



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

(21) **PI0904036-6 A2**

(22) Data de Depósito: 07/10/2009
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)



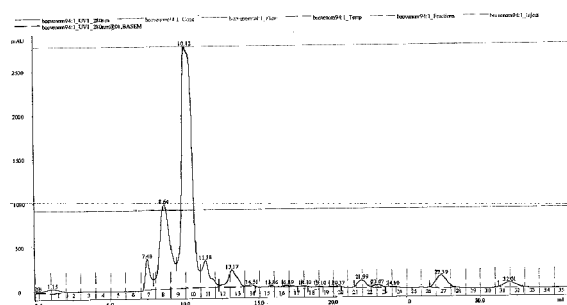
(51) *Int.Cl.:*
A61K 35/64 2006.01
A61P 29/00 2006.01

(54) Título: **PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS ELABORADOS COM COMPONENTES ISOLADOS DE APITOXINA DE ABELHAS APIS MELLIFERA, COMPOSIÇÃO E USO**

(73) Titular(es): Fundação Ezequiel Dias, Universidade Federal de Minas Gerais

(72) Inventor(es): Esther Margarida Alves, Jorge Luiz Pesquero, Leonardo de Albuquerque Merlo, Luiz Guilherme Dias Heneine, Márcio de Matos Coelho

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS ELABORADOS COM COMPONENTES ISOLADOS DE APITOXINA DE ABELHAS *Apis mellifera*, COMPOSIÇÃO E USO. A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de matéria prima e de componentes isolados de apitoxina de abelhas *Apis mellifera* de baixa alergenicidade em escala industrial, com propriedades analgésicas e antiinflamatórias para ser incorporado em formas farmacêuticas semi-sólidas ou líquidas, preferencialmente pomada, creme ou géis. Mais particularmente a invenção ora descrita pode ser usada no tratamento de artrite reumatóide e de outros distúrbios inflamatórios e dolorosos.





“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS ELABORADOS COM COMPONENTES ISOLADOS DE APITOXINA DE ABELHAS *Apis mellifera*, COMPOSIÇÃO E USO”.

Campo da invenção

5 A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de matéria prima e de componentes isolados de apitoxina de abelhas *Apis mellifera* de baixa alergenicidade em escala industrial, com propriedades analgésicas e antiinflamatórias para ser incorporado em formas farmacêuticas semi-sólidas ou líquidas, preferencialmente pomada, creme ou géis. Mais particularmente a
10 invenção ora descrita pode ser usada no tratamento de artrite reumatóide e de outros distúrbios inflamatórios e dolorosos.

Antecedentes da Invenção:

O uso de pomadas ou outra forma farmacêutica semi-sólida ou líquida, seja injetável ou não, formulado a partir de componentes bioativos da apitoxina
15 de abelhas *Apis mellifera*, foi baseado nas indicações da medicina popular, que descrevem que vários componentes presentes no veneno de abelhas da espécie *Apis mellifera* são capazes de reduzir a inflamação e dor associada a doenças inflamatórias.

Apesar da picada de abelha induzir alergias, dor e edema locais, o
20 veneno de abelha tem sido usado empiricamente em intervenções terapêuticas para alívio da dor e edema associados à artrite reumatóide e osteoartrite. Encontram-se relatos do uso do veneno com objetivos terapêuticos desde a antiguidade. Cerca de 400 anos a.C., Hipócrates usou o veneno de abelhas e o chamou de “*Arcanum*”, um remédio muito misterioso. Galeno (130-200 d.C.)
25 também mencionou o uso do veneno de abelhas em seus estudos. Também há relatos de que Carlos Magno, o grande conquistador, foi curado de gota por meio de picadas de abelhas por volta de 800 d.C. Em 1858, C.W. Wolf, um médico alemão, publicou seu livro “*Apis mellifera ou o veneno de abelhas considerado como um agente terapêutico*”. Em 1935, Beck escreveu o livro
30 “*Terapia do Veneno de Abelhas*”, sendo considerado referência até os dias atuais.

Após 1945, foram iniciados diversos estudos melhor controlados com o objetivo de investigar as propriedades terapêuticas do veneno de abelha. O reconhecimento internacional dos produtos das abelhas como medicamentos cresce a cada dia graças às pesquisas devidamente conduzida que fornecem sustentação ao que, na antiguidade, era apenas uma observação empírica.

Diversos estudos conduzidos em animais experimentais demonstraram ações antiinflamatórias e antinociceptivas do veneno e de alguns de seus componentes. Nesses estudos, o veneno geralmente é administrado de forma diluída. A administração subcutânea do veneno de abelha inibe o edema (CHANG & BLIVEN, 1979) e a resposta nociceptiva (LEE et al., 2001) induzidos pela carragenina em ratos. O veneno também inibe a resposta inflamatória induzida pelo adjuvante de Freund em ratos (KANG et al., 2002; LEE et al., 2005). Thomsem et al. (1984) verificaram que a injeção subcutânea do veneno de abelha inibe a inflamação articular induzida pela injeção de complexo imune em coelhos, observando que o veneno reduz o número de leucócitos no líquido sinovial, mas não altera a mobilidade e a fagocitose dessas células. O veneno também induz apoptose de fibroblastos obtidos do tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (HONG et al., 2005).

O veneno também tem sido usado empiricamente em técnicas de acupuntura. Segundo Lee et al. (2004), a injeção do veneno em pontos específicos (apicupuntura) reduz os sinais da artrite e a produção de citocinas inflamatórias induzidos pelo adjuvante de Freund em camundongos. Kwon et al. (2002) demonstraram que a fração hidrossolúvel do veneno, também administrada por meio dessa técnica, reduz o edema e a resposta nociceptiva induzida pelo adjuvante de Freund em ratos. Vários estudos demonstraram que o veneno de abelha inibe a expressão de COX-2 (NAM et al., 2003; JANG et al., 2005) e a produção de citocinas inflamatórias (NAM et al., 2003; REKKA et al., 1990) e de NO (JANG et al., 2005). É possível que a inibição da síntese de NO e da expressão do gene da COX2 estejam associados à supressão de NF- κ B e da expressão da proteína quinase ativadora de mitose (JANG et al., 2005; PARK et al., 2004).

Vick & Shipman (1972) e Vick et al. (1972) demonstraram que o veneno e a melitina, também aumentam a produção de cortisol em macacos e cães. Esse efeito não é observado em animais hipofisectomizados. Chang & Bliven (1979) também sugeriram que o efeito antiinflamatório induzido pelo veneno de abelha está associado à produção de esteróides adrenais. Kwon et al. (2003) observaram que o efeito antiinflamatório induzido pelo veneno de abelha também depende de catecolaminas de origem adrenal. É provável que a estimulação adrenal induzida pelo veneno resulte da ativação de mecanismos colinérgicos na medula espinhal (YONN et al., 2005).

Os resultados de diversos estudos conduzidos em animais experimentais demonstrando o efeito antiinflamatório do veneno de abelha e de alguns de seus componentes justificam o grande interesse em investigar o seu uso no tratamento de diferentes condições inflamatórias. Interesse adicional nessa investigação resulta do fato de que as doses das frações hidrossolúveis do veneno que induzem o efeito antiinflamatório não causam alterações importantes de vários parâmetros fisiológicos (KIM et al., 2004), o que indica certo grau de segurança associado ao procedimento. O veneno das abelhas é um dos mais importantes produtos apícolas devido a diversidade de seus efeitos farmacológicos, demonstrado ao longo dos últimos anos, tanto por seu emprego na forma empírica no tratamento de enfermidades osteo- articulares, como em recentes estudos científicos que corroboram sua atividade terapêutica, constituindo uma rica fonte de peptídios biologicamente ativos (BROADMAM, 1962; CHANG, 1979; SWITZER, 1979; SZOKAN, 1994; VICK, 1972ab; 1978; SIMICS, 1998).

A apitoxina é uma fonte rica em peptídeos farmacologicamente e imunologicamente ativos. Assim sendo, tem sido alvo de inúmeras pesquisas com o propósito de elucidar os efeitos de seus componentes. Os principais componentes da apitoxina são proteínas (enzimas), de peso molecular entre 19.000 daltons a 170.000 daltons; peptídeos melitina, apamina etc, 2.000 a 11.500 daltons, aminas fisiologicamente ativas, histamina, dopamina e noradrenalina.

A MELITINA representa 50% de seu peso seco e estimula a hipófise-adrenal a liberar catecolaminas e cortisol, exercendo um potente efeito anti-inflamatório, provoca a contração dos músculos lisos e do músculo cardíaco isolado, dilatando os capilares diminuindo a pressão arterial, bloqueia a transmissão de impulsos nervosos, provocando um efeito anestésico, possui ação hemolítica e reduz os níveis de colesterol no sangue. Foi demonstrado, que a melitina se liga à fosfolipase secretada e inibe sua atividade enzimática suprimindo em consequência, a inflamação (SAINI, 1997).

A APAMINA é o componente ativo menor do veneno de abelha. É um peptídeo de baixo peso molecular, consistindo de 18 aminoácidos, dos quais 4 são de meias cistinas. É fortemente básica, como a melitina, mas, à diferença da melitina, não mostra atividade citolítica contra eritrócitos. A apamina tem efeito neurotóxicos excitatórios sobre o sistema nervoso central. Quando injetada intravenosamente em ratos causa hiperatividade extrema e descoordenada, convulsões crônicas, seguidas por estresse respiratório e morte (ORLOV, 1998; SZOKAN, 1994).

A FOSFOLIPASE é o principal alérgeno do veneno de abelha e tem forte ação inflamatória. A fosfolipase degrada os fosfolípidos das membranas celulares, possuem ação hipotensora, previnem a atividade da tromboquinase com ação anticoagulante e possuem propriedades antibacteriana e antiviral (BLASER, 1998; COTTRELL, 1981; DHILLON, 1992).

A HIALURONIDASE despolimeriza o ácido hialurônico dos tecidos, permitindo a penetração do veneno no organismo, é antigênica, anafilactogênica e altamente alérgica (GMACHL, 1993).

As reações alérgicas, que atingem cerca de 1-2% da população, são atribuídas, principalmente, às enzimas fosfolipase A2 e hialuronidase. No veneno de abelhas, a primeira tem peso molecular em torno de 11.000 (AMERATUNGA, 1995; BLASER, 1998; DHILLON, 1992) e a segunda em torno de 40.000 D (COTTRELL, 1981; DENNIS, 1983; GMACHL, 1993; ORLOV, 1998). A apitoxina é um produto de extrema importância para a terapia da artrite e de grande valor no mercado internacional. Contudo, o

produto ainda tem uma participação restrita neste mercado, devido à carência de protocolos analíticos para atestar sua pureza e alergenicidade.

O fracionamento mostra-se como um recurso simples e potencialmente aplicável tanto para aferir a ausência de adulterantes como para obter frações da apitoxina com potencial alergênico atenuado, obtidos em escala industrial, com propriedades analgésicas e antiinflamatórias para ser incorporado a pomada ou outra forma farmacêutica semi-sólida ou líquida, seja injetável ou não. Para o tratamento de artrite reumatóide e de outros distúrbios inflamatórios e dolorosos.

10 **Sumário da Invenção:**

O requerimento da patente está relacionado à padronização de extração de veneno de abelhas *Apis mellifera* para fins medicamentos e a obtenção em escala industrial de componentes bioativos (FAM) do veneno de abelha, de baixa alergenicidade, para ser incorporado a pomada ou outra forma farmacêutica semi-sólida ou líquida, seja injetável ou não, formulados com diferentes concentrações. Para o tratamento de artrite reumatóide e de outros distúrbios inflamatórios e dolorosos.

Descrição detalhada da invenção:

Os métodos de extração e ou obtenção de veneno diretamente das colméias, estão baseados em estímulo elétrico, evitando que o inseto perca a vida durante o processo de extração. Este método consiste na instalação de placas de vidro coletoras instaladas na entrada das colméias, onde a abelha ao retornar para o interior destas, recebe um estímulo elétrico de 415- 420 volts, liberando o veneno na placa coletora.

Os melhores enxames para a produção de apitoxina devem ser bem populosos, com boa postura da rainha e bons produtores de própolis. O teor de umidade e a temperatura do ambiente é diretamente proporcional a quantidade de apitoxina obtida em cada coleta, ou seja, quanto maior a umidade e temperatura, maior será a quantidade de apitoxina obtida. O veneno ejetado pelas abelhas nas placas coletoras deve ser retirado com aproximadamente 5 horas, evitando exposição excessiva deste com o meio

ambiente, protegendo-o de oxidação, contaminação com partículas em suspensão no ar e fragmentos de outras abelhas. Estas medidas são necessárias para que a apitoxina tenha qualidade e possa ser utilizada como matéria prima de medicamentos. Os coletores de veneno, devem ser instalados a cada 10 dias, e cerca de 0,5 a 1,8 gramas de veneno, são obtidos durante o período aproximado de 5 horas. As abelhas ao receberem a descarga elétrica, ferroam o vidro, liberando o veneno. Este tem aspecto líquido e ao tomar contato com o ar se cristaliza. Após a coleta em campo, as placas de vidro são retiradas e transportadas em caixa térmica até o laboratório ou cômodo apropriado, para raspagem da apitoxina em condições assépticas. A apitoxina assim obtida, deve ser armazenada em frascos âmbar, hermeticamente fechado, por um período de até 12 meses em freezer sob temperatura aproximada de -5° . A apitoxina armazenada nas condições citadas acima apresentaram teores de umidade dentro dos parâmetros exigidos pela legislação vigente e atendem aos requisitos mínimos de qualidade conforme Instrução Normativa N° 3 de 19 de janeiro de 2001/Ministério da Agricultura (POP- Extração e manipulação de veneno de abelhas *Apis mellifera*).

A purificação e as frações do veneno contendo componentes bioativos de baixo peso molecular e baixa alergenicidade foram obtidas através da técnica de filtração em gel, ultrafiltração e filtração em troca iônica que separa os componentes da amostra pela diferença de seus tamanhos moleculares. Estas foram utilizadas para obter um perfil cromatográfico representativo da constituição dos venenos e obtenção da fração bioativa. A seguir serão apresentados alguns exemplos, não limitantes, relevantes para a caracterização da invenção.

Breve descrição das Figuras

A Figura 1 mostra o que a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), em sistema de tampão tris-tricina é adequada para a separação de amostras de pequena massa molecular.

A Figura 2 demonstra a técnica de filtração em gel que separa os componentes da amostra pela diferença de seus tamanhos moleculares foi

utilizada para obter um perfil cromatográfico representativo da constituição dos venenos.

A Figura 3 mostra a técnica ultrafiltração que utiliza o princípio de separação de componentes de uma solução pelo seu tamanho. Membranas de filtro de celulose são produzidas com poros com tamanhos nominalmente especificados para permitir a passagem de componentes com tamanho abaixo do valor nominal do poro.

A Figura 4 mostra a técnica filtração em troca iônica separa os componentes de uma solução utilizando as diferenças de carga dos componentes num determinado pH.

A Figura 5 mostra as frações obtidas no processo de filtração em gel que foram submetidas a eletroforese em poliacrilamida contendo SDS. Através do uso de padrões de peso molecular os pesos das frações foram calculados e a pureza das mesmas poderá ser avaliada. Além da pureza, este resultado foi utilizado para aferir a eficiência da purificação da apitoxina.

A Figura 6 mostra a avaliação do efeito induzido pela fração bioativa da apitoxina sobre a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído.. A fração (2 - 6 mg/Kg) ou o veículo foram administrados 30 min antes da injeção de formaldeído. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $P < 0,05$ ($n=6$).

A Figura 7 mostra a avaliação do efeito induzido pela fração (FA) sobre a resposta nociceptiva induzida pelo calor. A fração (2 - 6 mg/Kg), a morfina (10 mg/kg) ou o veículo foram administrados 30 min antes da injeção de formaldeído. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $P < 0,05$ ($n=6$).

A Figura 8 mostra a avaliação do efeito induzido pelo veneno (VA) e pela fração (FA) sobre o tempo de permanência na haste girante. a coordenação motora no modelo da haste girante. O veneno (6 mg/Kg), a fração (6 mg/Kg), o fenobarbital (50 mg/kg) ou o veículo foram administrados 30 min antes da avaliação na haste girante. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $P < 0,05$ ($n=6$).

A Figura 9 mostra o efeito do tratamento tópico com pomada a base de fração bioativa da apitoxina sobre o edema de pata induzido pela injeção subcutânea de formaldeído 0,92% (20 ul) no dorso da pata direita posterior de camundongos anestesiados por cetamina/xilazina.

5 A Figura 10 mostra a média dos valores obtidos em triplicata de plasma para cada animal tratado com o veneno bruto e sugere que a IL-10 foi capaz de modular a resposta inflamatória gerada na pata dos animais do grupo tratado, observado nas barras pretas e pelas barras hachuradas respectivamente. Esses dados são concordantes com os achados histo-patológicos observados
10 nas patas dos animais, visto que no grupo tratado, as patas apresentavam edema significativamente menor, quando comparado ao edema de pata dos animais sem administração de venenodeteção de interleucina 10 (IL-10) e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) avaliada através de densidade ótica em 495 nm para amostras de plasma, em triplicata, de animais tratados com
15 fração bioativa da apitoxina na dose de 2-6 mg/kg e para o grupo controle no qual se administrou apenas o veículo na pata dos animais.

A Figura 11 mostra que a detecção de IL-10 no grupo tratado apenas com veículo foi significativamente menor ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo tratado com veneno, principalmente na diluição de 1:50.

20 As Figuras 12 e 13 apresentam os níveis de TNF-alfa detectado no plasma do grupo tratado com veneno e quando comparamos esses dados com os obtidos para o grupo tratado, observamos que os níveis de TNF-alfa são significativamente menor ($p < 0,001$), em comparação aos dados obtidos para o grupo controle (figura 13) nas duas diluições.

25 Esses dados demonstram que a IL-10, uma citocina que apresenta papel crucial na imunomodulação da resposta inflamatória parece ser capaz de modular a produção sistêmica de TNF-alfa e muito provavelmente a produção *in situ*, também, haja visto a diferença morfológica dos edemas observados nas patas dos animais tratados e não tratados com o veneno. O veículo
30 administrado se configura como um estímulo exógeno, capaz de gerar resposta celular, observado pelo recrutamento celular no edema de pata após a injeção do veículo, bem como gerar resposta humoral, observado pelos níveis

elevados de TNF-alfa no plasma dos animais desse grupo. Em conjunto, esses dados demonstram que a fração bioativa da apitoxina é promissor na contenção da resposta inflamatória exacerbada.

REIVINDICAÇÕES

- 1- PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTO ELABORADO COM COMPONENTES ISOLADOS DE APITOXINA DE ABELHAS ***Apis mellifera*** caracterizado por compreender as seguintes etapas:
 - 5 A - extração de apitoxina em campo,
 - B - obtenção de componentes bioativos de baixa alergenicidade em escala industrial.
 - C - incorporação em formas farmacêuticas semi-sólida ou líquida.
- 10 2- BIOPRODUTOS caracterizados por serem obtidos a partir de fração bioativa da apitoxina isoladas de abelhas ***Apis mellifera*** com propriedades analgésicas e antiinflamatórias
- 3- BIOPRODUTOS de acordo com a reivindicação 2, caracterizados por conterem a resposta inflamatória exacerbada.
- 15 4- BIOPRODUTOS de acordo com a reivindicações 2 e 3, caracterizados por apresentarem capacidade de imunomodulação da resposta inflamatória.
- 5- BIOPRODUTOS de acordo com a reivindicação 2, caracterizados por apresentarem baixa alergenicidade.
- 20 6- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA caracterizada por compreender fração bioativa da apitoxina isoladas de abelhas ***Apis mellifera*** e pelo menos um carreador farmacêutica e fisiologicamente aceitável.
COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA caracterizada por compreender incorporação em formas farmacêuticas semi-sólidas ou líquidas.
- 25 7- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por compreender incorporação preferencialmente em pomada, creme ou géis.
- 30 8- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com as reivindicações 2 a 7, caracterizada por ser administrada pelas vias: tópica, intradérmica, intramuscular, intravenosa, subcutânea, oral ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados.

- 9- USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com as reivindicações 2 a 8, caracterizado por ser na preparação de um medicamento para o tratamento de distúrbios inflamatórios e dolorosos.
- 5 10- USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com as reivindicações 2 a 8, caracterizado por ser na preparação de um medicamento preferencialmente para o tratamento de artrite reumatóide.

Figuras

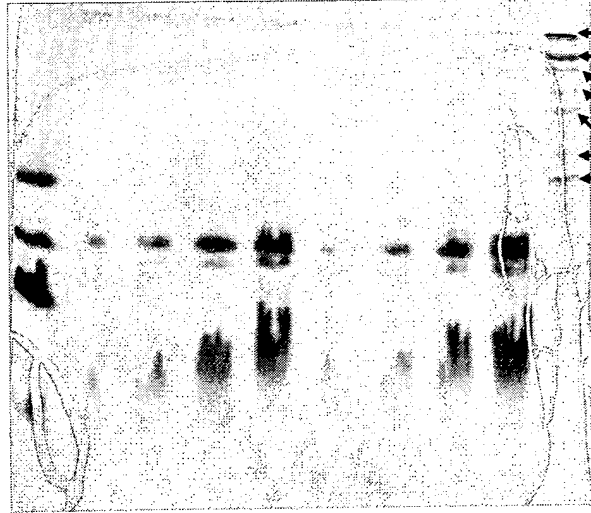


Figura 1

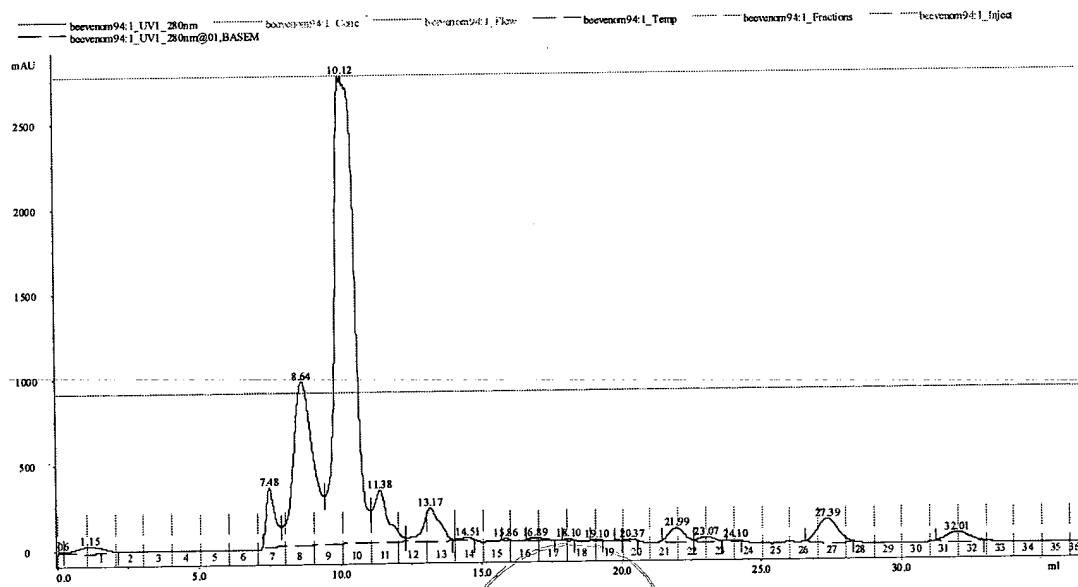


Figura 2

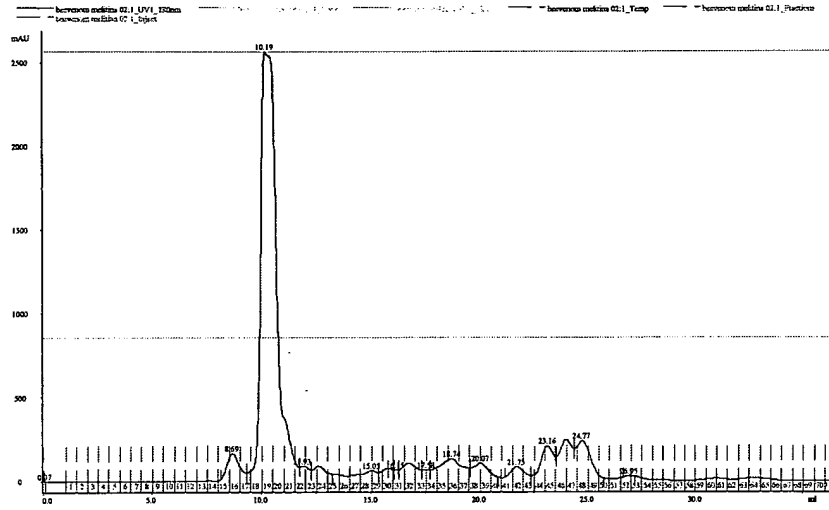
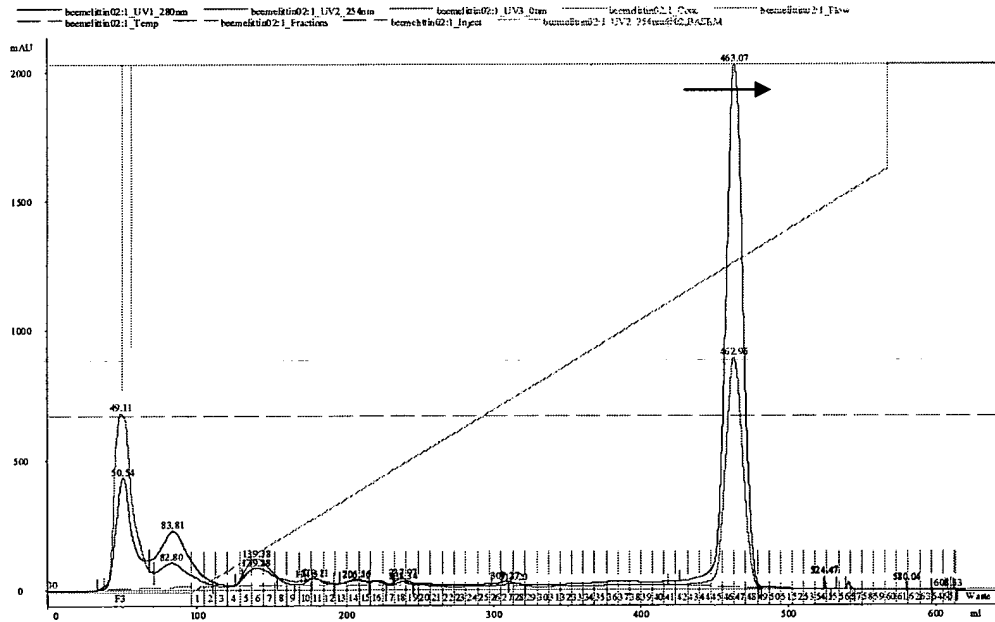


Figura 3



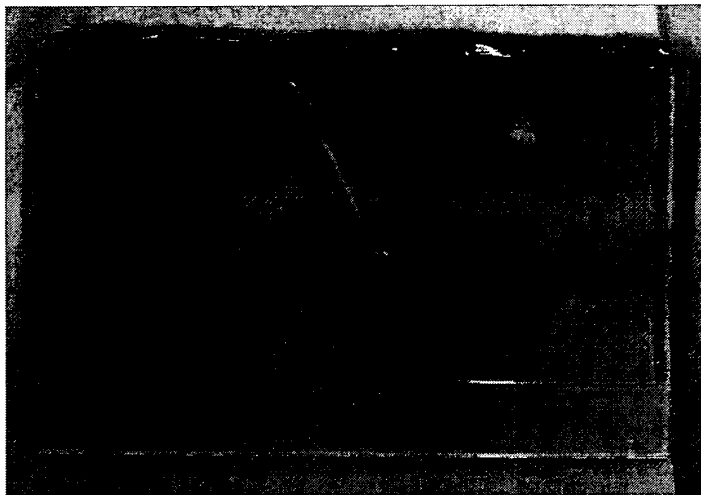


Figura 5

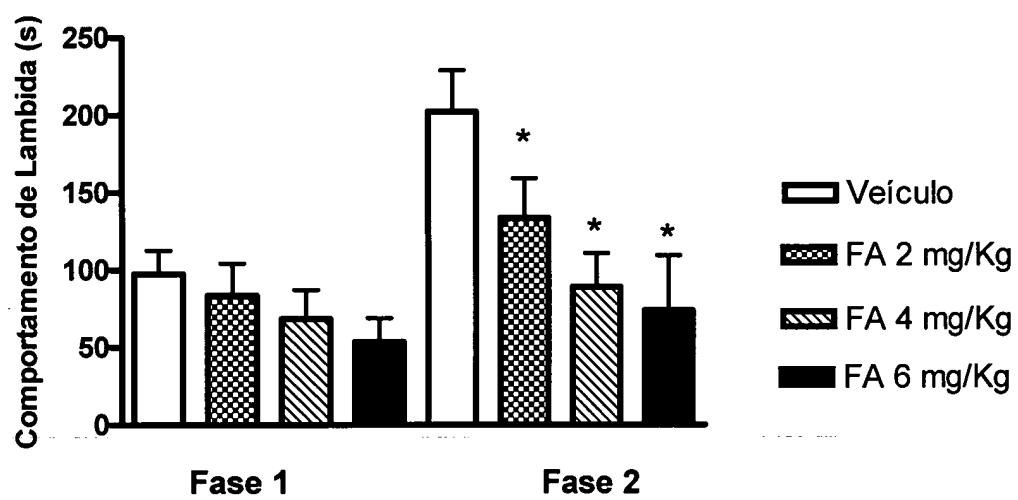
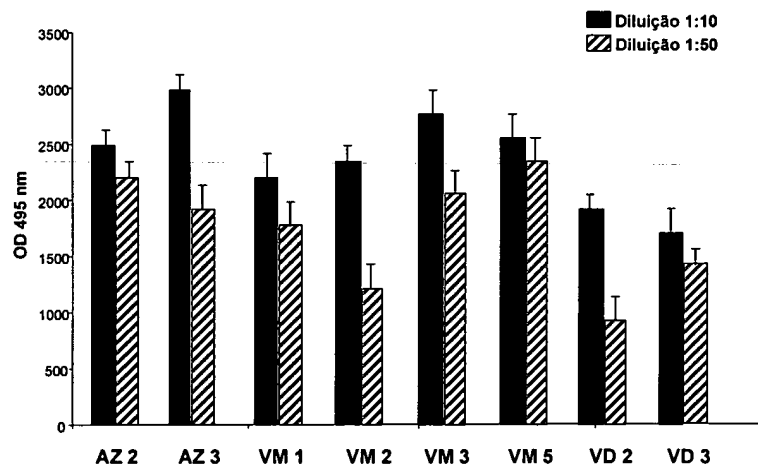
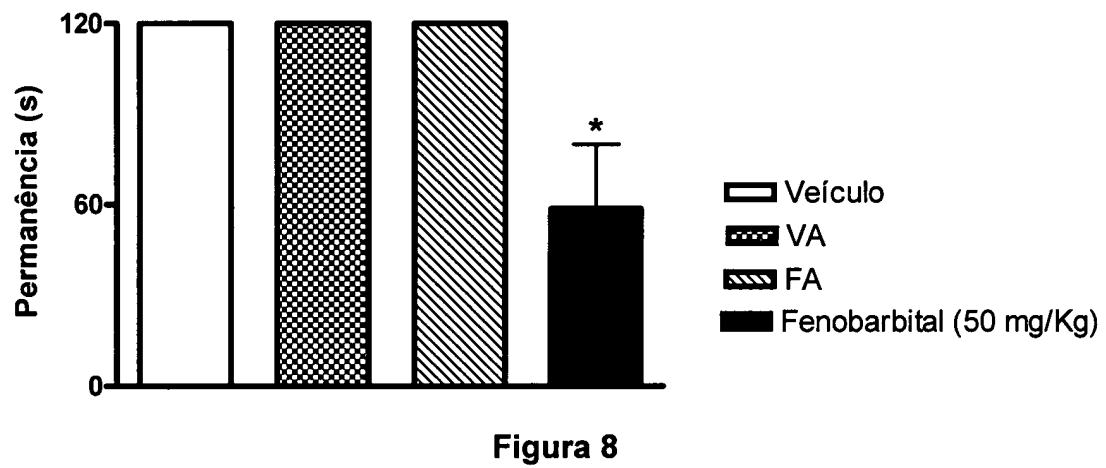
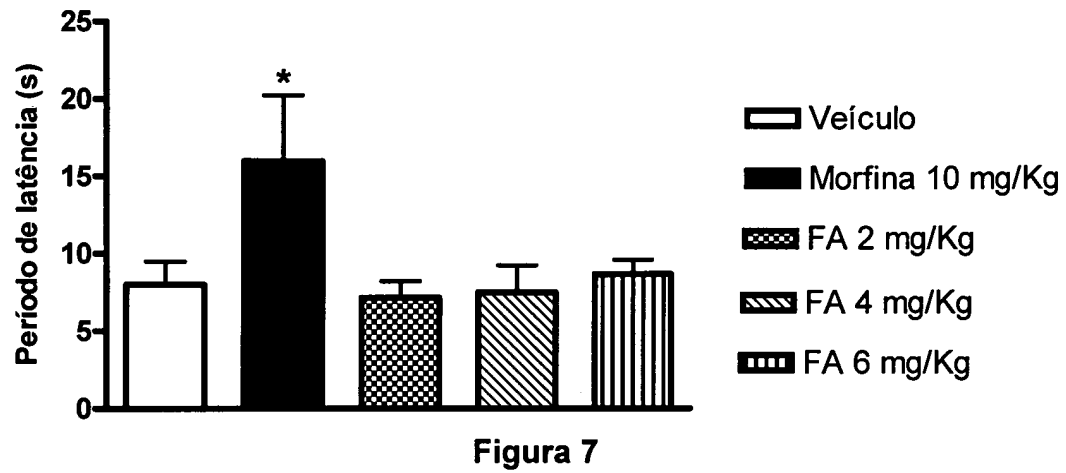


Figura 6



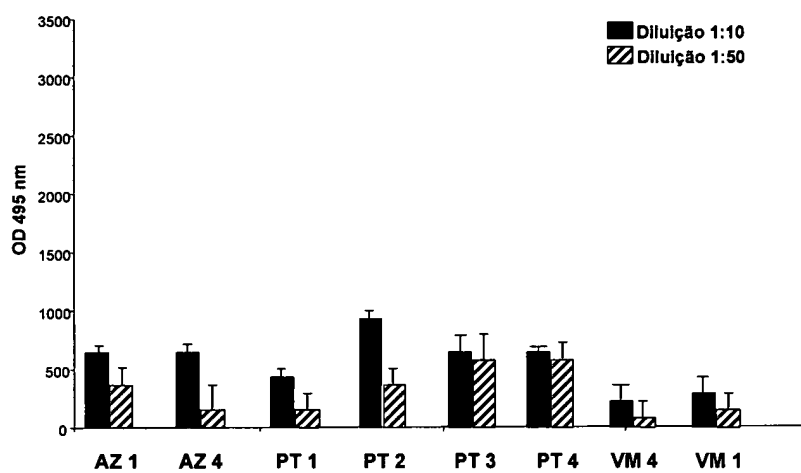


Figura 10

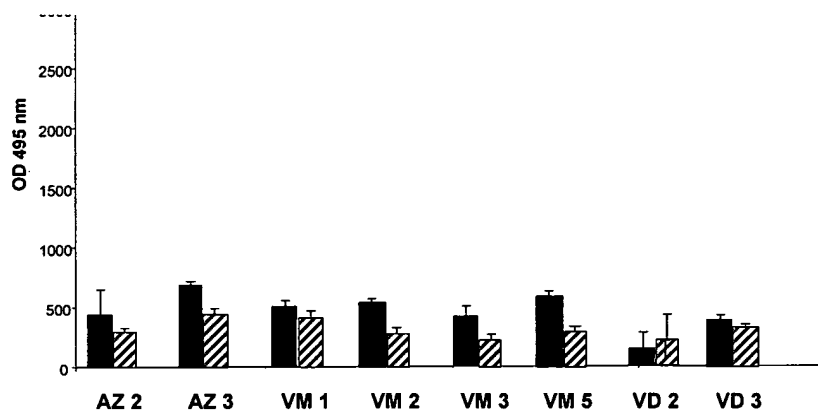


Figura 11

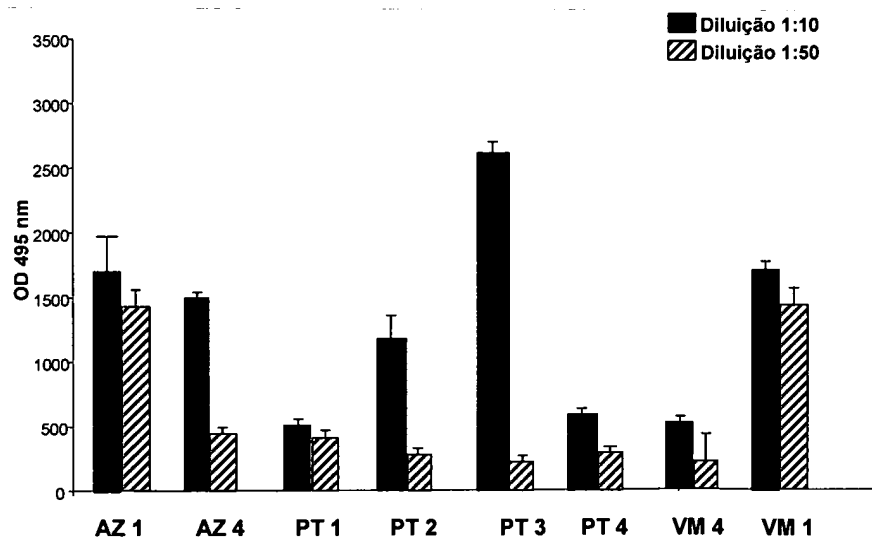


Figura 12

20904036-6

RESUMO

**“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS ELABORADOS COM
5 COMPONENTES ISOLADOS DE APITOXINA DE ABELHAS *Apis mellifera*,
COMPOSIÇÃO E USO”.**

A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de matéria
prima e de componentes isolados de apitoxina de abelhas *Apis mellifera* de
baixa alergenicidade em escala industrial, com propriedades analgésicas e
10 antiinflamatórias para ser incorporado em formas farmacêuticas semi-sólidas
ou líquidas, preferencialmente pomada, creme ou géis. Mais particularmente a
invenção ora descrita pode ser usada no tratamento de artrite reumatóide e de
outros distúrbios inflamatórios e dolorosos.