

REFERATE GENERALE

Metode de laborator pentru caracterizarea fizico-chimică a alergenelor recombinat ca standarde de referință

Laboratory Methods for the Physico-Chemical Characterization of Recombinant Allergens as Reference Standards

[Mariana Vieru \(/reviste/search?author=Vieru+Mariana\)](#),

[Florin-Dan Popescu \(/reviste/search?author=Popescu+Florin-Dan\)](#),

[Laura Haidar \(/reviste/search?author=Haidar+ Laura\)](#),

[Prof. Univ. Dr. Carmen Bunu-Panaitescu \(/reviste/search?author=Bunu-Panaitescu+Carmen\)](#)

First published: 31 martie 2020

Editorial Group: MEDICHUB MEDIA

DOI: 10.26416/Aler.4.1.2020.2978

Abstract

The methods used to quantify the physico-chemical parameters of molecular allergens are multiple. The physico-chemical parameters selected for the evaluation of the quality of natural purified and recombinant allergens include the identity of the primary structure, the secondary structure, the purity and homogeneity. However, there is no single method that can analyze all the important characteristics represented by structural, physico-chemical and immunological properties.

Keywords

molecular allergens, physico-chemical characteristics, laboratory methods

Rezumat

Metodele utilizate pentru cuantificarea parametrilor fizico-chimici ai alergenelor moleculare sunt multiple. Parametrii fizico-chimici selectați pentru evaluarea calității alergenelor naturale purificate și recombinat includ identitatea structurii primare, structura secundară, puritatea și omogenitatea. Nu există însă o unică metodă care să poată analiza toate caracteristicile importante reprezentate de proprietăți structurale,

fizico-chimice și imunologice.

Cuvinte cheie

alergene moleculare (/reviste/alergologia?tag=alergene moleculare)

caracteristici fizico-chimice (/reviste/alergologia?tag=caracteristici fizico-chimice)

metode de laborator (/reviste/alergologia?tag=metode de laborator)

Caracterizarea riguroasă prin metode chimice, fizico-chimice și biologice a produselor bioterapeutice produse prin tehnologia ADN-ului recombinat este esențială, conform recomandărilor Organizației Mondiale a Sănătății (*World Health Organization*, WHO). Metodele proteomice, biochimice și imunochimice de caracterizare a alergenelor recombinat efectuate în faza de dezvoltare determină proprietățile fizico-chimice, imunochimice, activitatea biologică, puritatea și confirmă calitatea produselor alergene. Stabilirea unor standarde de referință bine caracterizate bazate pe alergene recombinat și metode de analiză de laborator validate pentru cuantificarea alergenelor moleculare sunt obiective semnificative ale Programului de standardizare biologică al Direcției Europene pentru Calitatea Medicamentelor și a Sănătății (*European Directorate for the Quality of Medicines*, EDQM)⁽¹⁻⁵⁾.

Metodele utilizate pentru cuantificarea parametrilor fizico-chimici ai produselor alergene sunt multiple⁽⁶⁻⁹⁾. Conform unui proiect important finanțat de Uniunea Europeană, denumit CREATE (*Development of Certified Reference Materials for Allergic Products and Validation of Methods for their Quantification*), parametrii fizico-chimici selectați pentru evaluarea calității alergenelor naturale purificate și recombinat includ identitatea structurii primare, structura secundară, puritatea și omogenitatea, iar metodele de laborator pentru caracterizarea fizico-chimică a alergenelor recombinat, inclusiv ca standarde de referință (pentru Bet v 1.0101 și Phl p 5.0109), au fost publicate detaliat și le vom menționa în continuare^(3-5,10-12). Nu există însă o metodă unică care să poată analiza toate caracteristicile importante reprezentate de proprietăți structurale, fizico-chimice și imunologice^(13,14).

Metode de laborator utilizate pentru a caracteriza identitatea, cantitatea și structura

Alergenele trebuie să prezinte compoziție și secvențe de aminoacizi în acord cu secvențele primare cunoscute (publicate). Investigarea identității proteice pentru alergenele moleculare recombinat se face prin metode bazate pe spectrometrie de masă și analiza aminoacizilor. Analiza greutății moleculare intacte a unei proteine se face prin spectrometrie de masă (*mass spectrometry*, MS). Spectrometria de masă de înaltă rezoluție (*high-resolution mass spectrometry*, HRMS) este utilizată pentru măsurarea intactă a masei pe diferite platforme care utilizează tehnica cuadrupolului, a trapei orbitale și a trapei ionice. Secvențierea peptidelor (*peptide mapping*) produse prin digestia enzimatică proteolitică se realizează prin cromatografie nanolichidă cu detecție prin spectrometrie de masă în tandem (*nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, NanoLC-MS/MS) ca tehnică principală pentru confirmarea structurii primare proteice (secvența de aminoacizi).

Evaluarea cantitativă proteică este cuantificată prin analiza aminoacizilor (*amino acid analysis*, AAA). Trebuie să existe o corelație excelentă între compoziția (identitatea) teoretică a aminoacizilor și cea observată experimental. Metodele de analiză a aminoacizilor includ hidroliza convențională și derivatizare pre-coloană cu fenilzotiocianat (PITC) și separare prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) sau cu *o*-ftalaldehidă (OPA) și HPLC în fază inversă (RP-HPLC).

Spectroscopia de dicroism circular (*circular dichroism*, CD) este frecvent utilizată pentru a analiza structura secundară (regiunea spectrală UV îndepărtată). Spectrometrele dedicate măsurării fenomenului de dicroism circular sunt denumite spectropolarimetre. Alergenele recombinat trebuie să aibă structura proteică pliată corespunzător. Dicroismul circular al moleculelor candidate trebuie să prezinte caracteristici spectrale tipice unei proteine pliate cu amplitudini de vârf similare spectrelor de referință. Această metodă nu numai că furnizează informații pur structurale despre alergene, dar poate permite predicții despre activitatea alergenică.

Difractometria cu raze X la unghiuri mici (*small-angle X-ray scattering*, SAXS) poate furniza de asemenea informații utile, deoarece proteinele denaturate pot prezenta alterarea funcției de distribuție a distanței pentru perechi (*pair distance distribution function*, PDDF).

Metode de laborator utilizate pentru a caracteriza omogenitatea

Alergenele recombinat trebuie să fie omogene în ceea ce privește greutatea moleculară și să fie comparabile cu omologii lor naturali. Electroforeza în gel de poliacrilamidă cu dodecilsulfat de sodiu (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) sau electroforeza cu focalizare izoelectrică (*isoelectric focusing*, IEF), cu colorare cu albastru brilliant de Coomassie (*Coomassie staining*), acid periodic Schiff (PAS) sau nitrat de argint (*silver staining*) separă alergenele moleculare recombinat în cantități de ordinul microgramelor, iar identitatea benzilor vizibile de proteine poate fi relevată prin metoda imunoblotting cu utilizarea de anticorpi monoclonali specifici alergenelor recombinat și eșantion de seruri de la pacienți alergici. Modificările posttranslaționale, de agregare sau degradare, pot produce benzi suplimentare.

Metoda care este folosită în mod obișnuit pentru a evalua omogenitatea este cromatografia de filtrare în gel. Pentru proteinele monomerice, eșantionul trebuie să conțină un vârf (*peak*) unic de greutate moleculară preconizată. Cromatografia lichidă de înaltă performanță (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) de tip gel-filtrare sau cromatografia de excluziune sterică (*size-exclusion chromatography*, SEC) este utilizată pentru a evalua omogenitatea în soluție, putând fi detectate forme oligomerice sau monomerice, agregate și produse de degradare. Cromatograma de excluziune moleculară monitorizată prin semnal de dispersie a luminii în unghi drept (*right-angle light scattering*, RALS) este extrem de sensibilă pentru agregatele cu greutate moleculară mare. Greutatea moleculară (kDa) și raza hidrodinamică (nm) pot fi determinate prin combinarea RALS cu indicii de refracție și semnalul de viscozitate. Este posibil să se determine dacă alergenul recombinat constă din > 99,9% molecule monomerice omogene.

Microscopia electronică cu tehnică de colorare negativă (*negative staining*) poate fi utilizată pentru evidențierea prezenței agregatelor de dimensiuni diferite. Difractometria cu raze X la unghiuri mici (*small-angle X-ray scattering*, SAXS) oferă informații despre statusul agregării moleculelor proteice în soluție. Modificările posttranslaționale și chimice rezultate din procesul de producție prin tehnica de recombinare pot fi detectate și cuantificate prin spectrometria de masă pentru eterogenitate.

Comportamentul de agregare și stabilitatea în soluție sunt investigate prin metoda de dispersie dinamică a luminii (*dynamic light scattering*, DLS), care evaluează agregatele cu greutate moleculară mai mare și polidispersitatea. În plus, poate detecta modificări ale razei hidrodinamice după mai multe săptămâni de depozitare.

În studiile de stabilitate conformațională a fost adăugată și spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy*, FT-IR).

Metode de laborator utilizate pentru a caracteriza puritatea

Preparatele alergene trebuie să fie cel puțin 95% pure din punctul de vedere al conținutului proteic. Metoda de elecție pentru puritate este SDS-PAGE în combinație cu colorarea cu argint. Prin SDS-PAGE pot fi detectate proteinele contaminante cu greutate moleculară diferită. Analiza aminoacizilor oferă informații suplimentare despre puritate, deoarece contaminarea cu alte proteine poate modifica conținutul de aminoacizi individuali. Mai mult, la utilizarea MS sau SEC-HPLC, contaminarea cu proteine cu greutate moleculară diferită poate duce la vârfuri (*peaks*) suplimentare. Trebuie menționat și faptul că SEC-HPLC și alte metode cromatografice, precum cromatografia de imunoafinitate și cromatografia de afinitate cu ioni metalici imobilizați (*immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC), sunt utilizate ca metode de purificare a alergenelor recombinat.

În afara metodelor precizate anterior pentru caracterizarea fizico-chimică a alergenelor recombinat, merită menționate și metodele de **caracterizare imunologică**^(3-5,8,14). Metodele de caracterizare *in vitro* a activității biologice sunt reprezentate de testele de inhibare a legării IgE (*IgE-binding inhibition*), de tip inhibiția RAST (*radioallergosorbent test inhibition*), inhibiția ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) și inhibiția ImmunoCAP FEIA (*fluorescence enzyme immunoassay*). Alte metode *in vitro* de cuantificare a reactivității imune sunt reactivitatea IgE prin analiză imunoblot de tip *dot-blot* și testul de eliberare a histaminei din bazofile cu IgE înlăturate de pe suprafață cu acid lactic (*stripped basophil histamine release assay*). Integritatea și echivalența epitopilor recombinat cu componentele alergene moleculare naturale purificate pot fi determinate prin testul de activare a bazofilelor (*basophil activation test*, BAT) cu cuantificarea expresiei markerului de suprafață CD203c și evaluarea reactivității limfocitelor T alergen-specifice prin teste de proliferare limfocitară cu încorporare de timidină tritiată și rezultate exprimate ca index de stimulare.

În final, subliniem importanța datelor EDQM referitoare la caracterizarea și cuantificarea alergenelor recombinat și adoptarea de către Farmacopeea Europeană a metodelor și materialelor de referință pentru cuantificarea alergenelor^(2-5,14,15). De exemplu, rBet v 1.0101 și rPhl p 5.0109, produse în condiții de bună practică de fabricație (*good manufacturing practice*, GMP), sunt extrem de asemănătoare cu

omologii lor naturali din punct de vedere fizico-chimic, structural și biologic, de aceea sunt considerate adecvate ca standarde de referință pentru Farmacopeea Europeană^(4,5). În afara stabilirii standardelor de referință prezentate, recent este discutată necesitatea validării metodelor ELISA de tip sandwich pentru cuantificarea alergenelor moleculare majore ca metodologie standard pentru Farmacopeea Europeană⁽¹⁶⁾.

Acest articol a fost elaborat în cadrul proiectului INSPIRED (Strategii inovative pentru prevenția, diagnosticul și terapia afecțiunilor respiratorii induse de polenul de ambrozia), cod SMIS 103662.

Bibliografie

1. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organ Tech Rep Ser. 2014; (987):1-266
2. The European Parliament and Council. Directive 2001/83/EC on the community code relating to medicinal products for human use. Official Journal of the European Communities. 2001; L331: 67-128.
3. van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, Villalba M, Durham SR, Becker WM, Aalbers M, André C, Barber D, Cistero Bahima A, Custovic A, Didierlaurent A, Dolman C, Dorpema JW, Di Felice G, Eberhardt F, Fernandez Caldas E, Fernandez Rivas M, Fiebig H, Focke M, Fötisch K, Gadermaier G, Das RG, Gonzalez Mancebo E, Himly M, Kinaciyan T, Knulst AC, Kroon AM, Lepp U, Marco FM, Mari A, Moingeon P, Monsalve R, Neubauer A, Notten S, Ooievaar-de Heer P, Pauli G, Pini C, Purohit A, Quiralte J, Rak S, Raulf-Heimsoth M, San Miguel Moncin MM, Simpson B, Tsay A, Vailes L, Wallner M, Weber B. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy*. 2008; 63(3): 310-326.
4. Himly M, Nony E, Chabre H, Van Overtvelt L, Neubauer A, van Ree R, Buchheit KH, Vieths S, Moingeon P, Ferreira F. Standardization of allergen products: 1. Detailed characterization of GMP-produced recombinant Bet v 1.0101 as biological reference preparation. *Allergy*. 2009; 64(7): 1038-45.
5. Himly M, Nandy A, Kahlert H, Thilker M, Steiner M, Briza P, Neubauer A, Klysner S, van Ree R, Buchheit KH, Vieths S, Ferreira F. Standardization of allergen products: 2. Detailed characterization of GMP-produced recombinant Phl p 5.0109 as European Pharmacopoeia reference standard. *Allergy*. 2016; 71(4): 495-504.
6. WHO Position Paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. Geneva: January 27-29 1997. *Allergy*. 1998; 53(44 Suppl): 1-42.
7. Becker WM, Vogel L, Vieths S. Standardization of allergen extracts for immunotherapy. Where do we stand? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006; 6(6): 470-475.
8. Popescu FD, Vieru M, Popescu F. Standardizarea preparatelor alergice pentru imunoterapia sublinguală în alergii la polen de graminee. *Journal of Romanian Society of Allergology and Clinical Immunology*. 2014; 11(3): 86-91.
9. Schmidt H, Gelhaus C, Nebendahl M, Janssen O, Petersen A. Characterization of Phleum pratense pollen extracts by 2-D DIGE and allergen immunoreactivity. *Proteomics*. 2010; 10(24): 4352-4362.
10. Asam C, Roulias A, Parigiani MA, Haab A, Wallner M, Wolf M, Briza P, Bohle B, Ferreira F, Hauser M. Harmonization of the genetic code effectively enhances the recombinant production of the major birch pollen allergen Bet v 1. *Int Arch Allergy Immunol*. 2018; 177(2): 116-122.
11. Najafi N, Hofer G, Gatteringer P, Smiljkovic D, Blatt K, Selb R, Stoecklinger A, Keller W, Valent P, Niederberger V, Thalhammer J, Valenta R, Flicker S. Fusion proteins consisting of Bet v 1 and Phl p 5 form IgE-reactive aggregates with reduced allergenic activity. *Sci Rep*. 2019; 9(1):4006.
12. Valenta R, Kraft D. Recombinant allergens: from production and characterization to diagnosis, treatment, and prevention of allergy. *Methods*. 2004; 32(3): 207-8.
13. Valenta R, Karaulov A, Niederberger V, Zhernov Y, Elisutina O, Campana R, Focke-Tejkl M, Curin M, Namazova-Baranova L, Wang JY, Pawankar R, Khaitov M. Allergen extracts for in vivo diagnosis and treatment of allergy: is there a future? *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018; 6(6): 1845-1855.
14. Kaul S, Zimmer J, Dehus O, Costanzo A, Daas A, Buchheit KH, Asturias JA, Barber D, Carnés J, Chapman M, Dayan-Kenigsberg J, Döring S, Führer F, Hanschmann KM, Holzhauser T, Ledesma A, Moingeon P, Nony E, Pini C, Plunkett G, Reese G, Sandberg E, Sander I, Strecker D, Valerio C, van Ree R, Vieths S. Standardization of allergen products: 3. Validation of candidate European Pharmacopoeia standard methods for quantification of major birch allergen Bet v 1. *Allergy*. 2016; 71(10): 1414-24.
15. Bonini S. Regulatory aspects of allergen-specific immunotherapy: Europe sets the scene for a global approach. *World Allergy Organ J*. 2012; 5(10): 120-123.
16. Kaul S, Zimmer J, Dehus O, Constanzo A, Daas A, Buchheit KH, Asturias J, Arilla MC, Barber D, Bertocchi A, Brunetto B, Carnes JA, Chapman M, Chaudemanche G, Dayan-Kenigsberg J, Döring S, Führer F, Gallego MT, Iacovacci P, Hanschmann