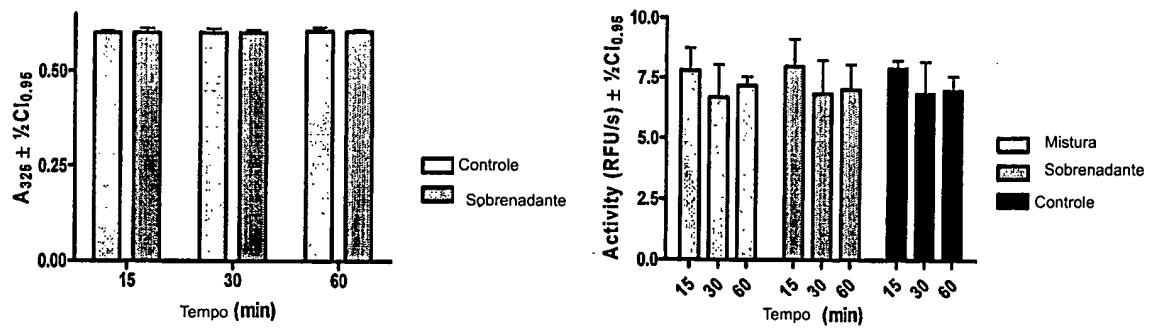


FIG. 10

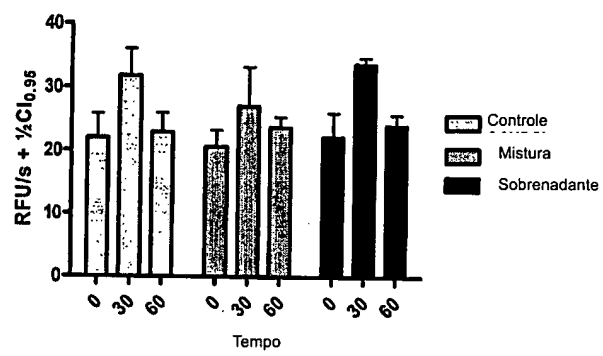


FIG. 11

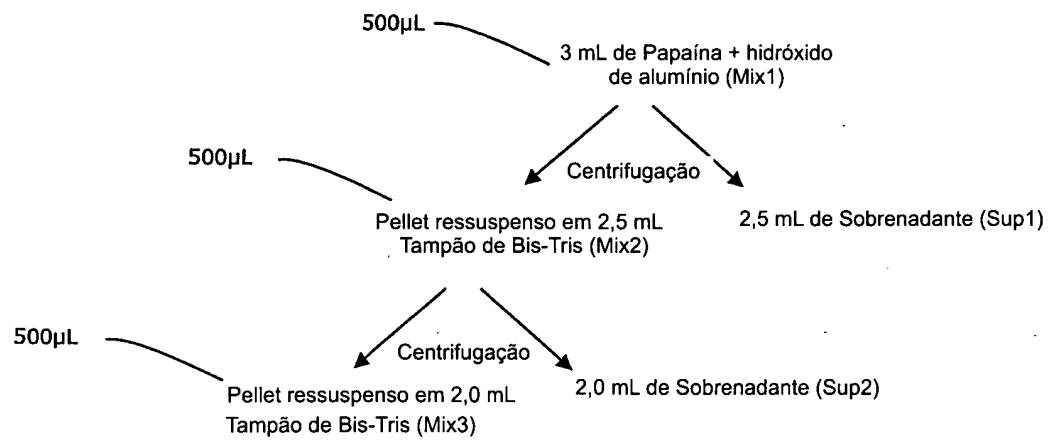


FIG. 12

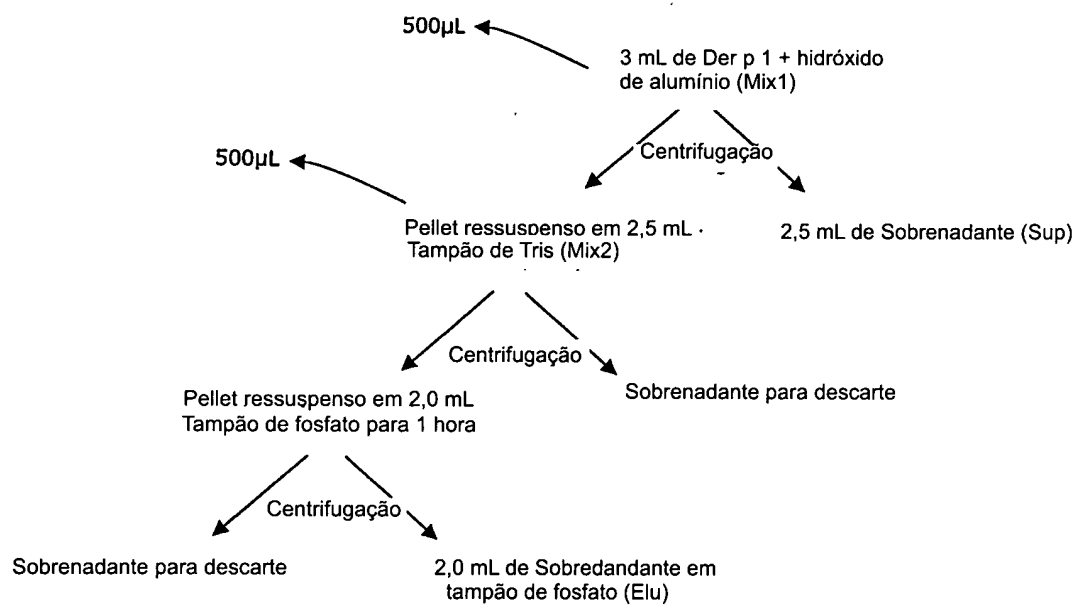


FIG. 13

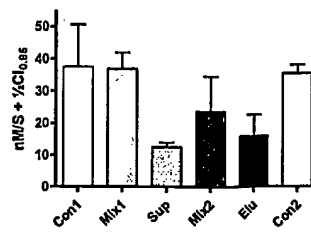


FIG. 14

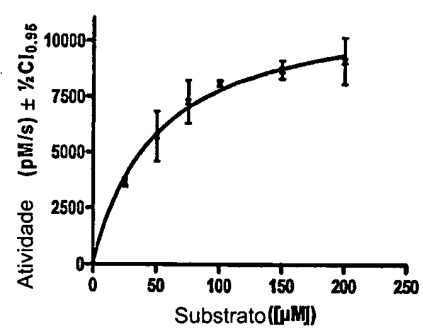


FIG. 15

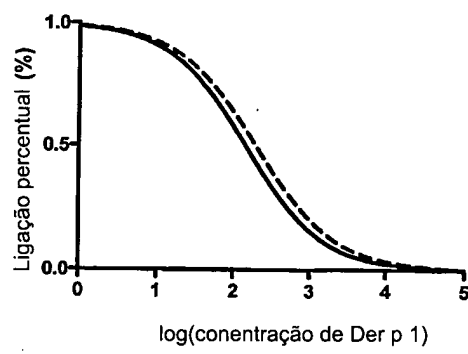


FIG. 16

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODOS DE MEDIÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOLÓGICA E PARA QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA ALERGÊNICA EM UMA PREPARAÇÃO DE VACINA".

- 5 A presente invenção refere-se a um método de medição da atividade imunológica de uma preparação de vacina na forma de uma mistura de uma ou mais enzimas alergênicas e um adjuvante de sal metálico que contém oxigênio, em que a mistura compreende uma fase líquida e uma fase sólida, e em que pelo menos uma parte da(s) enzima(s) alergênica(s) é adsorvida na fase sólida, o método compreendendo as etapas de medir a atividade enzimática da mistura em um ensaio de atividade enzimática e usar a medição obtida como indicação da atividade imunológica da preparação de vacina, ou usar a mediação obtida para quantificar a quantidade de enzima alergênica.
- 10