



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0713436-3 B1**

**(22) Data do Depósito: 28/06/2007**

**(45) Data de Concessão: 12/06/2018**



---

**(54) Título:** MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM EXTRATO PURIFICADO DE ALÉRGENOS NATURAIS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SEUS USOS

**(51) Int.Cl.:** A61K 39/35; A61K 39/36

**(30) Prioridade Unionista:** 06/09/2006 US 60/842,485, 29/06/2006 EP 06 116322.6

**(73) Titular(es):** BIOTECH TOOLS S.A.

**(72) Inventor(es):** SABINE PIROTON; GAEL PLACIER; GILLES KERGOAT; THIERRY LEGON

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM EXTRATO PURIFICADO DE ALÉRGENOS NATURAIS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SEUS USOS"**.

A presente invenção refere-se a um método para a produção de  
5 extratos de alérgenos naturais, peptídeos desses extratos e extratos de alérgeno obteníveis através do novo método.

Alérgenos comuns são polens, ácaros de poeira doméstica, mofo, fármacos, alimentos e pêlo e caspa animal.

As doenças alérgicas mais comuns são rinite, asma e dermatite  
10 atópica. Asma alérgica é um distúrbio inflamatório crônico. Tratamento sintomático de distúrbios alérgicos é realizado através do uso de antihistamínicos, b-antagonistas e corticosteróides.

Além disso, a assim denominada imunoterapia "específica" é baseada em uma hipo-sensibilização. Tipicamente, os pacientes são administrados com injeção subcutânea dos alérgenos ofensivos específicos. O  
15 tratamento é iniciado com pequenas doses de alérgeno e as doses são aumentadas. O tratamento é, tipicamente, mantido durante vários anos. Esse tipo de tratamento sofre de conformidade pura pelo paciente e tem sido questionado em virtude de razões de segurança porque um paciente pode  
20 sofrer de reações anafiláticas graves.

Além dos métodos compreendendo injeções subcutâneas repetidas, também existem métodos de hipo-sensibilização oral.

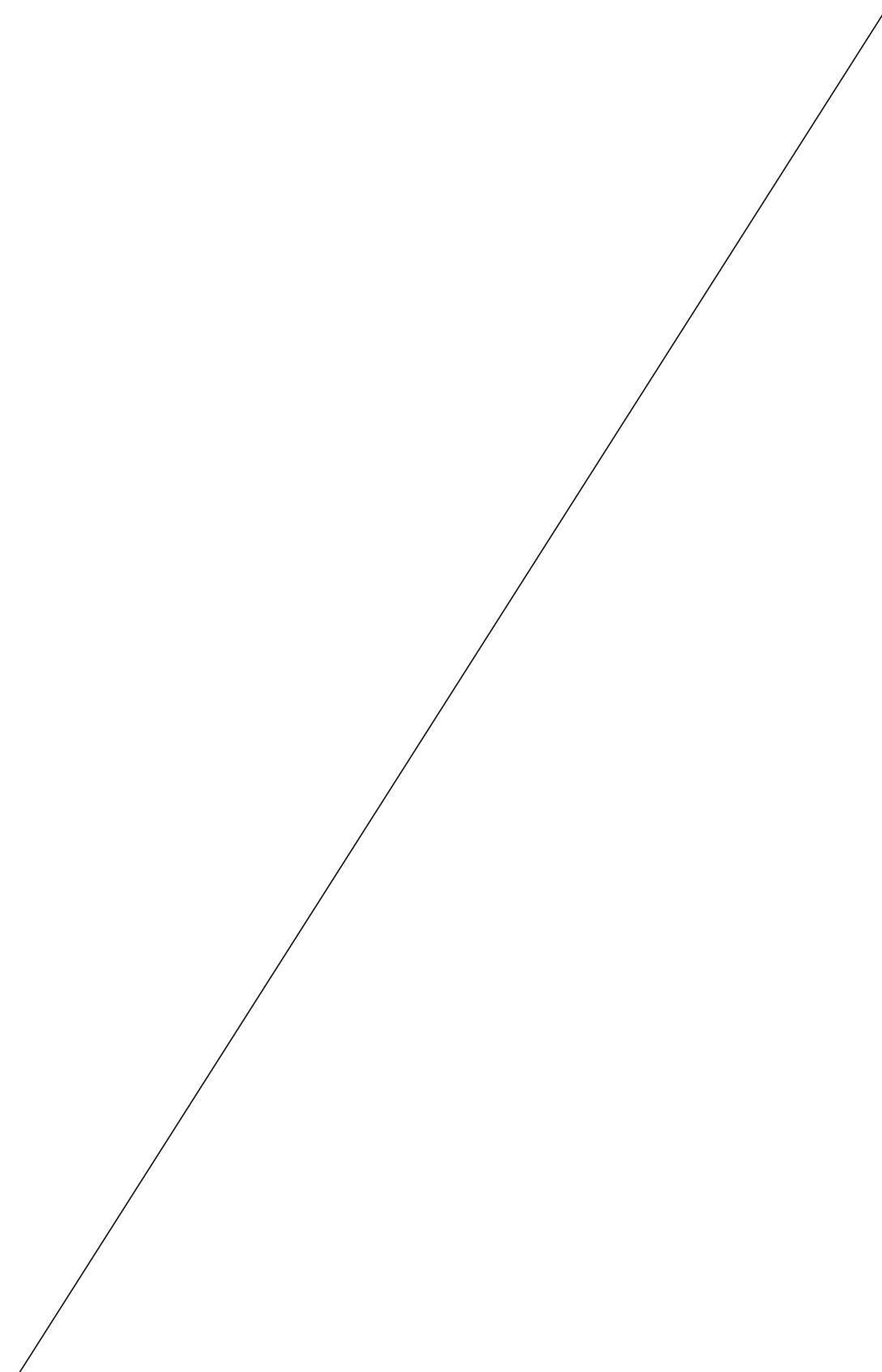
A patente US 4.822.611 descreve um método para tratamento de alergias compreendendo tratamento oral com alérgenos. Ela descreve o  
25 uso de extratos alergênicos "brutos" comercialmente disponíveis mostrando variação lote-a-lote e diferenças em extratos de diferentes fabricantes. O preparo desses extratos não é descrito.

O GB 1 247 614 descreve um método de extração de um alérgeno. O objetivo desse método é ter um extrato alergênico mais completo e  
30 eficaz incluindo todos os componentes extraíveis do alérgeno.

A US 5.770.698 descreve um processo para purificação de extratos de proteínas alergenicamente ativas. O espectro da figura 2 não apre-

1a

senta um pico a 280nm. Isso implica que o extrato contém uma quantidade



---

Segue-se folha 2

significativa de impurezas de não-proteína. O WO 99/22762 descreve um método similar, portanto, o produto compreende grandes quantidades de impurezas de não-proteína também.

5 Por outro lado, há uma tendência para desenvolver preparados altamente específicos baseado em epítomos únicos. Por exemplo, o WO 00/58349 descreve um peptídeo isolado e purificado compreendendo uma leucina posicionada duas ligações peptídicas de distância de um par de tirosina/arginina. Esses peptídeos podem ser usados para preparar uma composição farmacêutica para realizar tratamento ou profilaxia, nesse caso es-  
10 pecialmente dirigida à alergia canina em cães.

Por outro lado, métodos são usados para purificar uma molécula alergênica única especificamente identificada. Por outro lado, as pessoas estão tentando produzir extratos alergênicos tão completos quanto possível.

De acordo com uma primeira alternativa, sempre é possível que  
15 o preparado de alérgeno venha a carecer dos epítomos relevantes para induzir à tolerância em um determinado paciente. A segunda alternativa tem uma deficiência de variabilidade lote-a-lote e da presença de compostos capazes de disparar respostas imunes, tais como moléculas de DNA, carboidratos, lipídios de complexos dos mesmos.

20 É um objetivo da presente invenção superar pelo menos algumas das deficiências da técnica anterior, especialmente proporcionar antígenos de alérgenos naturais com uma capacidade significativamente reduzida de disparar reação de alergenicidade comparado com o extrato bruto de alérgeno, mas capaz de estimular células T também.

25 O problema é resolvido através de fornecimento de métodos para a preparação de um extrato de alérgeno compreendendo a maioria das proteínas contendo partes de um extrato de alérgeno, mas com um teor reduzido, de preferência muito baixo, de componentes de não-proteína, tais como ácidos nucleicos, lipídios, açúcares e semelhantes.

30 Os extratos preparados de acordo com a invenção são superiores aos extratos da técnica anterior, especialmente porque eles mostram uma composição reproduzível de proteínas, mas não são purificados a um

único epítopo.

O método para a produção do extrato de alérgeno da presente invenção compreende as etapas de:

5 a) extração de uma fonte natural de alérgenos compreendendo proteínas alergênicas para formar um extrato,

b) purificação do referido extrato para remover componentes de não-proteína para formar um extrato purificado,

c) desnaturação do referido extrato purificado para formar um extrato desnaturado purificado,

10 o referido extrato desnaturado purificado compreendendo proteínas, em que as proteínas mais abundantes (peso/peso) que formam juntas pelo menos 60% (peso/peso) de todas as proteínas, são pelo menos duas proteínas e todas as proteínas representam pelo menos 60% (peso/peso) do peso seco do extrato desnaturado purificado.

15 Esse método é referido como método I.

Em contraste aos métodos da técnica anterior, o método da presente invenção produz extratos de alérgeno os quais compreendem predominantemente proteínas, sem purificação do extrato a um único peptídeo ou proteína.

20 Em contraste aos produtos da técnica anterior, os produtos da invenção têm as seguintes vantagens:

- outras substâncias imunogênicas que não proteínas são substancialmente removidas

25 - o extrato de alérgeno natural é capaz de estimular células T com a capacidade reduzida de disparar reação alérgica imediata (ativação de basófilos, desgranulação de mastócitos).

30 Como materiais de iniciação, diferentes alérgenos que ocorrem naturalmente podem ser usados. Materiais de iniciação naturais típicos são leite, veneno, ovo, erva daninha, grama, árvore, arbusto, flor, vegetal, grão, fungos, fruto, bagas, noz, semente, fava, feijão, molusco, frutos do mar, carne, temperos, inseto, mofo, ácaro, animal, pombo, verme, coral macio, caspa animal, nematóide, *Hevea brasiliensis* e misturas dos mesmos.

Após extração do material, o extrato é purificado para remover componentes de não-proteína, tais como açúcares, lipídios, ácidos nucleicos e semelhantes. Tipicamente, várias proteínas diferentes estão presentes na fração de proteína do extrato purificado.

5 De acordo com a técnica anterior, uma proteína é purificada e as outras proteínas restantes são "impurezas".

Em contraste à mesma, é o objetivo da presente invenção purificar as proteínas juntas. As quantidades relativas das proteínas no extrato purificado podem ser facilmente medidas usando métodos tal como SDS-  
10 PAGE, seguido por densitometria.

Para 60% do peso total das proteínas, é necessário combinar as duas proteínas mais dominantes pelo menos, isto é, nenhuma proteína única é 60% (peso/peso) ou mais de todas as proteínas. Mais preferivelmente, 60% de todas as proteínas são formadas por pelo menos 3 proteínas domi-  
15 nantes, de preferência por pelo menos 4 proteínas dominantes e, mais preferivelmente, por pelo menos 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 proteínas.

Por exemplo, existem as seguintes proteínas:

	Proteína 1	27%
	Proteína 2	13%
20	Proteína 3	34%
	Proteína 4	19%
	Proteína 5	17%

As proteínas mais abundantes que formam juntas pelo menos 60% (~60% ou mais) são proteínas 3 + 1 (34 + 27 = 61%).

25 Além disso, o teor de proteína total do extrato purificado é de pelo menos 60% em peso, de preferência o teor é de pelo menos 70% em peso ou 80% em peso, mais preferivelmente 90% em peso do extrato purificado.

Extração é, de preferência, realizada com soluções aquosas. Sais adequados são sais tais como, mas não restrito a, carbonato, bicarbonato, fosfato, acetato, TRIS e HEPES.  
30

Também, em contraste com muitos outros métodos de extração,

é preferido que a quantidade de meio de extração seja comparativamente grande, isto é, pelo menos 20 vezes o peso da fonte natural de alérgenos, de preferência 100 vezes o peso ou mais.

5 Purificação do extrato pode ser realizada através de um ou mais dos seguintes:

- etapas de cromatografia de troca de íons (incluindo cromatografia de troca de ânions e cromatografia de troca de cátions),

- etapas de cromatografia por exclusão de tamanho (também denominada filtração em gel),

10 - etapas de precipitação,

- etapas de cromatografia por interação hidrofóbica,

- cromatografias por afinidade e pseudo-afinidade e/ou

- diafiltração.

15 Em uma modalidade preferida, cromatografia de troca de íons é usada em que, no caso de um permutador de cátions, a solução de carregamento tem um pH entre a pKa da função ácida do permutador de cátions e a pKa da proteína tendo a menor pKa das proteínas no extrato. No caso de um permutador de ânions, o pH está entre a pKa da função básica do permutador de ânions e a pKa da proteína tendo a maior pKa das proteínas que

20 constituem o extrato.

Através desse método, todas as proteínas se ligam ao permutador de íons, enquanto as impurezas neutras e as impurezas com a mesma carga que a resina de troca de íons serão removidas.

25 Em uma modalidade preferida, pelo menos uma etapa de purificação é realizada com uma solução compreendendo um ou mais de um tensídeo e/ou um agente de desnaturação. O tensídeo pode ser não-iônico, aniônico, catiônico ou anfotérico. Agentes de desnaturação adequados são, por exemplo, uréia, cloreto de guanidínio, etileno glicol, isopropanol. Uma concentração adequada de uréia é 3 M ou mais, de preferência 4 M ou mais.

30 Uma concentração adequada de guanidínio é, de preferência, 2 M, de preferência 3 M ou mais. Uma concentração adequada de etileno glicol e/ou isopropanol é 5% ou mais, mais preferivelmente 10% ou mais, até 20% em pe-

so.

Em alguns casos, a produção do extrato purificado de acordo com o método I da invenção é suficiente. Extratos desse tipo podem ser usados para produzir tratamento diagnóstico, profilático e terapêutico *ex vivo*, *in vivo* e *in vitro* de doenças alérgicas. Uma outra modalidade da presente invenção é um método para a produção de um hidrolisato de alérgeno, quer a partir de extratos de acordo com o método I ou a partir de qualquer outra fonte. Se o extrato é proveniente de qualquer outra fonte de alérgenos purificados que não o método I, uma etapa preliminar de desnaturação é requerida de forma a melhorar a digestibilidade.

O método (método II) compreende as etapas de:

- a) hidrólise de um alérgeno natural para formar um hidrolisato de alérgeno,
- b) purificação do referido hidrolisato de alérgeno para remover peptídeos com um peso molecular acima de 10.000 Da e abaixo de 1.000 Da de forma a obter um hidrolisato purificado, em que 70%, mais preferivelmente 80% dos peptídeos estão entre 10.000 Da e 1.000 Da.

As vantagens do produto obtido através do mesmo são que os peptídeos são o resultado da digestão de proteínas desnaturadas. Em virtude de uma calibração de tamanho especificada, eles têm uma potência reduzida para induzir à reação alérgica imediata e reação pró-inflamatória também.

Desnaturação, se necessário, é, de preferência, realizada na presença de agentes caotrópicos, agentes de redução ou misturas dos mesmos. Agentes caotrópicos adequados são, por exemplo, uréia e cloreto de guanidínio. Agentes de redução típicos são, por exemplo, ditioneitol,  $\beta$ -mercaptoetanol, tio-glicerol e misturas dos mesmos.

A etapa de hidrólise é, tipicamente, realizada com uma enzima. Enzimas adequadas são, por exemplo, pepsina, tripsina, quimiotripsina. Essa etapa de hidrólise pode ser realizada na presença de um agente caotrópico, de preferência uréia ou cloreto de guanidínio também. Durante hidrólise, a concentração de uréia e cloreto de guanidínio deverá estar abaixo de 4 M,

de preferência abaixo de 3 M.

Na etapa b) do método II, peptídeos com um peso molecular maior do que 10.000 Da ou menor do que 1.000 Da são removidos.

Os peptídeos do hidrolisato purificado, portanto, compreendem  
5 peptídeos com um peso molecular entre 1.000 e 10.000 Da. Métodos adequados para remoção de peptídeos grandes ou pequenos são ultrafiltração e cromatografia por exclusão de tamanho. Novamente, essa cromatografia por exclusão de tamanho pode ser realizada na presença de agentes caotrópicos, por exemplo, uréia, cloreto de guanidínio, etileno glicol, isopropanol e  
10 misturas dos mesmos.

Uma outra modalidade da invenção é um extrato de alérgeno obtenível através do método I da presente invenção. Tipicamente, também nesse extrato, as proteínas dominantes mais importantes em peso, as quais formam juntas pelo menos 60% em peso de todas as proteínas, são pelo  
15 menos 2 proteínas, de preferência pelo menos 3 ou 4 proteínas ou, mais preferivelmente, pelo menos 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 proteínas. A pureza é observada através de uma Proporção de Densidade Óptica  $260_{nm}$ : Densidade Óptica  $280_{nm}$  de < 1, de preferência < 0,9, mais preferivelmente entre 0,75 e 0,9.

20 Uma outra modalidade é um hidrolisato de alérgeno obtenível através do método II. Ele pode ser usado para:

- diagnóstico *in vivo* de doenças alérgicas: teste de picada, injeções subcutâneas, testes conjuntivais, de aspiração e inalação,
- tratamentos profilático e terapêutico de doenças alérgicas: va-  
25 cina para tratamentos de dessensibilização/hipo-sensibilização e modulação de resposta imune com/sem combinação com adjuvante.

O extrato alérgeno da presente invenção pode ser usado para o preparo de uma composição farmacêutica e/ou composição alimentícia para indução de tolerância. Indução de tolerância pode ser usada para curar ou  
30 prevenir reações alérgicas.

Uma outra modalidade da presente invenção é uma composição farmacêutica compreendendo o extrato de alérgeno da presente invenção,

que em uma forma completa ou na forma hidrolisada. Adicionalmente, a composição farmacêutica pode compreender uma ou mais das seguintes substâncias: trifosfatos de nucleosídeo, difosfatos de nucleosídeo, monofosfatos de nucleosídeo, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, nucleosídeos ou análogos dos mesmos, citocinas imunossupressoras, compostos que induzem à expressão de imunoproteassomas, 1,25-dihidróxi vitamina D3 ou análogos da mesma, lipopolissacarídeos, endotoxinas, proteínas de choque térmico, tioredoxina com NADPH ou reductase de NADP-tioredoxina, ditiotreitól, agonistas do receptor adrenérgico, tal como salbutanol, antagonistas do receptor adrenérgico, tal como butoxamina, compostos que regulam a expressão da molécula de adesão ICAM-1, N-acetil-L-cisteína,  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina (L-glutationa reduzida), alfa-2-macroglobulinas, indutores de expressão do gene Foxp3, flavonóides, isoflavonóides, pterocarpanóides, estilbenos, tal como resveratrol, antagonistas do receptor de taquiquinina, inibidores de químase, adjuvante para vacina, tal como CpG ou MPL ou adjuvante tolerogênico, tal como zymosan, beta-1,3-glicana, indutor de células T regulatórias, um agente muco-adesivo para fixação da proteína ao revestimento mucosal intestinal, tal como uma lecitina de planta, zinco, sais de zinco, polissacarídeos, vitaminas e lisatos bacterianos.

20 Baseado na fonte de alérgenos naturais, a composição pode compreender alérgenos selecionados dentre alérgenos de pólen, alérgenos de leite, alérgenos de veneno, alérgenos de ovo, alérgenos de erva daninha, alérgenos de grama, alérgenos de árvore, alérgenos de arbusto, alérgenos de flor, alérgenos de vegetal, alérgenos de grão, alérgenos de fungos, alérgenos de fruta, alérgenos de baga, alérgenos de noz, alérgenos de semente, 25 alérgenos de fava, alérgenos de peixe, alérgenos de molusco, alérgenos de frutos do mar, alérgenos de carne, alérgenos de temperos, alérgenos de inseto, alérgenos de ácaro, alérgenos de mofo, alérgenos animais, alérgenos de pombo, alérgenos de verme, alérgenos de coral macio, alérgenos de caspa animal, alérgenos de nematóide, alérgenos de *Hevea brasiliensis*.

30 Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica é preparada para administração oral, para distribuição sublingual de fármaco,

para distribuição entérica de fármaco.

Figura 1: Imuno-reatividade através de Western blot de IgG: Fileira 1: marcadores de peso molecular, fileira 2: extrato de proteína bruto, fileira 3: extrato de alérgeno desnaturado purificado. Membrana bloqueada através de BSA a 5% e leite a 3%. Soro do paciente diluído para 1/250. A ligação à IgG foi detectada através de HRP-IgG anti-humana de cabra diluída para 1/2.500 e revelada através de substrato TMB. Alérgeno 1: 61-54 kDa, Alérgeno 2: ± 36-31 kDa.

Figura 2: Imuno-reatividade através de Western blot de IgE: Fileira 1: marcadores de peso molecular, fileira 2: extrato de proteína bruto, fileira 3: extrato de alérgeno desnaturado purificado. Membrana bloqueada através de BSA a 5% e leite a 3%. Soro do paciente diluído para 1/5. A ligação à IgE foi detectada através de HRP-IgG anti-humana de cabra diluída para 1/10.000 e revelada através de substrato TMB. Alérgeno 1: 61-54 kDa, Alérgeno 2: ± 36-31 kDa.

Figura 3: Pico de exclusão do perfil de eluição por SEC G25: A proporção volume da coluna / volume da amostra era de 12. A resina foi equilibrada com Tris.HCl a 25 mM, uréia a 1,5 M, pH de 8,0 em uma taxa de fluxo de 9 ml/min. A eluição foi acompanhada através da absorbância a 280 nm.

Figura 4: Perfil de proteína através de SDS-PAGE: Gel de Bis-Tris a 4-12%. Fileira 1: marcadores de peso molecular, fileira 2: extrato de alérgeno desnaturado purificado. Coloração realizada com azul Coomassie brilhante R-250.

Figura 5: Perfis de proteína e peptídeo através de SDS-PAGE: Gel de Bis-Tris a 4-12%. Fileira 1: marcadores de peso molecular, fileira 2: extrato de alérgeno desnaturado purificado (13 µg), fileira 3: hidrolisado (13 µg).. Coloração realizada com azul Coomassie brilhante R-250.

Figura 6: Perfil de eluição por G50 SEC: A coluna foi equilibrada com uréia a 2 M, NaCl a 100 mM, pH de 3,0. Taxa de fluxo de 15 ml/min. A proporção volume da coluna / volume da amostra foi de 10. A eluição foi acompanhada através da absorbância a 280 nm.

Figura 7: Curva de calibração para análise por HPLC: 10 µl dos seguintes padrões (1 mg/ml) foram injetados sobre a coluna BioSep-SEC S2000: 1. Albumina de soro bovino (66 kDa), 2. β-lactoglobulina (18,5 kDa), 3. Citocroma C (12 kDa), 4. Glucagon (3,4 kDa), Peptídeo sintético de 5,1 kDa.

Figura 8: Perfil de HPLC por exclusão de tamanho: Coluna Bio-Sep-SEC S2000 (PHENOMENEX). Tampão de eluição: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 50 mM - SDS a 0,5% (peso/v), pH de 6,8. Taxa de fluxo de 1 ml/min. Detecção a 214 nm. 10 µl das amostras foram injetados. A área sob a curva, entre os limites de 10 kDa e 1 kDa, foi usada para calcular o percentual dos peptídeos de interesse.

Figura 9: Propriedades de alergenicidade dos produtos derivados de pólen: Amostras de sangue de voluntários alérgicos ao pólen foram incubadas com concentrações crescentes (0, 1, 10, 100 e 1000 ng/ml) de extrato de pólen bruto, proteínas purificadas de pólen e peptídeos purificados de pólen. Expressão da proteína gp53 foi medida através de citometria de fluxo com ativação sobre leucócitos IgE-positivos. Os resultados são expressos como % de células gp53 positivas em células ativadas (média ± desvio de 2 determinações).

Figura 10: Estimulação de proliferação de PBMC humana por proteínas de pólen e peptídeos de pólen: PBMCs humanas purificadas de voluntários alérgicos ao pólen foram incubadas 5 dias a 37 °C na presença de concentrações crescentes (10, 30 e 90 µg/ml) de proteínas de pólen ou peptídeos de pólen. [<sup>3</sup>H]-timidina foi adicionada à cultura de células durante 16 horas e a incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina foi medida com um contador beta usando o princípio de cintilação de líquido. Os resultados são expressos como a média de 5 determinações. O método da presente invenção é ainda exemplificado pelos exemplos não limitativos a seguir.

## **Exemplos**

### **Exemplo 1: Extração**

Pólen a 1% (peso/v) (*Lolium perenne* da ALLERGON) foi adicionado a bicarbonato de sódio (12,5 mM) e incubado 2 h sob agitação. A solu-

ção foi, então, clarificada e filtrada através da adição de celite (ACROS) a 2% (peso/v) e passando através de um filtro de 0,2 µm. Essa amostra constitui o extrato bruto.

5 A presença de alérgenos no extrato foi analisada através de Western blotting usando soro de pacientes alérgicos ao pólen. Epítomos de IgG e IgE são visualizados com anticorpos anti-IgG ou IgE humana.

Conforme mostrado nas figuras 1 e 2, existem dois alérgenos principais no extrato.

10 O referido extrato bruto foi acidificado para um pH de 3,0 e Tween 20 (0,1% v/v) foi adicionado. Essa amostra constitui o extrato acidificado.

### **Exemplo 2: Purificação de proteínas de alérgeno**

O extrato de alérgeno foi purificado através de:

- Cromatografia de troca de cátions

15 Uma membrana Sartobind S<sup>-</sup> (SARTORIUS) foi equilibrada com 28x volume de leito (Bv) de bicarbonato de sódio a 12,5 mM, citrato a 30 mM, pH de 3,0, Tween 20 a 0,1% (v/v). O referido extrato acidificado foi carregado sobre a membrana equilibrada. A coluna foi lavada primeiro com 35x Bv de bicarbonato de sódio a 12,5 mM, citrato a 30 mM, pH de 3,0, Tween 20 a 0,1% (v/v) e, então, lavada com 42x Bv de bicarbonato de sódio a 12,5  
20 mM, citrato a 30 mM, pH de 3,0. As proteínas foram eluídas com carbonato a 0,1 M, cloreto de sódio a 0,5 M, pH de 9,15. A presença de proteínas foi acompanhada pela OD a 280 nm. As frações de interesse foram empoadas.

- Precipitação com sulfato de amônio

Essa etapa foi realizada a 0-4 °C.

25 Uma quantidade de sulfato de amônio para atingir saturação de 90% foi adicionada ao produto sob agitação. A agitação foi cessada após a dissolução completa do sal. A suspensão foi incubada durante a noite e centrifugada 2 vezes durante 15 min a 10.000 g. O sobrenadante foi, de cada vez, cuidadosamente descartado.

30 - Desnaturação

As pelotas foram resuspensas a 9 mg/ml em uréia a 6 M, DTT a 10 mM, Tris.HCl a 0,1 M, pH de 8,0 e incubadas a 37 °C durante 1 h.

- Cromatografia por exclusão de tamanho sobre resina G25 (Sephadex fino da AMERSHAM)

A amostra desnaturada foi carregada sobre a coluna e as proteínas foram eluídas com Tris.HCl a 25 mM, uréia a 1,5 M, pH de 8,0.

5 A presença de proteínas foi acompanhada através de medição da OD a 280 nm. As frações de interesse foram empoçadas para constituir o extrato de alérgeno desnaturado purificado.

10 O extrato de alérgeno desnaturado purificado foi ainda analisado. O teor de proteína (Ensaio BCA) e o peso seco foram determinados de forma a avaliar a pureza da proteína. A eficiência de purificação também foi acompanhada através da remoção de carboidratos (teste de Orcinol) e através da diminuição da proporção OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>.

**Tabela 1:** Remoção de componentes de não-proteína para formar um extrato purificado

	Proporção proteína/peso seco	Proporção OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	Proporção carboidratos/proteína
Extrato bruto	16%	1,3	400%
Extrato purificado	85%	0,75	17%

15 Conforme mostrado na tabela 1, o processo de purificação permite:

- o aumento do percentual de proteínas no extrato de ~15% para 80%

20 - que a proporção OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> tenda a 0,5, caracterizando uma proteína pura

- uma remoção significativa de carboidratos (o teor residual poderia representar a porção carboidrato das proteínas).

**Exemplo 3: Hidrólise de extrato de alérgeno desnaturado**

O extrato foi hidrolisado usando o seguinte protocolo:

25 O referido extrato de alérgeno purificado foi acidificado para um pH de 2,0. A digestão foi realizada a 2,5 mg/ml de proteínas de pólen e 1 Eu. Ph. U de pepsina (MERCK) para 337 mg de proteínas a 37 °C durante 2 h.

A Figura 5 mostra uma comparação entre o extrato purificado (fileira 2) e o extrato hidrolisado (fileira 3). Conforme pode ser observado, proteínas de elevado peso molecular, correspondendo às proteínas não digeridas desnaturadas, desapareceram após a incubação com pepsina.

#### 5 **Exemplo 4: Purificação**

De forma a eliminar os peptídeos com um  $MW \geq 10.000$  Da e  $MW \leq 1.000$  Da, o hidrolisato foi purificado através de:

- Cromatografia por exclusão de tamanho sobre resina G50 (Sephadex fino da AMERSHAM). Isopropanol a 16,5% (v/v) e NaCl a 0,1 M foram adicionados ao hidrolisato.

Essa amostra foi imediatamente carregada sobre uma coluna G50. Os peptídeos foram eluídos e as frações contendo os peptídeos ( $MW \leq 10$  kDa) foram empoados, conforme mostrado na figura 6.

- Diafiltração sobre uma membrana de 1 kDa (cassete de ultrafiltração Omega PES da PALL). Os peptídeos foram concentrados 10x, diafiltrados contra 10 volumes de Tris.HCl a 50 mM, pH de 7,4 e, finalmente, concentrados 2,5x. Essa amostra constitui o hidrolisato de alérgeno purificado.

A eficiência da purificação foi controlada através de HPLC por exclusão de tamanho. Uma coluna BioSep-SEC S2000 (PHENOMENEX) foi equilibrada com  $Na_2HPO_4$  a 50 mM - SDS a 0,5% (peso/v), pH de 6,8, em uma taxa de fluxo de 1 ml/min.

Os limites de 10 kDa e 1 kDa foram calculados a partir de uma curva de calibração, conforme exemplificado na figura 7.

Conforme mostrado na figura 8, peptídeos com um peso molecular entre 1.000 Da e 10.000 Da representam cerca de 75% de todos os peptídeos no hidrolisato purificado.

#### **Exemplo 5: Diminuição de alergenicidade**

As propriedades de alergenicidade do extrato bruto de pólen (de acordo com o exemplo 1) e proteínas de pólen purificadas (de acordo com o exemplo 2) e peptídeos de pólen purificados (de acordo com o exemplo 4) foram avaliadas através de medição de sua capacidade de induzir à desgranulação de basófilo.

O teste foi realizado *in vitro* sobre amostras de sangue humano frescas de voluntários alérgicos ao pólen incubadas com concentrações crescentes de extrato bruto de pólen, proteínas purificadas e peptídeos purificados. Desgranulação de basófilo foi avaliada através de medição, por meio do método citométrico de fluxo, da expressão do marcador de proteína gp53 dos grânulos em células em repouso e aparece sobre a superfície celular quando de ativação da célula (em virtude da fusão da membrana do grânulo com a membrana citoplásmica). Portanto, ela se torna detectável por anticorpos anti-gp53 rotulados específicos. Conforme mostrado na figura 9, peptídeos purificados são cerca de 30x menos alergênicos do que proteínas purificadas e 100x menos alergênicos do que extrato bruto de pólen.

**Exemplo 6: Imunogenicidade das proteínas de pólen e peptídeos de pólen**

A imunogenicidade das proteínas e peptídeos de alérgeno foi estudada através de medição de sua capacidade de estimular a proliferação de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

PBMCs purificadas de amostra de sangue de voluntários alérgicos ao pólen através de centrifugação em gradiente de densidade foram cultivadas 5 dias em lâminas com 96 cavidades na presença de concentrações crescentes de proteínas de pólen e peptídeos de pólen. No dia 5, [<sup>3</sup>H]-timidina foi adicionada à cultura de células e as lâminas foram ainda incubadas a 37 °C durante 16 horas.

Proteínas de pólen (de acordo com o exemplo 2) e peptídeos de pólen (de acordo com o exemplo 4) estimulam a proliferação de PBMCs humanas de uma maneira dose-dependente. A proliferação induzida por peptídeos de alérgeno é ligeiramente menor do que aquela observada em resposta às proteínas. Esses resultados mostram que o processo de produção de peptídeo conserva a maioria dos epítomos do alérgeno implicado em ativação de células T.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de um extrato purificado de alérgenos naturais, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

5 a) extração de uma fonte natural de alérgenos compreendendo proteínas alergênicas para formar um extrato;

b) purificação do referido extrato para remover componentes de não-proteína para formar um extrato purificado;

10 c) desnaturação do referido extrato purificado para formar um extrato desnaturado purificado,

o referido extrato desnaturado purificado compreendendo proteínas, em que as proteínas mais abundantes (peso/peso), formando junto 60% ou mais (peso/peso) de todas as proteínas, são pelo menos duas proteínas e todas as proteínas representam pelo menos 60% (peso/peso) do peso seco do extrato desnaturado purificado.

15 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a extração é realizada em uma solução compreendendo nenhum sal ou um sal selecionado dentre carbonato, bicarbonato, fosfato, acetato, TRIS e HEPES.

20 3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a extração é realizada com um meio de extração em que o peso do meio de extração é de pelo menos 20 vezes, de preferência 100 vezes o peso da fonte natural de alérgenos.

25 4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a purificação compreende um ou mais de uma etapa de cromatografia de troca de íons, uma etapa de filtração em gel ou cromatografia por exclusão de tamanho, uma etapa de precipitação, uma etapa de cromatografia por interação hidrofóbica, uma etapa de cromatografia por pseudo afinidade ou afinidade ou uma etapa de diafiltração.

30 5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma etapa de purificação é realizada com uma solução compreendendo um tensídeo e/ou agente de desnaturação.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a desnaturação é realizada com um agente de desnaturação selecionado a partir do grupo de agentes caotrópicos, agentes redutores e misturas dos mesmos, de preferência dentre ureia, cloreto de guanidínio, 5 ditiotreitól, tioglicerol,  $\beta$ -mercaptoetanol e misturas dos mesmos.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a concentração de ureia é superior a 4 M, de preferência superior a 5 M e/ou a concentração de cloreto de guanidínio está acima de 3 M, de preferência acima de 4 M.

10 8. Método para a produção de um extrato purificado de alérgenos naturais, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

a) hidrólise de um alérgeno desnaturado para formar um hidrolisato de alérgeno,

15 b) purificação do referido hidrolisato de alérgeno para remover peptídeos com um peso molecular superior a 10.000 Da e inferior a 1.000 Da de modo a obter um hidrolisato purificado onde 70%, mais preferivelmente 80% dos peptídeos estão entre 10.000 Da e 1.000 Da.

20 9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a hidrólise é realizada com uma enzima, de preferência pepsina, tripsina ou quimiotripsina.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que a hidrólise é realizada na presença de um agente caotrópico, de preferência selecionado dentre ureia e cloreto de guanidínio.

25 11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, caracterizado pelo fato de que a remoção dos peptídeos é realizada através de cromatografia por exclusão de tamanho e/ou através de ultrafiltração.

30 12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a etapa de cromatografia por exclusão de tamanho é realizada na presença de um agente caotrópico, de preferência selecionado dentre uréia, cloreto de guanidínio, etileno glicol, isopropanol e misturas dos mesmos.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, caracterizado pelo fato de que, antes de hidrólise, um alérgeno não desnaturado é desnaturado para formar um alérgeno desnaturado.

5 14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a desnaturação é realizada na presença de agentes caotrópicos, agentes de redução e misturas dos mesmos.

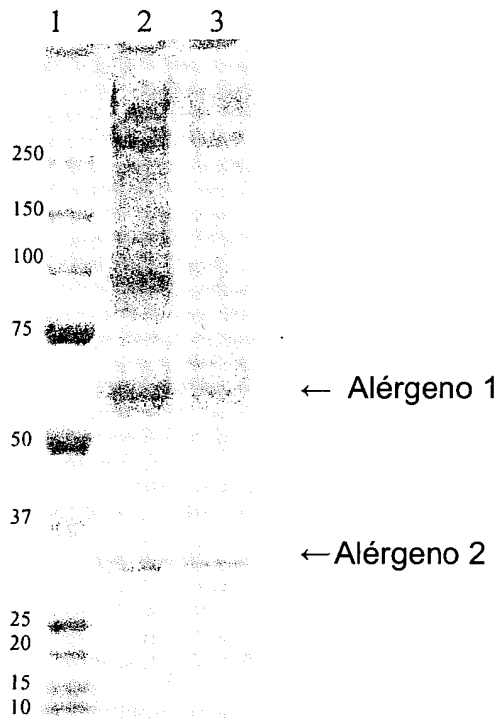
10 15. Uso de um extrato desnaturado purificado de alérgenos naturais obtido através do método, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou de um hidrolisato de alérgeno purificado obtido através do método, como definido em qualquer uma das reivindicações 8 a 14, caracterizado pelo fato de que é para o preparo de uma composição farmacêutica e/ou composição alimentícia para indução de tolerância.

15 16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a indução de tolerância é usada para curar ou prevenir reações alérgicas.

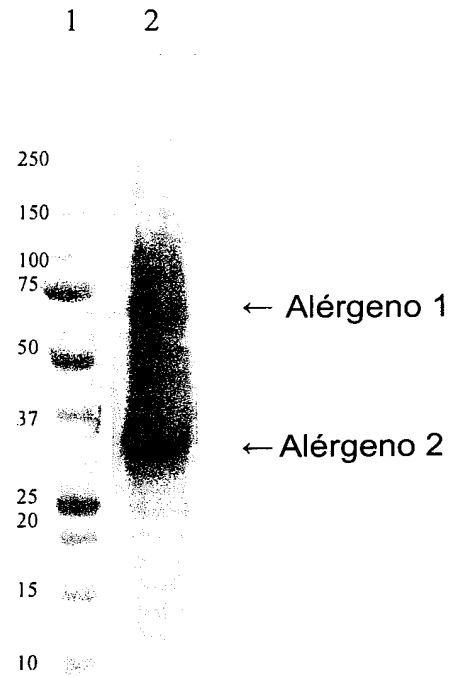
20 17. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um extrato desnaturado purificado de alérgenos naturais obtido através do método, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou um hidrolisato de alérgeno purificado obtido através do método, como definido em qualquer uma das reivindicações 8 a 14.

25 18. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que os alérgenos são selecionados dentre alérgenos de pólen, alérgenos de leite, alérgenos de veneno, alérgenos de ovo, alérgenos de ervas daninhas, alérgenos de grama, alérgenos de árvores, alérgenos de arbusto, alérgenos de flores, alérgenos vegetais, alérgenos de grão, alérgenos de fungos, alérgenos de fruta, alérgenos de bagas, alérgenos de nozes, alérgenos de semente, alérgenos de favas, alérgenos de peixe, alérgenos de moluscos, alérgenos de frutos do mar, alérgenos de carne, alérgenos de ácaros, alérgenos de insetos, alérgenos de ácaros,  
30 alérgenos de mofo, alérgenos animais, alérgenos de carrapato da pomba, alérgenos de verme, alérgenos de coral mole, alérgenos de pêlo de animal, alérgenos de nematóide, alérgenos de Hevea brasiliensis.

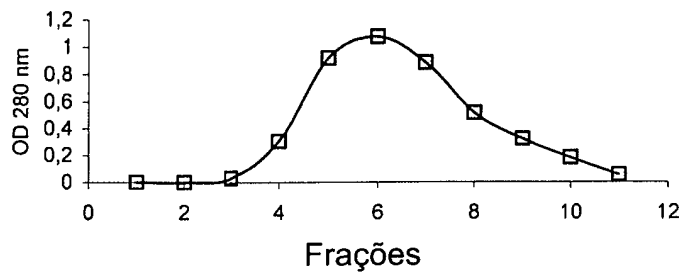
19. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizada pelo fato de que é para administração oral, para distribuição de fármaco sublingual, para distribuição de fármaco entérica.



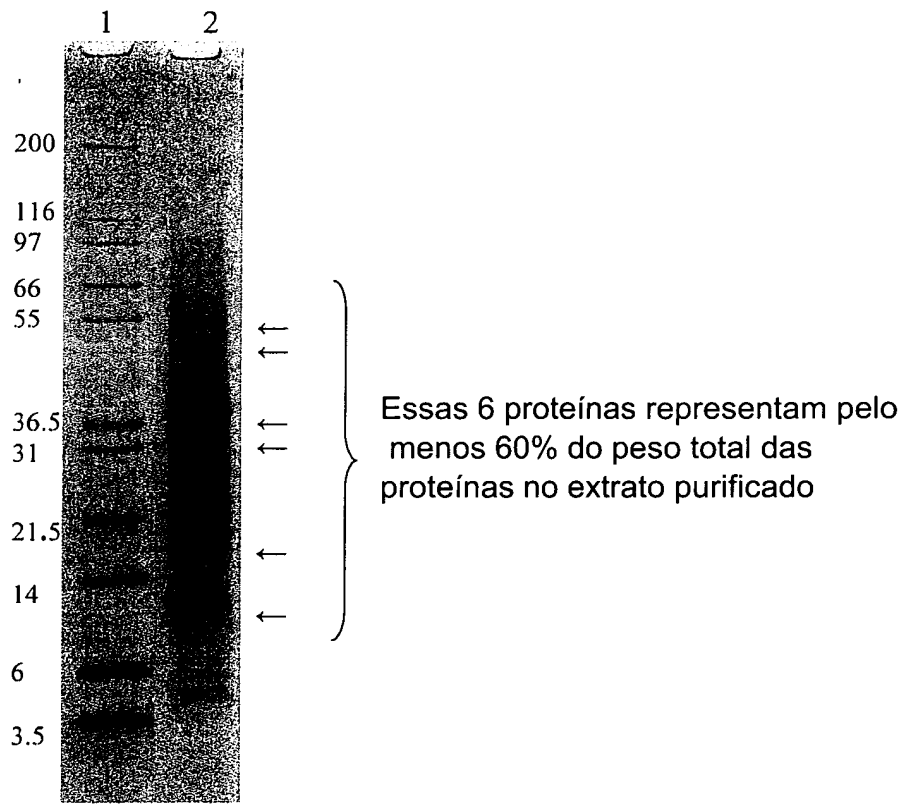
**Fig.1**



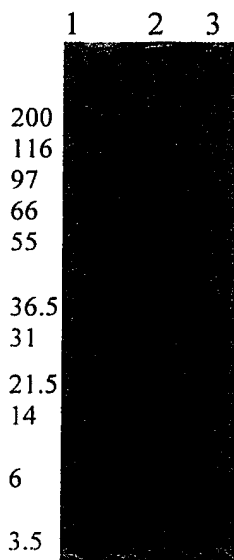
**Fig.2**



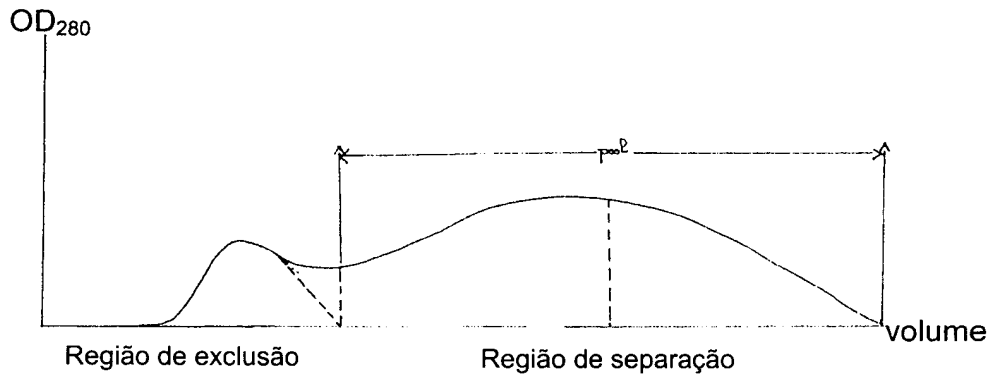
**Fig.3**



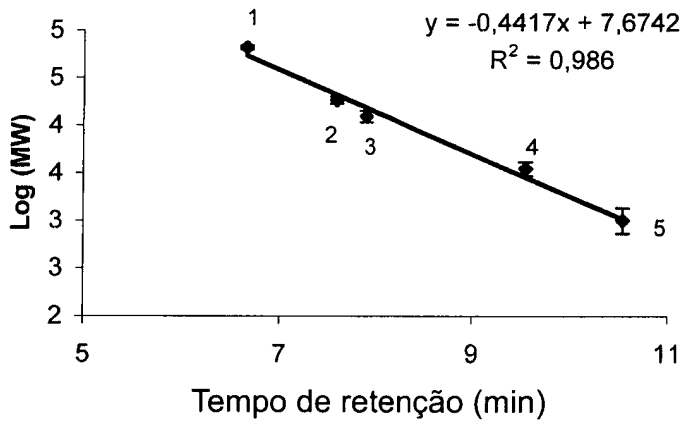
**Fig.4**



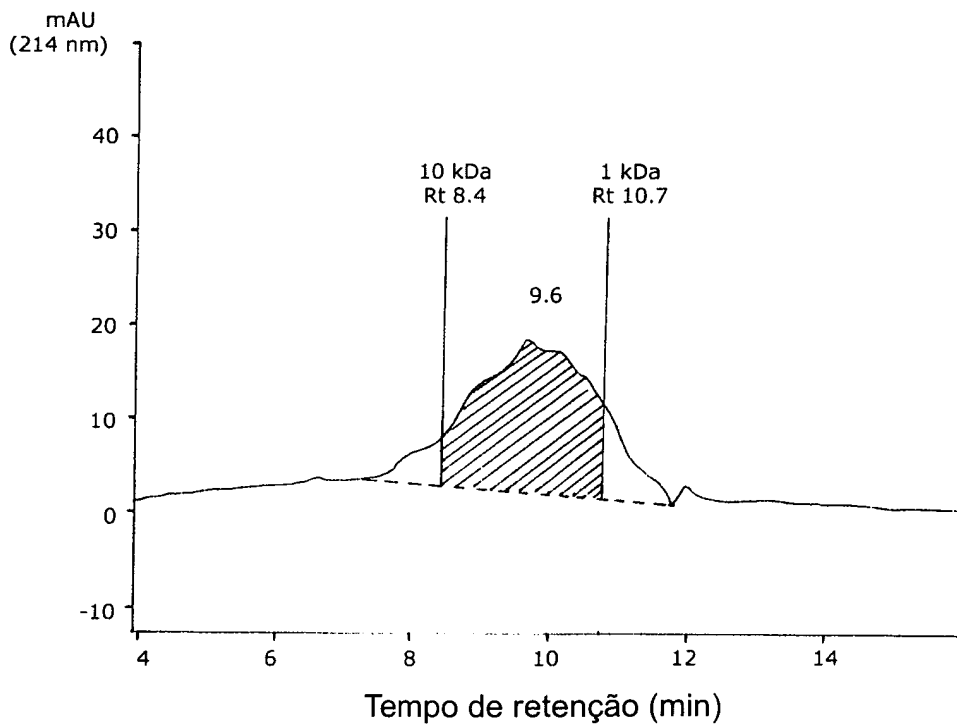
**Fig.5**



**Fig.6**



**Fig.7**



**Fig.8**

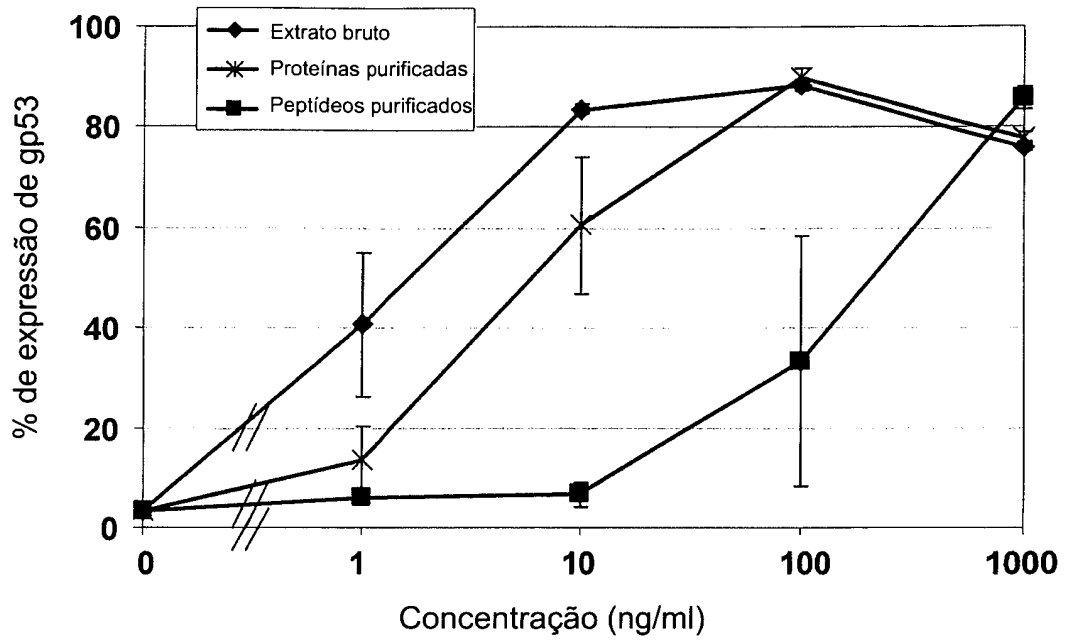


Fig.9

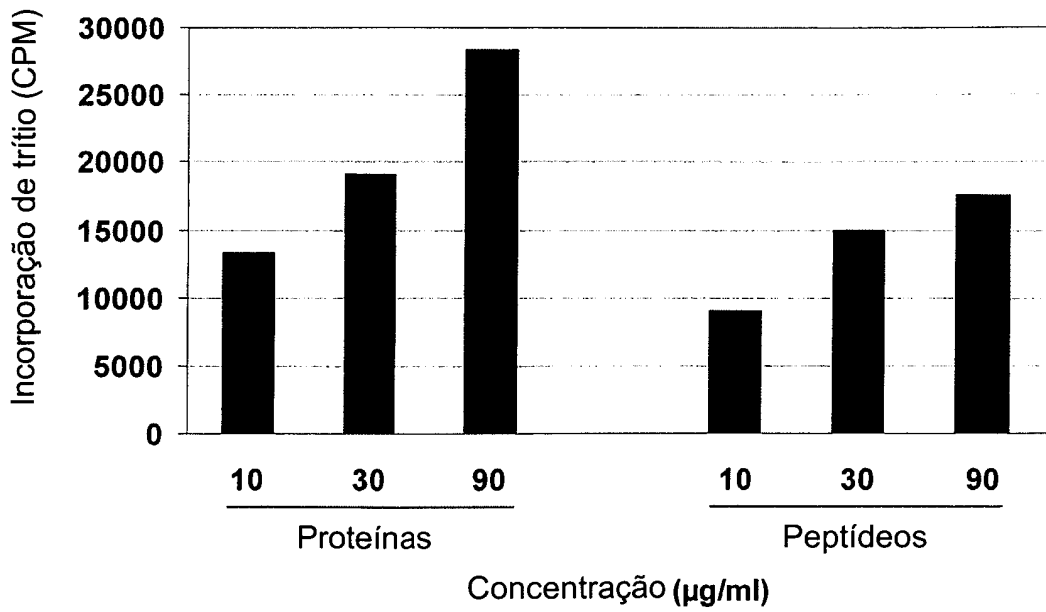


Fig.10