

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 594**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 9/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2008 E 08865110 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2222337**

54 Título: **Alérgenos y alergoides procedentes de veneno de abeja**

30 Prioridad:

21.12.2007 IT MI20072421

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.02.2016

73 Titular/es:

**LOFARMA S.P.A. (100.0%)
VIALE CASSALA, 40
20143 MILANO, IT**

72 Inventor/es:

**MISTRELLO, GIOVANNI;
RONCAROLO, DANIELA;
ZANONI, DARIO y
FALAGIANI, PAOLO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 561 594 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Alérgenos y alergoides procedentes de veneno de abeja

- 5 La presente invención se refiere a alérgenos purificados a partir de veneno de abeja, y a alergoides derivados de los mismos, para la desensibilización (inmunoterapia) de sujetos afectados por una alergia específica.

10 La incidencia de reacciones sistémicas a picaduras de himenópteros en la población general es de entre el 0,4 y el 5%. Cada año se registran al menos 40 muertes en los EE.UU., 10 en Alemania y 5 en Gran Bretaña. Algunas categorías particularmente expuestas, tales como apicultores y sus familias, residentes de áreas rurales y aquellos que, o bien por trabajo o bien en la realización de aficiones, participan en actividades al aire libre, se ven afectados con mayor frecuencia.

15 Entre los apicultores, la prevalencia de sensibilización es alta, entre el 15 y el 40%, y el riesgo de reacción alérgica es con frecuencia inversamente proporcional al número de picaduras recibidas al año. Se ha mostrado que los sujetos con un número de picaduras al año de más de 200 no tienen reacciones (se desarrolla una clase de desensibilización "espontánea"), mientras que aquellos con menos de 25 picaduras al año muestran una incidencia de reacción sistémica del 45%. Las picaduras que se producen con mayor frecuencia son aquellas provocadas por abejas (*Apis mellifera*) y avispa (*Vespula germanica*); los síntomas sistémicos generales consecuentes son variables e incluyen sofocos faciales; urticaria, picor, dificultad para tragar, dificultad para respirar (broncoespasmo), mareo, sensación de desmayarse, sudoración, palidez, hinchazón (edema) que afecta a la cara, ojos, lengua y vías respiratorias, y pueden presentarse con grados variables de intensidad y con diferentes combinaciones de síntomas. La hinchazón y el picor son síntomas significativos, especialmente si se presentan de manera temprana (en el plazo de unos pocos minutos), ya que pueden representar un signo de comienzo inminente de una reacción de una determinada intensidad.

30 La intensidad de los síntomas también depende del número de picaduras que recibe el sujeto; en el caso de múltiples picaduras (del orden de varias decenas) la dosis de veneno inyectada puede ser incluso letal, debido a los efectos tóxicos ejercidos por los diversos componentes presentes en el veneno. Se ha calculado que la DL₅₀, es decir, la dosis requerida para matar a la mitad de una población, es de 2,8 mg de veneno por kg de peso corporal de la persona picada, para un hombre adulto, y por tanto 600 picaduras podrían ser mortales para una persona. Afortunadamente, la probabilidad de ser víctima de picaduras múltiples tan numerosas es poco frecuente. Por otro lado, el riesgo representado por el choque anafiláctico, un acontecimiento que puede conducir a la muerte de un sujeto alérgico como consecuencia incluso de tan sólo una única picadura, es mucho más significativa y preocupante.

40 En particular, las abejas sólo pican una vez, porque su aguijón, que tiene pequeños dientes en el extremo, se rompe del cuerpo cuando la abeja intenta retirarlo. Por tanto el insecto, que se ha alejado volando, muere, dejando también los sacos de veneno que contienen el veneno en el sitio de la picadura. Sólo las hembras pueden picar, porque, al contrario que los machos, tienen aguijones.

45 Con mucha frecuencia, las víctimas de tales picaduras no pueden identificar al insecto que les picó. En tales situaciones, la disponibilidad de herramientas de diagnóstico adecuadas es un prerrequisito necesario y esencial para identificar la especie de insecto responsable de la reacción alérgica. Actualmente, la alergia a las picaduras de abeja puede diagnosticarse o bien mediante el uso de pruebas de punción epidérmica *in vivo*, o bien mediante la determinación *in vitro* de niveles en suero de anticuerpos de IgE específicos. Ambas pruebas consideran, a su vez, el uso de preparaciones acuosas especiales (extractos) obtenidas a partir del propio veneno. En individuos con alergia confirmada, la única manera de evitar el riesgo de reacción anafiláctica, que puede resultar mortal si les vuelven a picar insectos de la misma especie, es la terapia de desensibilización o inmunoterapia específica (SIT). SIT sigue siendo la única forma de terapia etiológica para patologías alérgicas, es decir que puede interferir con los mecanismos subyacentes a las mismas y, al mismo tiempo, conferir al paciente un tipo específico de protección inmunológica, cuando se repite durante un determinado número de años (al menos tres). SIT se basa en la administración de dosis crecientes de los extractos anteriormente mencionados, hasta que se alcanza la denominada dosis de mantenimiento. Desgraciadamente, aunque SIT es un método terapéuticamente eficaz para la alergia al veneno de abeja, no carece de riesgos y efectos secundarios con un grado de intensidad tal como para obligar al sujeto a interrumpir el tratamiento. Por ejemplo, se han observado reacciones no deseadas de un determinado grado en el 15% de los pacientes que se han sometido a dosis crecientes de veneno de abeja. Las causas que dan lugar a tales reacciones no deseadas todavía no están claras. En el pasado, se han realizado numerosos estudios con el fin de caracterizar la composición del veneno de abeja, en un intento por entender los posibles usos de este fenómeno.

65 Por tanto se ha observado que el veneno anteriormente mencionado consiste en una mezcla compleja de glicoproteínas, muchas de las cuales presentan actividad enzimática con acción digestiva frente a tejidos, y otros componentes (aminas vasoactivas, polipéptidos, etc.) que presentan efectos farmacológicos intrínsecos. Sin embargo, en sujetos alérgicos, la respuesta de IgE se dirige de manera preferente únicamente a algunas de las glicoproteínas anteriormente mencionadas. De estas, la fosfolipasa A2 (PLA2) es el alérgeno más significativo desde

el punto de vista clínico, dado que se reconoce por IgE sérica en casi todos los individuos alérgicos. Aunque menos importantes que la fosfolipasa, se han indicado otros alérgenos, tales como hialuronidasa y fosfatasa ácida, entre los componentes de alto peso molecular. A la inversa, con la excepción de melitina, los componentes de bajo peso molecular (≤ 3 kDa tales como apamina, dopamina, el inhibidor de proteasa, etc.) no pueden unirse a IgE y por tanto se consideran clínicamente menos relevantes, o incluso completamente irrelevantes. Las diversas enzimas y componentes vasoactivos en el veneno inducen inflamación localizada en la zona de la picadura. Una reacción "normal" se representa por una zona hinchada y enrojecida de la piel de aproximadamente 10 cm, que puede permanecer de esa manera durante varios días. Por convenio, las reacciones sistémicas a picaduras de insectos se clasifican en 4 grados, según Mueller:

- Grado I. Urticaria generalizada, picor, malestar, ansiedad.

- Grado II. Varias de las reacciones anteriormente mencionadas más dos o más de las siguientes: angioedema (grado II aunque este síntoma se presente solo), sensación de opresión en el pecho, náuseas, vómitos, diarrea, dolores abdominales, mareo.

- Grado III. Varios de los síntomas anteriormente mencionados, más dos o más de los siguientes: disnea, falta de aliento, estridor pulmonar, disfagia, debilidad, afonía, confusión mental, sensación de muerte inminente.

- Grado IV. Varios de los síntomas anteriormente mencionados, más dos o más de los siguientes: hipotensión, colapso cardiocirculatorio, pérdida de conocimiento, incontinencia urinaria y fecal, cianosis.

Durante aproximadamente 50 años, se ha usado un extracto preparado a partir de cuerpos completos para el tratamiento de alergias a las picaduras de abeja. Alrededor de finales de la década de 1970, una serie de estudios controlados demostraron que los extractos preparados a partir de sacos de veneno, a una dosis de mantenimiento de 100 μ g de proteína de veneno, podían conferir un efecto protector en más del 80% de los pacientes, y en cualquier caso era más eficaz que SIT basada en el uso de extracto de cuerpos completos. Más recientemente, se ha observado que tratar a pacientes afectados por alergias a las picaduras de abeja con péptidos "reactivos frente a linfocitos T" derivados de fosfolipasa puede inducir los mismos efectos (anergia específica de epítipo y aumento de la razón de anticuerpos de IgG/IgE) que puede observarse en pacientes tratados satisfactoriamente con SIT convencional. Esta observación, junto con varias otras referentes a otras alergias específicas, parece demostrar que los alérgenos principales anteriormente mencionados, producidos predominantemente en forma recombinante, pueden constituir posibles candidatos para SIT.

Rueff *et al*, "Specific immunotherapy in honeybee venom allergy: a comparative study using aqueous and aluminium hydroxide adsorbed preparations", ALLERGY, junio de 2004, páginas 589-595, dan a conocer veneno de abeja del que se retiran irritantes de bajo peso molecular, pero no dan a conocer ni sugieren que esta preparación esté libre de melitina.

Un alcance de la presente invención es proporcionar una preparación para la desensibilización frente a veneno de abeja, que presenta una alta tolerancia y en particular, minimizando los posibles efectos no deseados, sin reducir sin embargo el efecto desensibilizante de la terapia de alérgenos tradicional.

El objeto de la presente invención se refiere a una preparación obtenida partiendo de veneno de abeja libre de melitina. Esta invención se basa en los resultados de un estudio realizado por los presentes inventores, en el que se ha observado que, en contra de las creencias actuales, la melitina no tiene ningún efecto específico como alérgeno, pero sin embargo puede actuar potencialmente como agente sensibilizante tras un tratamiento prolongado contra la alergia con veneno de abeja completo. La preparación de la invención, que consiste principalmente en componentes de veneno de abeja de peso molecular superior, principalmente fosfolipasa A2 (con mucha diferencia el alérgeno clínicamente más significativo) e hialuronidasa, puede por tanto constituir una vacuna más segura para usarse para SIT en pacientes alérgicos al veneno de abeja, o como agente de diagnóstico.

Puede prepararse veneno de abeja libre de melitina en forma acuosa, tal como se describe a continuación. Para su uso en SIT, la preparación que constituye el objeto de la invención puede administrarse por vía parenteral, vía nasal, vía sublingual, vía oromucosa, vía oral o vía bronquial, por medio de un dispositivo de administración apropiado. La preparación de la invención también puede obtenerse en forma liofilizada y después puede reconstituirse y administrarse tal como se indica para la forma acuosa, o incorporarse en sistemas de liberación apropiados (por ejemplo liposomas) o como polvo incorporado en un excipiente inerte, por ejemplo lactosa, para administrarse por vía nasal o vía bronquial, por medio de un dispositivo de administración apropiado, o prepararse como comprimidos, posiblemente para disolución rápida, para administración sublingual/oromucosa, o cápsulas, que se vuelven opcionalmente gastrorresistentes por medio de un procedimiento adecuado, para administración oral.

La preparación de la invención puede administrarse por vía parenteral, una vez absorbida o precipitada conjuntamente con sustancias tales como L-tirosina, hidróxido de aluminio o fosfato de calcio, o con otras matrices de retardo que fomentan la liberación lenta del principio activo a partir del sitio de inoculación.

La preparación de la invención también puede obtenerse en forma de una suspensión en aceite, jarabe, elixir, con la adición opcional de excipientes o sustancias para darle un sabor agradable para administración sublingual, oromucosa u oral.

5 La preparación de la invención puede asociarse o mezclarse de manera similar con sustancias que se sabe que expresan actividad adyuvante de tipo Th1 o Treg, tales como por ejemplo CpG, derivada de bacterias, micobacterias, micoplasmas, *Neisseria*, virus o protozoos, incluyendo CpG no metilada, lipoproteínas o lipopéptidos triacilados, polisacáridos y derivados de los mismos, también de origen sintético, sustancias sintetizadas tales como imiquimod, resiquimod, poli(I:C).

10 La composición de la invención puede contener generalmente diversos excipientes y/o portadores adaptados para el tipo de administración elegido, según el conocimiento del que disponen los expertos en la técnica y tal como se notifica por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. Co., N.Y., EE.UU., 17ª edición, 1985.

15 En todas las formulaciones farmacéuticas anteriores, la preparación de la invención puede estar presente en cantidades comprendidas entre 0,05 µg (dosis mínima) y 50 µg (dosis de mantenimiento), según las dosis típicas para inmunoterapia específica.

20 La preparación de veneno de abeja libre de melitina se logra por medio del método descrito en el presente documento que considera la diálisis de veneno de abeja nativo frente a solución salina isotónica, usando una membrana con un punto de corte de 10 kDa, durante un periodo de tiempo suficiente como para agotar la melitina del veneno. Generalmente se recomienda un tiempo de diálisis de al menos 48 horas, más preferiblemente de aproximadamente 72 horas. La diálisis se realizará preferiblemente a una temperatura comprendida entre 0°C y 10°C.

25 En cualquier caso, la eliminación de la melitina de la preparación puede lograrse por medio de otros métodos, por ejemplo mediante filtración en gel o cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales anti-melitina.

30 A modo de ejemplo no limitativo, ahora se describirá la presente invención por medio del siguiente ejemplo de preparación y pruebas experimentales, demostrando la eficacia de la preparación de la invención.

Breve descripción de las figuras

35 Figura 1: Inmunotransferencia con suero de pacientes alérgicos al veneno de abeja;

Figura 2: Perfil de SDS-PAGE: Efecto de la duración de diálisis con un punto de corte de 10 kDa sobre la eliminación de melitina del veneno de abeja;

40 Figura 3: Determinación de la reactividad frente a IgE de veneno de abeja sometido a diálisis con un punto de corte de 10 kDa, y el mismo veneno modificado con cianato de potasio 0,005 M y 0,5 M, por medio de inhibición de EAST;

45 Figura 4: Determinación de los niveles de IgG específica en una combinación de suero de ratones inmunizados con veneno de abeja, sometidos a diálisis con un punto de corte de 10 kDa, y modificados;

Figura 5: ELISA directo; comparación de la reactividad frente a IgE de sueros de pacientes alérgicos al veneno de abeja frente a veneno sometido a diálisis con un punto de corte de 3,5 kDa o 10 kDa;

50 Figura 6: Perfil de SDS-PAGE de veneno de abeja nativo y modificado, sometido a diálisis con un punto de corte de 10 kDa.

Ejemplo 1. PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN PARA UN VENENO DE ABEJA LIBRE DE MELITINA.

55 Se disuelven 50 mg de veneno de abeja liofilizado (Latoxan, Valence, Francia) en 10 ml de solución salina isotónica (NaCl al 0,9% en agua destilada) y se dejan agitar durante diez minutos aproximadamente. Posteriormente se hace pasar la disolución a través de un filtro de 0,45 µm (Puradisc 25 AS, Whatman, Biomap, Agrate Brianza, Milán, Italia) y se divide en dos alícuotas de 25 ml cada una, después se somete a diálisis, una alícuota con una membrana con un punto de corte de 3,5 kDa, y la otra con un punto de corte de 10 kDa (Spectra/Por 7, Spectrumlabs, Prodotti Gianni, Italia). Se realiza la diálisis de manera exhaustiva frente a solución salina isotónica a 4°C, con ayuda de un agitador magnético, al tiempo que se monitoriza el progreso de la misma por medio de SDS-PAGE para determinar la desaparición de la banda atribuible a melitina, para la muestra sometida a diálisis con la membrana que tiene un punto de corte de 10 kDa. Dicha monitorización puede incluso lograrse usando otros métodos, tales como por ejemplo, espectrometría de masas. La diálisis frente a solución salina isotónica durante 72 horas puede ser suficiente, tal como se demuestra mediante el perfil de SDS-PAGE (figura 2).

65 Se realizó la comparación entre la reactividad de unión a IgE de veneno de abeja, sometido a diálisis usando una

membrana con un punto de corte de 3,5 kDa, en comparación con un punto de corte de 10 kDa, es decir con melitina agotada, usando tanto un método *in vitro* (ELISA directo) como un método *in vivo* (punción), según los procedimientos descritos a continuación.

5 SDS-PAGE (método)

Se analizan cantidades iguales (5 µg) de veneno de abeja de 3,5 kDa (tiempo 0) y muestras del mismo sometido a diálisis con un punto de corte de 10 kDa (tiempos 24, 48 y 72 horas) por medio de electroforesis sobre geles de poliacrilamida al 10% (geles pre-cast Nupage Bis-Tris, Novex, Prodotti Gianni, Milán, Italia) tal como se describió anteriormente (Asero R., Mistrello G. *et al.* Int. Arch. Allergy Immunol. 2007; 144, 57-63). Se realiza la electroforesis en el dispositivo específico (Mighty Small II, Hoefer, Milán, Italia) a 180 mA durante 1 hora. Se tiñen los componentes así resueltos con azul brillante de Coomassie (kit de tinción de azul coloidal, Amersham, Milán, Italia) y posteriormente se elimina la tinción en agua. Los resultados mostrados en la figura 2 indican que la diálisis durante 72 horas permite la eliminación más o menos completa de la melitina de la muestra.

15 ELISA directo

Se usaron treinta sueros, seleccionados aleatoriamente de individuos que, según REAST (el método se describe a continuación), eran positivos frente a veneno de abeja, en la comparación entre veneno de abeja sometido a diálisis con puntos de corte de 3,5 kDa o de 10 kDa. Para ello, se recubrieron los pocillos en placas de poliestireno con 0,1 µg (dosificación según BioRad) de veneno de abeja sometido a diálisis usando una membrana con un punto de corte de 10 kDa, o 0,1 µg de veneno de abeja sometido a diálisis usando una membrana con un punto de corte de 3,5 kDa, en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6, mediante incubación a 4°C durante 16 horas. Se lavaron los pocillos usando disolución de lavado (tampón fosfato 60 mM pH 6,5 que contenía Tween-20 al 0,05%) y se bloquearon los sitios libres incubando con 200 µl de disolución de diluyente (BSA al 2%, tiomersal al 0,01% en tampón fosfato 150 mM pH 7,4) durante una hora a temperatura ambiente. Se añaden volúmenes iguales (100 µl) de cada uno de los 20 sueros humanos seleccionados aleatoriamente a cada pocillo y después se incuban a 25°C durante 2 horas. Tras lavar tres veces, se añade antisuero de conejo conjugado con peroxidasa anti-IgE humana (Biospacific, Emeryville, CA, EE.UU.), diluido 1:1500 en disolución de diluyente, y se incuba a 25°C durante 1,5 horas. Tras lavar tres veces, se obtiene desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubando durante 15 minutos a 25°C. Se extingue la reacción mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N, y se evalúan los resultados mediante espectrofotometría a 450 nm (Shimadzu, Mod. UV 1700, Milán, Italia).

35 Los resultados de los experimentos ilustrados en la figura 5 muestran que la muestra de veneno de abeja sometido a diálisis usando una membrana con un punto de corte de 10 kDa conserva, o incluso muestra una mejora de, la actividad de unión a IgE, lo que sugiere que la contribución de melitina hacia la actividad de unión a IgE global de veneno de abeja es despreciable.

40 Prueba de punción epidérmica con pacientes alérgicos con veneno de abeja sometido a diálisis con un punto de corte de 3,5 kDa y 10 kDa

Se sometieron ocho sujetos con una historia clínica de reacción alérgica al veneno de abeja, y dos sujetos normales (control negativo), a pruebas de punción epidérmica, y se compararon las dos disoluciones de veneno (sometidas a diálisis con un punto de corte de 3,5 kDa o 10 kDa), anteriormente diluidas 1/50 con diluyente de punción (NaCl al 0,68%, NaHCO₃ al 0,275%, glicerol al 50%, fenol al 0,4%). Para ello, se coloca una gota de disolución sometida a diálisis con un punto de corte de 3,5 kDa sobre la piel de un antebrazo antes de realizar la punción en la zona correspondiente a la gota con una aguja desechable especial, sujeta en perpendicular a la superficie de la piel. Después se repite la misma operación sobre la piel del otro antebrazo, tras colocar una gota de disolución sometida a diálisis con un punto de corte de 10 kDa. Se usa una disolución de histamina (10 mg/ml) como control positivo y se usa disolución de diluyente como control negativo. Para que una reacción se considere positiva, las dimensiones del habón (roncha) deben ser 3 mm mayores que el provocado por la disolución de diluyente. En promedio, para esta disolución, la respuesta cutánea fue de aproximadamente 1 mm; en el caso de histamina (control positivo), las dimensiones promedio del habón fueron de 12 mm.

55 Se inspecciona la zona de piel afectada tras 15-20 minutos, y en el caso de una reacción de habón, se traza el diámetro del mismo usando un rotulador marcador. Posteriormente se cubre la superficie de la piel con una hoja de papel adhesivo, transfiriendo así el contorno del habón sobre la misma. Después se mide el habón sumando el tamaño del diámetro mayor y el del diámetro menor y dividiendo entre dos.

60 En la tabla 1 se muestran los resultados. Estos datos también confirman que la reactividad alérgica *in vivo* del veneno de abeja libre de melitina es totalmente comparable a la expresada por veneno de abeja que contiene melitina.

65 Tabla 1: Prueba de punción epidérmica en pacientes alérgicos a veneno de abeja con muestras de 3,5 kDa y 10 kDa

Paciente	Veneno de abeja sometido a diálisis con un punto de corte de 3,5 kDa	Veneno de abeja sometido a diálisis con un punto de corte de 10 kDa
	Diámetro medio de habón (mm)*	Diámetro medio de habón (mm)*
1	5,8	5,7
2	4,3	4,8
3	5,2	5,4
4	6,2	5,9
5	4,9	5,2
6	5,4	5,0
7	4,2	4,7
8	4,8	5,6
Media	5,10 ± 0,69	5,28 ± 0,43

Los dos resultados anteriores (ELISA directo y prueba de punción epidérmica) sugieren que la contribución de melitina a la actividad de unión a IgE, tal como se determina mediante métodos tanto *in vitro* como *in vivo*, es totalmente despreciable.

5

Prueba para evaluar la significación alérgica de componentes del veneno de abeja

Con el fin de verificar la significación clínica efectiva de los diversos alérgenos presentes en el veneno de abeja, se realizó una serie de pruebas, evaluando la respuesta de IgE específica con respecto a los alérgenos individuales fácilmente disponibles en el mercado, a un alto nivel de pureza. Los alérgenos en los que se centró la atención son melitina, fosfolipasa A2 e hialuronidasa.

10

Para las pruebas anteriormente mencionadas, se sometieron 98 sueros de pacientes afectados por alergia al veneno de abeja, identificados basándose en una prueba de punción epidérmica (SPT) positiva, a análisis mediante REAST según el método anteriormente descrito (Falagiani P, Mistrello G *et al.* Allergology International 1999,48:199-20), con el fin de evaluar la presencia de IgE específicas frente a veneno de abeja completo, fosfolipasa y melitina en el suero.

15

El análisis REAST considera el uso de alérgenos conjugados con biotina según el procedimiento descrito a continuación.

20

Preparación de los alérgenos biotinilados

Se sometieron a diálisis alícuotas de 1 mg de veneno de abeja completo, fosfolipasa y melitina (Sigma, Milán, Italia) frente a NaHCO₃ 0,1 M pH 8,4 durante 16 horas a 4°C, usando una membrana de diálisis con un punto de corte de 3,5 kDa. Por otro lado, se preparó una disolución de N-hidroxi-succinimidil-biotina (1 mg/ml) en dimetilsulfóxido (DMSO).

25

Se añaden alícuotas de 454 ml de esta disolución a la proteína que va a biotinilarse y se dejan incubar durante 4 horas a temperatura ambiente, con agitación constante. Al completarse, se elimina la biotina no unida mediante diálisis frente a tampón fosfato.

30

Se determina la dilución de trabajo de los alérgenos purificados realizando una variante de la prueba REAST, tal como se describe a continuación. Se incuban alícuotas 50 µl de suero combinado de pacientes alérgicos al veneno de abeja (combinación positiva) o sujetos normales (combinación negativa) durante 1 hora en los pocillos de placas de poliestireno, sobre los que se había adsorbido previamente suero anti-IgE humana (0,3 µg/pocillo; Bethyl, Prodotti Gianni, Milán, Italia). Tras tres lavados con disolución de lavado (tampón fosfato 60 mM pH 6,5 que contenía Tween-20 al 0,05%), se añaden 100 µl de diluciones en serie (desde 1:100 hasta 1:6400) de los diversos alérgenos biotinilados a los pocillos. Al completarse una incubación de una hora, y tres lavados con tampón de lavado, se realiza una incubación con 100 µl de una disolución (0,1 µg/ml) de peroxidasa conjugada con estreptavidina (Pierce, Milán, Italia). Tras lavar tres veces, se obtiene desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubando durante 15 minutos a 25°C. Se extingue la reacción mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N, y se evalúan los resultados mediante espectrofotometría a 450 nm (lector de microplacas Vmax, Molecular Device, BioSpa, Milán, Italia).

35

40

45

La dilución de trabajo de los diversos alérgenos biotinilados será aquella a la que, en el método REAST descrito a continuación, se proporcione el máximo valor de densidad óptica para la combinación positiva asociado con un valor

de densidad óptica <0,05 UA para la combinación negativa.

REAST (prueba de alergoadsorción enzimática inversa)

5 Se incuban alícuotas iguales (50 µl) de 98 sueros de pacientes alérgicos al veneno de abeja, o un suero con un título de IgE conocido (desde 0,5 hasta 100 kU/l, curva patrón), durante 1 hora en los pocillos de placas de poliestireno, sobre los cuales se había adsorbido previamente suero anti-IgE humana (0,3 µg/pocillo). Tras tres lavados con disolución de lavado (tampón fosfato 60 mM pH 6,5 que contenía Tween-20 al 0,05%), se añaden 100 µl de veneno de abeja biotinilado o fosfolipasa o melitina, a las diluciones determinadas previamente, a los pocillos referentes a
10 los sueros que están sometidos a prueba. Mientras que se añaden 100 µl de suero anti-IgE humana biotinilado a los pocillos pertenecientes a la curva patrón. Al completarse una incubación de una hora, y tres lavados con tampón de lavado, se realiza una incubación con 100 µl de una disolución (0,1 µg/ml) de peroxidasa conjugada con estreptavidina. Tras lavar tres veces, se obtiene desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubando durante 15 minutos a 25°C. Se extingue la reacción
15 mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N, y se evalúan los resultados mediante espectrofotometría a 450 nm. Se determinan los valores (en kU/l) de IgE específicas para los tres alérgenos en los sueros de prueba mediante interpolación de las DO relevantes en la curva patrón.

Inmunotransferencia (IB)

20 Se separan los componentes de veneno de abeja completo, sometidos a diálisis con un punto de corte de 3,5 kDa, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posteriormente se transfieren sobre una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia, según la teoría descrita por Towbin (Towbin J., Staehelin T., Gordon J., (1979): "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350-4354).

25 Se incubaba la membrana durante una hora en TBS-T (TBS, Tween-20 al 0,05%) que contiene leche en polvo al 5% y después durante la noche con los sueros individuales de sujetos alérgicos al veneno de abeja (20 seleccionados de aquellos con un nivel de IgE específica >5 kU/l, clase 3 de REAST o superior), diluidos 1:2 en TBS-T, leche en polvo al 5%. Tras tres lavados con TBS-T, se detectan los anticuerpos unidos a la membrana mediante incubación durante una hora con suero anti-IgE humana conjugado con peroxidasa y, tras lavados adicionales, usando el sistema de detección de quimioluminiscencia con reacción con luminol como sustrato de peroxidasa (ECL, Amersham).

En la figura 1 se muestran los resultados de los experimentos de IB.

35 De manera muy sorprendente, las pruebas anteriormente mencionadas han destacado que la melitina, un péptido libre de azufre que consiste en 26 aminoácidos, que representa aproximadamente el 50% de la masa en seco del veneno de abeja, pero presente en todos los extractos usados para fines terapéuticos hasta ahora, en contra de la idea común, no es un alérgeno clínicamente significativo en modo alguno. De hecho, para definirse como tal, un alérgeno debe reconocerse, en cuanto a IgE específica, por al menos el 60% de los sueros de sujetos positivos para esa sustancia dada (en este caso específico, veneno de abeja). Con respecto al perfil de IB, puede observarse que la fosfolipasa se reconoce por todos los sueros sometidos a prueba, varios de los cuales también reconocen hialuronidasa, mientras que la melitina o bien no se reconoce o bien, cuando se reconoce, la señal correspondiente es siempre muy débil. Por tanto, basándose en estos resultados, la melitina debe considerarse como un alérgeno bastante minoritario ya que sólo se reconoce por una minoría muy pequeña de los sueros. Además, este reconocimiento siempre está asociado con la presencia de anticuerpos de IgE específicos para otros alérgenos en el suero, principalmente fosfolipasa A2, frente a los que siempre se observa que la respuesta de IgE anteriormente mencionada es mucho más intensa. En cuanto a kU/l de IgE, la melitina tiene un valor medio de 1,25 (clase 1) mientras que el valor para la fosfolipasa es de 16,9 (clase 3).

50 Estos resultados han conducido a creer que la melitina no es un alérgeno clínicamente significativo, y que precisamente por este motivo, puede retirarse de la preparación, para constituir una vacuna novedosa, más segura y eficaz para tratar a sujetos afectados por alergia frente a las picaduras de abeja. Este producto también puede usarse en SIT en aquellos pacientes en los que, habiendo tenido que interrumpir el tratamiento con extracto completo debido al comienzo de reacciones no deseadas, estarían más expuestos al riesgo de reacciones anafilácticas en el caso en el que tengan la mala suerte de ser víctimas de picaduras de abeja adicionales.

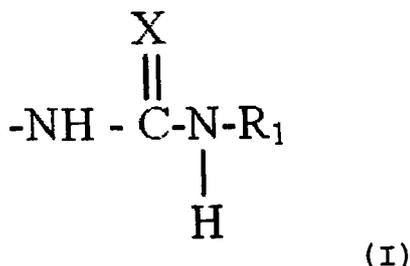
La retirada de melitina en el extracto novedoso también debe tener la ventaja de evitar el riesgo de sensibilizar a sujetos a lo largo del transcurso de SIT, dado que los extractos actualmente en uso contienen cantidades significativas de melitina y no puede excluirse que las reacciones adversas consiguientes frente a la SIT anteriormente mencionada estén provocadas precisamente por la sensibilización frente al componente anteriormente mencionado como consecuencia de tratamiento con la vacuna específica. Con el fin de obtener una demostración adicional de la falta de significación clínica de melitina, se realizó una serie de experimentos adicionales comparando la actividad de unión a IgE de la preparación de veneno que contiene melitina (tras diálisis usando una membrana con un punto de corte de 3,5 kDa) o sin melitina (tras diálisis con un punto de corte de 10
65

kDa). Dado que no se dispone de una forma purificada en el mercado para la evaluación de la respuesta de IgE frente a hialuronidasa, no fue posible realizar pruebas ni REAST ni RAST directa, y por tanto se recurrió a los experimentos de inmunotransferencia. Se demostró la presencia de hialuronidasa en la muestra monitorizando la actividad enzimática específica.

5 Un alcance adicional de la presente invención es el de desarrollar otra preparación, partiendo de veneno de abeja con melitina agotada, en la que los alérgenos principales presentes, representados por fosfolipasa A2 e hialuronidasa, se modifican químicamente para reducir su reactividad de unión a IgE (el riesgo de efectos secundarios está asociado con dicha reactividad), mientras que se conserva su potencia inmunogénica (que se entiende que es la capacidad para inducir anticuerpos de clase IgG específicos, que se sabe que tienen un efecto protector). Esto puede lograrse sometiendo el veneno de abeja con melitina agotada a reacciones de carbamilación (o tiocarbamilación), o a reacciones que forman grupos de tipo guanidina en los grupos amina primaria de las partes de proteína, particularmente en los grupos amino terminales y los residuos ε-amino de lisina. La carbamilación de proteínas, un tipo conocido de reacción, puede afectar a otros residuos de aminoácido (por ejemplo el grupo hidroxilo de tirosina, el grupo imidazol de histidina) pero todos estos derivados son inestables en condiciones de pH fisiológico, mientras que los productos de reacción de carbamilación de grupos alfa y épsilon-amino son muy estables.

20 Tal como se demuestra en la siguiente descripción, dichos derivados de carbamilo y tiocarbamilo de veneno de abeja con melitina agotada, así como derivados de tipo guanidina, han mostrado una actividad de unión a IgE significativamente reducida, mientras que, cuando se administran por vía parenteral, su capacidad para inducir anticuerpos de IgG específicos que también pueden reconocer veneno de abeja con melitina agotada sin modificar permanece inalterada. Por tanto, dicho producto puede representar un candidato más seguro y eficaz para SIT en pacientes con alergias específicas.

25 Por tanto, un objeto adicional de la presente invención es una preparación que contiene una forma modificada de veneno de abeja con melitina agotada, caracterizada porque la totalidad o una parte de los grupos amina primaria de los componentes de proteína presentes en la misma adoptan la siguiente estructura (I):



30 en la que X representa O, S o NR₂, en el que R₂ es H, alquilo con 1-6 átomos de carbono, fenilo o CN y R₁ representa H, alquilo con 1-8 átomos de carbono, fenilo o arilalquilo con hasta 8 átomos de carbono o alquilo que contiene un anillo heterocíclico, y porque dicha preparación es soluble en agua.

35 El porcentaje medio de grupos amina primaria modificados debe estar comprendido entre el 75% y el 100%, preferiblemente de aproximadamente el 90%.

40 Las proteínas de veneno de abeja pueden modificarse según la invención mediante tratamiento con cianato alcalino (KCNO o NaCNO) o con isocianatos o tiocianatos orgánicos. La reacción debe realizarse a un pH comprendido entre 7 y 11, preferiblemente entre 9 y 9,6, mientras que la temperatura en el caso de tratamiento con cianato alcalino puede estar comprendida entre 20°C y 50°C, preferiblemente entre 35°C y 40°C, y el tiempo de reacción puede variar entre 12 y 36 horas, preferiblemente entre 16 y 24 horas.

45 En el caso de tratamiento con cianato, puede añadirse por ejemplo KCNO sólido (posiblemente recién cristalizado), de modo que la concentración final es de entre 0,05 M y 1 M, preferiblemente entre 0,3 y 0,7 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 M. El pH de la disolución se mantiene al valor deseado añadiendo, por ejemplo, tetraborato de sodio 0,1 M y ajustando el pH mediante la adición de NaOH 1 M.

50 En el caso de isocianatos o isotiocianatos orgánicos, dado que en determinados casos tales compuestos son escasamente solubles en entornos acuosos, puede considerarse el uso de un disolvente orgánico compatible.

55 Al completarse la reacción, se somete el veneno de abeja con melitina agotada así modificado a filtración en gel con el fin de eliminar el reactivo en exceso y se equilibra con una solución salina apropiada. Si se produce una ligera precipitación tras la modificación (debido a la presencia de trazas de melitina, que al reaccionar con el cianato, da lugar a un derivado insoluble), esto puede eliminarse mediante centrifugación apropiada.

El grado de sustitución de los grupos NH₂ del veneno de abeja con melitina agotada modificado, en comparación con el veneno antes de la modificación, puede determinarse por medio de dosificación con ácido trinitro-bencenosulfónico (Habeeb, Anal. Bioch. 14, 328, 1966) o analizando la desaparición de residuos de lisina y la aparición de homocitrulina por medio de métodos apropiados conocidos por los expertos en la técnica.

5 El veneno de abeja con melitina agotada químicamente modificado según el procedimiento descrito puede prepararse en forma acuosa y puede administrarse por vía parenteral, vía sublingual, vía oromucosa, vía oral, vía nasal o vía bronquial, esta última por medio de dispositivos de administración adecuados. El producto anteriormente descrito también puede prepararse en forma liofilizada y después puede reconstituirse y administrarse tal como se
10 indica para la forma acuosa, o incorporarse en sistemas de liberación (por ejemplo liposomas) o como polvo, incorporado en un excipiente inerte, por ejemplo lactosa, para administrarse por vía nasal o vía bronquial, por medio de dispositivos de administración apropiados, o prepararse como comprimidos, posiblemente para disolución rápida, para administración sublingual/oromucosa, o prepararse como cápsulas, opcionalmente que se vuelven
15 gastrorresistentes por medio de un procedimiento adecuado, para administración oral.

El producto anteriormente mencionado puede administrarse por vía parenteral, una vez adsorbido o precipitado conjuntamente con sustancias tales como L-tirosina, hidróxido de aluminio o fosfato de calcio, o con otras matrices de "retardo" que fomentan la liberación lenta del principio activo a partir del sitio de inoculación.

20 El producto anteriormente mencionado también puede prepararse en forma de una suspensión en aceite, jarabe, elixir, con la adición opcional de excipientes o sustancias para darle un sabor agradable para administración sublingual, oromucosa u oral.

El producto anteriormente mencionado puede asociarse o combinarse de manera similar con sustancias que se sabe que expresan actividad adyuvante de tipo Th1 o Treg, tales como por ejemplo CpG, derivada de bacterias, micobacterias, micoplasmas, *Neisseria*, virus o protozoos, incluyendo CpG no metilada, lipoproteínas o lipopéptidos triacilados, polisacáridos y derivados de los mismos, también de origen sintético, sustancias sintetizadas tales como imiquimod, resiquimod, poli(I:C).

30 La composición de la invención puede contener generalmente diversos excipientes y/o portadores adaptados para el tipo de administración elegido, según el conocimiento del que disponen los expertos en la técnica y tal como se notifica por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. Co., N.Y., EE.UU., 17ª edición, 1985.

35 En todas las formulaciones farmacéuticas anteriores, la preparación de la invención puede estar presente en cantidades comprendidas entre 0,1-0,2 µg (dosis inicial) y 100-200 µg (dosis de mantenimiento), según dosis que por tanto serán generalmente mayores que las típicas para inmunoterapia específica.

Ahora se describirán la preparación y la actividad inmunogénica del veneno de abeja con melitina agotada modificado según la invención a modo de ejemplo no limitativo.

Ejemplo 2. PROCEDIMIENTO DE MODIFICACIÓN QUÍMICA PARA UN VENENO DE ABEJA LIBRE DE MELITINA.

45 Se someten 20 ml de veneno de abeja con melitina agotada (a una concentración de 2 mg/ml), preparado tal como se describió en el ejemplo 1, a carbamilación mediante la adición de cianato de potasio y tetraborato de sodio decahidratado, en forma sólida y en cantidades tales como para proporcionar una molaridad de cianato 0,05 M o 0,5 M y tetraborato 0,1 M. Se disuelven las sales añadidas mediante agitación y se ajusta el pH a 9,3 mediante la adición de NaOH 1 M. Después se mantiene la mezcla completa con agitación lenta durante 18 horas en un baño
50 termostático a 40°C en un recipiente sellado de manera adecuada, mientras se monitoriza el pH y se mantiene constante. Al completarse la reacción, se filtra en gel la disolución resultante a través de una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia, Milán, Italia) con el fin de eliminar el cianato en exceso y se equilibra con solución salina isotónica, antes de la filtración a través de una membrana de 0,22 µm y almacenamiento a 4°C para pruebas posteriores. Anteriormente se había calibrado la columna adecuadamente con el fin de recoger el pico excluido.

55 El producto resultante tiene las siguientes características:

- actividad de unión a IgE reducida, tal como se demuestra mediante experimentos de inhibición de EAST
- conservación de actividad inmunogénica, tal como se muestra mediante los experimentos de IgG de ELISA con
60 sueros de ratones inmunizados con veneno de abeja con melitina agotada modificado
- mantenimiento de las dimensiones moleculares, tal como se demuestra mediante los experimentos de SDS-PAGE (figura 6).

65 Además de las características quimicobiológicas anteriormente mencionadas, el veneno de abeja con melitina agotada modificado, tal como se describe, muestra inesperadamente una reducción en las actividades enzimáticas

atribuibles a fosfolipasa A2 e hialuronidasa, tal como se muestra mediante los experimentos de inmunodifusión en gel de agarosa (descritos a continuación), usando lecitina e hialuronato de sodio respectivamente como sustratos. Esta observación puede contribuir a una mejora adicional en la seguridad del producto, dado que en cualquier caso, los componentes enzimáticos anteriormente mencionados tienen su propia actividad farmacológica. Tal como se sabe bien, la fosfolipasa puede provocar daño a la membrana celular (citólisis) y la hialuronidasa actúa como “factor de difusión de veneno” disolviendo ácido hialurónico, una sustancia presente en tejido conjuntivo y que une células entre sí. Muy probablemente, al contrario que la actividad de unión a IgE, el efecto farmacológico expresado por fosfolipasa e hialuronidasa también se inhibe, confiriendo ventajosamente al producto modificado una mayor seguridad. De hecho, el efecto terapéutico de veneno de abeja en SIT implica la activación de mecanismos inmunológicos y por tanto es completamente diferente del uso del mismo en terapia antiinflamatoria (terapia con veneno de abeja).

Pruebas experimentales

15 Inhibición de EAST

Con este fin, se recubrieron esferas de poliestireno activado con glutaraldehído con veneno de abeja, sometido a diálisis con un punto de corte de 10 kDa, en una cantidad de 1 µg por esfera.

20 En paralelo, se prepara una combinación de sueros humanos, seleccionados de pacientes alérgicos al veneno de abeja, por medio de REAST (IgE >20 kU/l).

Se colocan 30 µl de diluciones en serie de las muestras de prueba (veneno de abeja de 10 kDa sin modificar, veneno de abeja de 10 kDa modificado con cianato 0,05 M y veneno de abeja de 10 kDa modificado con cianato 0,5 M) en PBS-BSA al 2% (diluyente) en los pocillos de una placa de ELISA junto con 20 µl de combinación de suero, y se deja la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. En paralelo, se prepara una muestra de control positivo en la que se sustituye el inhibidor por diluyente. Al completarse las dos horas, se añaden una esfera con proteína unida y 50 µl de PBS-BSA al 2% a cada pocillo, y se continúa la agitación de la placa durante la noche a temperatura ambiente. Después se lavan las esferas y se añaden 100 µl de una disolución de anticuerpo anti-IgE humana conjugado con peroxidasa a cada pocillo, y se incuba la placa con agitación durante 2 horas. Tras lavar tres veces, se obtiene desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubando durante 15 minutos a 25°C. Se extingue la reacción mediante la adición de 50 µl de HCl 1 N, y se transfieren 100 µl de mezcla de cada pocillo a una placa nueva y se desarrolla la intensidad de color y se evalúa mediante lectura espectrofotométrica a 450 nm.

35 Se transforman las densidades ópticas medidas en valores de inhibición en porcentaje con respecto al control positivo, y se traza un gráfico con la inhibición en porcentaje en el eje Y, y el log₁₀ del volumen de la muestra usada en la prueba en el eje X. A partir de los puntos notificados, se construye una recta de regresión lineal, en la que se mide el valor de CI₅₀, que representa el volumen de muestra, en microlitros, necesario para inhibir el 50% de la unión de IgE a la esfera.

40 Los resultados, mostrados en la figura 3, demuestran que la adición de concentraciones adecuadas de cianato de potasio a la disolución de veneno de abeja libre de melitina provoca una reducción en la actividad alérgica del propio veneno, y en particular, una reducción de aproximadamente 10 veces (0,070 en comparación con 0,68 µl) para cianato 0,05 M y de aproximadamente 500 veces (0,070 en comparación con 32,82 µl) para cianato 0,5 M.

Protocolo de inmunización de ratones

Se inmuniza un grupo de ratones, que consiste en cuatro hembras Balb/c (Charles River), por vía subcutánea, con 200 µl de una emulsión que consiste en 100 µl de adyuvante completo de Freund y 20 µg de veneno de abeja con melitina agotada, modificado con KCNO 0,5 M tras diálisis con un punto de corte de 10 kDa, en 100 µl de solución salina isotónica. Se realizan tres inyecciones de recuerdo adicionales a intervalos de dos semanas, con adyuvante incompleto en lugar de completo. Siete días tras la última inmunización, se extrae sangre de las colas de los ratones y se comprueba la respuesta de IgG específica con respecto al inmunógeno (veneno de abeja con melitina agotada modificado) mediante ELISA, al igual que la capacidad para reconocer proteína de tipo natural (veneno de abeja con melitina agotada).

ELISA de IgG de sueros de ratones inmunizados con veneno de abeja con melitina agotada modificado

60 Se adsorben cantidades iguales (0,25 µg) de veneno de abeja con melitina agotada o de veneno de abeja con melitina agotada modificado, en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6, sobre los pocillos de placas de ensayo ELISA de poliestireno mediante incubación a 4°C durante 16 horas. Después se lavan los pocillos con disolución de lavado (tampón fosfato 60 mM pH 6,5 que contiene Tween-20 al 0,05%) y se bloquean los sitios libres con disolución de diluyente (suero de caballo al 25%, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05%, tiomersal al 0,01% en tampón fosfato 150 mM pH 7,4). Se añaden alícuotas iguales (100 µl) de diluciones en serie de suero de cada ratón

en tampón de diluyente a cada pocillo y se dejan incubar a 25°C durante 2 horas. Tras tres lavados y la adición de suero anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa, diluido 1:2000 en tampón de diluyente, se continúa la incubación a 25°C durante 1,5 horas. Tras lavar tres veces, se obtiene desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubando durante 15 minutos a 25°C. Se extingue la reacción mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N, y se evalúan los resultados mediante espectrofotometría a 450 nm.

La figura 4 muestra la reactividad de IgG de los sueros de animales inmunizados con veneno de abeja modificado con cianato 0,5 M con respecto a las proteínas de veneno de abeja con melitina agotada nativo o modificado con cianato.

El hecho de que la respuesta de IgG de dichos sueros se dirige no sólo al veneno modificado (con melitina agotada) sino que también puede reconocer veneno nativo (con melitina agotada), es decir veneno sin modificar, demuestra que la capacidad inmunogénica del veneno modificado está más o menos inalterada. Esto es extremadamente importante desde una perspectiva terapéutica, ya que se considera que la inducción de IgG específica es un factor determinante en la expresión de eficacia clínica de SIT (Flicker S, Valenta R.; *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 132(1):13-24).

SDS-PAGE

Se someten cantidades iguales (5 mg) de veneno de abeja a diálisis usando una membrana con un punto de corte de 10 kDa y se analizan muestras del mismo sometidas a modificación química con cianato 0,05 ó 0,5 M por medio de electroforesis sobre geles de poliacrilamida al 10% (geles pre-cast Nupage Bis-Tris, Novex, Prodotti Gianni, Milán, Italia) tal como se describió anteriormente (Asero R., Mistrello G. *et al.* *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2007; 144, 57-63). Se realiza la electroforesis en el dispositivo específico (Mighty Small II, Hoefer, Milán, Italia) a 180 mA durante 1 hora. Se tiñen los componentes así resueltos con azul brillante de Coomassie (kit de tinción de azul coloidal, Amersham, Milán, Italia) y posteriormente se elimina la tinción en agua. Los resultados mostrados en la figura 6 indican claramente que el procedimiento de modificación química usado no ha alterado significativamente las dimensiones moleculares de los componentes presentes. Este elemento final es extremadamente importante para el uso de un producto para fines terapéuticos, especialmente en el caso de administración del mismo por vía sublingual/vía oromucosa.

Medición de la actividad enzimática del alérgeno fosfolipasa A2

Se destacaron la presencia y cuantificación de fosfolipasa A2 (PLA2) en el veneno de abeja analizando su actividad enzimática en un gel de agarosa que contenía el sustrato natural de la enzima (lecitina).

Con este fin, se prepararon 50 ml de una disolución al 2% de agarosa en Tris 40 mM pH 8, NaN₃ al 0,1%. Tras haber disuelto la agarosa mediante ebullición de la disolución y haberla enfriado posteriormente hasta aproximadamente 56°C, se le añaden 50 ml de una emulsión al 3% de fosfatidilcolina de soja (lecitina de soja, Sigma, Milán) en el mismo tampón. Finalmente, tras haber añadido 1 ml de CaCl₂ 10 mM, y haber distribuido 15 ml de la mezcla en placas de Petri de 100 mm de diámetro y haberlas dejado enfriar hasta que se solidificó el gel, se dejan reposar las placas a 4°C durante la noche. Posteriormente, se prepararon pocillos con un diámetro de aproximadamente 4 mm en el gel y se prepararon las disoluciones que iban a analizarse, patrón de PLA2 nativo o modificado (500, 20 y 1 U/ml) o veneno de abeja nativo o modificado (con KCNO 0,05 M o 0,5 M) en NaCl 1 M, BSA al 0,1%, NaN₃ al 0,1%.

Tras transferir con pipeta 10 µl de cada disolución al interior de los pocillos (analizándose cada muestra por duplicado), se colocaron las placas en un incubador humidificado a 37°C durante aproximadamente 20 horas. Finalmente, se analizó la actividad enzimática midiendo el diámetro de los halos translúcidos que se forman alrededor de los pocillos debido a la hidrólisis de la lecitina. El tamaño de cada halo es directamente proporcional a la actividad enzimática presente en la muestra. Los tamaños de halo para las diversas concentraciones de patrón de fosfolipasa permitieron trazar una curva patrón, a partir de la cual pueden extrapolarse los valores obtenidos para las muestras de prueba. A partir de este análisis, resulta evidente que el veneno de abeja sometido a diálisis con un punto de corte de 10 kDa tenía una concentración de fosfolipasa de 76 U/mg de veneno liofilizado; tras la modificación con KCNO 0,05 M o 0,5 M, esta actividad disminuyó hasta 57 y 0,8 U/mg respectivamente.

Medición de la actividad enzimática del alérgeno hialuronidasa

Se destacaron la presencia y cuantificación de hialuronidasa en el veneno de abeja analizando su actividad enzimática en un gel de agarosa que contenía el sustrato natural de la enzima (ácido hialurónico o hialuronato de sodio).

Con este fin, se prepararon 50 ml de una disolución de hialuronato de sodio en tampón citrato 0,1 M/NaCl pH 5,3 y, en paralelo, 10 ml de una disolución al 3% de agarosa en el mismo tampón. Tras haber disuelto la agarosa mediante ebullición de la disolución y tras haberla enfriado posteriormente hasta aproximadamente 60°C, se mezclaron las dos disoluciones y se distribuyó la mezcla en placas de Petri de 100 mm de diámetro. Tras enfriar a temperatura

ambiente hasta que se solidificó el gel, se dejan reposar las placas a 4°C durante 2 horas. Posteriormente, se prepararon pocillos con un diámetro de 4 mm en el gel y se prepararon las disoluciones que iban a analizarse, patrón de hialuronidasa (1000, 500 y 250 U/ml) o veneno de abeja con melitina agotada nativo o veneno modificado con KCNO 0,5 M (estos dos últimos a 50 µg/ml).

5 Tras transferir con pipeta 10 µl de cada disolución al interior de los pocillos (analizándose cada muestra por duplicado), se colocaron las placas en un incubador humidificado a 37°C durante aproximadamente 20 horas. Finalmente, se visualizó la actividad enzimática vertiendo 30 ml de cetilpiridinio al 10% en H₂O por placa sobre el gel, y se analizó midiendo el diámetro del halo transparente que se forma alrededor de los pocillos frente al fondo opaco de la placa. El tamaño de cada halo es directamente proporcional a la actividad enzimática presente en la muestra. Los tamaños de halo para las diversas concentraciones de patrón de hialuronidasa permitieron trazar una curva patrón, a partir de la cual pueden extrapolarse los valores obtenidos para las muestras de prueba. A partir de este análisis, resulta evidente que el veneno de abeja sometido a diálisis usando una membrana con un punto de corte de 10 kDa tenía una concentración de hialuronidasa de 9550 U/mg de veneno liofilizado; mientras que, tras la modificación con KCNO 0,5 M, dicha actividad ya no era detectable.

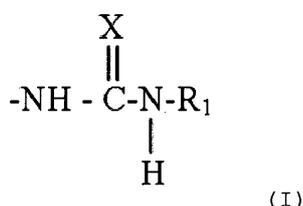
Conclusión

20 El producto derivado (denominado alergoide monomérico con el fin de distinguirlo de otros alergoides, obtenidos mediante reacción con aldehídos, formaldehído o glutaraldehído, en los que los componentes adoptan dimensiones moleculares considerablemente mayores, dando como resultado el nombre de tipo polimérico) puede representar el candidato ideal para SIT con una vacuna específica que va a administrarse, incluso por vías distintas de la parenteral.

25 El objetivo de la modificación es reducir la actividad de unión a IgE (con la que se asocia el riesgo de reacciones adversas) y conservar la capacidad inmunogénica (entendida como la capacidad para inducir anticuerpos de IgG con los que se asocia la posibilidad de beneficio clínico) de la preparación de veneno de abeja más segura que va a usarse en SIT en pacientes alérgicos al veneno de abeja. La actividad enzimática reducida del alergoide monomérico en comparación con el alérgeno sin modificar aumenta su seguridad de uso.

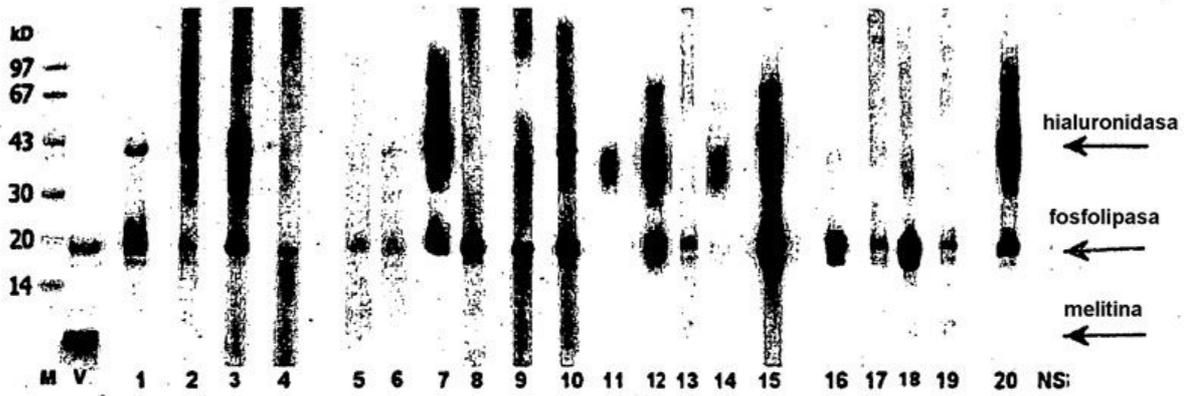
REIVINDICACIONES

- 5 1. Preparación de veneno de abeja, siendo obtenible dicha preparación mediante diálisis de veneno de abeja nativo usando una membrana con un punto de corte de 10 kDa, caracterizada porque dicho veneno de abeja está libre de melitina.
- 10 2. Preparación según la reivindicación 1, en la que los grupos amina primaria de las partes de proteína de dicho veneno de abeja con melitina agotada se someten a carbamilación o tiocarbamilación o a la formación de grupos de tipo guanidina para formar alergoides monoméricos.
3. Preparación según la reivindicación 2, en la que dichos grupos amina primaria son grupos amino terminales y/o los residuos ε-amino de lisina.
- 15 4. Preparación según las reivindicaciones 2 ó 3, caracterizada porque la totalidad o parte de los grupos amina primaria de los componentes de proteína de dicho veneno de abeja con melitina agotada adoptan la siguiente estructura (I):



- 20 en la que X representa O, S o NR₂, en el que R₂ es H, alquilo con 1-6 átomos de carbono, fenilo o CN y R₁ representa H, alquilo con 1-8 átomos de carbono, fenilo o arilalquilo con hasta 8 átomos de carbono o alquilo que contiene un anillo heterocíclico.
- 25 5. Preparación según la reivindicación 4, siendo dicha preparación soluble en agua.
6. Preparación según las reivindicaciones 4 ó 5, en la que el porcentaje medio de grupos amina primaria modificados es superior al 75%.
- 30 7. Preparación según la reivindicación 6, en la que el porcentaje medio de grupos amina primaria modificados es de aproximadamente el 90%.
8. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, obtenible mediante tratamiento de dicho veneno de abeja con melitina agotada con un cianato alcalino tal como KCNO o NaCNO o con isocianatos o isotiocianatos orgánicos a un pH comprendido entre 7 y 11.
- 35 9. Preparación según la reivindicación 8, realizándose dicho tratamiento a un pH comprendido entre 9 y 9,6.
10. Preparación según las reivindicaciones 8 ó 9, realizándose dicho tratamiento con cianato alcalino a una temperatura comprendida entre 20°C y 50°C, o entre 35°C y 40°C y durante un tiempo de reacción que varía entre 12 y 36 horas, o entre 16 y 24 horas.
- 40 11. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, realizándose dicho tratamiento con KCNO sólido de tal manera que la concentración final es de entre 0,05 M y 1 M, o entre 0,3 y 0,7 M, o aproximadamente 0,5 M.
- 45 12. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que, al completarse la reacción, el veneno de abeja con melitina agotada así modificado se somete a filtración en gel con el fin de eliminar el reactivo en exceso y se equilibra con una solución salina apropiada.
- 50 13. Composición farmacéutica que comprende una dosis eficaz para inmunoterapia de la preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.
14. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en la desensibilización frente a veneno de abeja en inmunoterapia específica, en la que dicha preparación tiene un efecto inmunogénico igual al veneno de abeja nativo, pero una actividad de unión a IgE reducida.
- 55 15. Uso de una preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la preparación de un medicamento para la desensibilización frente a veneno de abeja para inmunoterapia específica, en el que dicha preparación tiene un efecto inmunogénico igual al veneno de abeja nativo, pero una actividad de unión a IgE reducida.

Figura 1. Inmunotransferencia con suero de pacientes alérgicos y no alérgicos al veneno de abeja



- M: Patrones de peso molecular
- V: Perfil de SDS-PAGE de veneno de abeja sometido a diálisis a 3,5 kDa
- 1-20: Sueros de pacientes alérgicos a veneno de abeja
- NS: Combinación de sueros de sujetos no alérgicos

Figura 2. Perfil de SDS-PAGE: el efecto de la duración de diálisis con una membrana con un punto de corte de 10 kDa sobre la eliminación de melitina del veneno de abeja

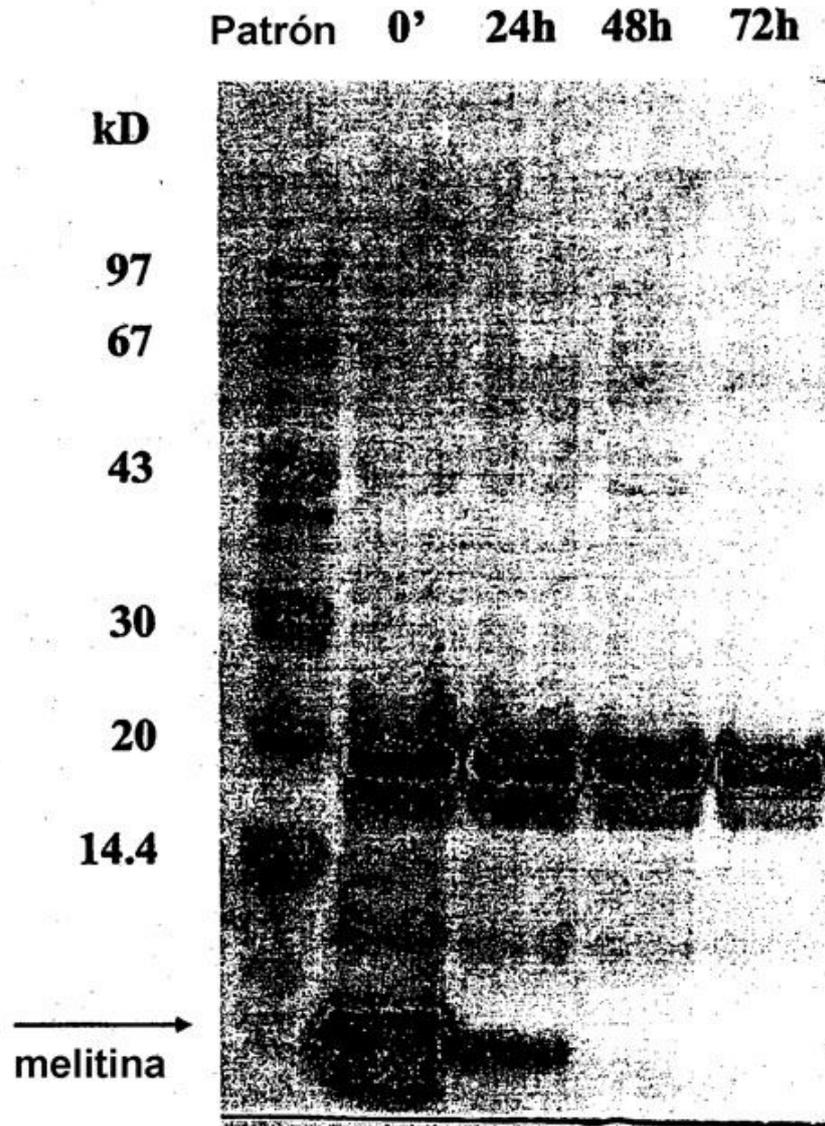
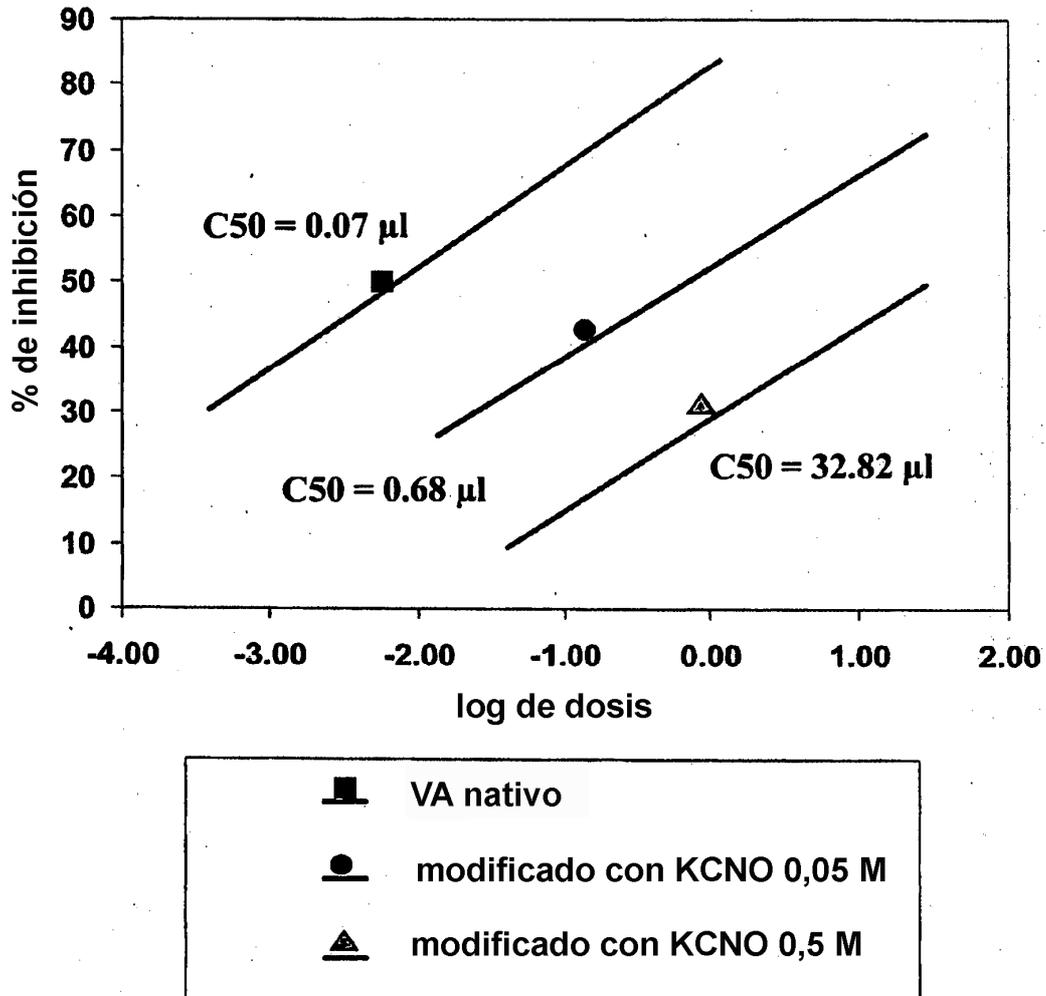


Figura 3. Determinación mediante inhibición de EAST de la reactividad de IgE de veneno de abeja de 10 kDa y veneno de abeja de 10 kDa modificado con cianato de potasio 0,05 M y 0,5 M



C50: microlitros de muestra necesarios para obtener una inhibición del 50% de la unión de IgE a alérgenos unidos a esfera

Figura 4. Determinación de niveles de IgE específica en una combinación de sueros de ratones inmunizados con veneno de abeja de 10 kDa modificado

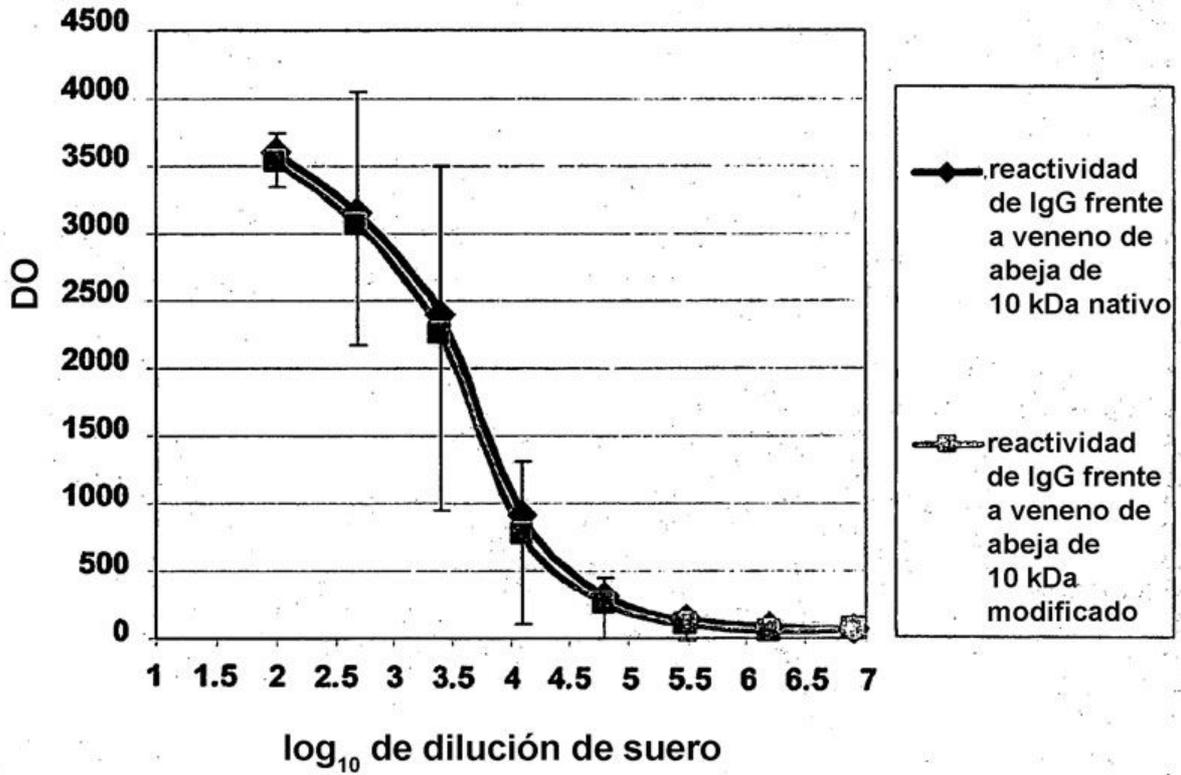
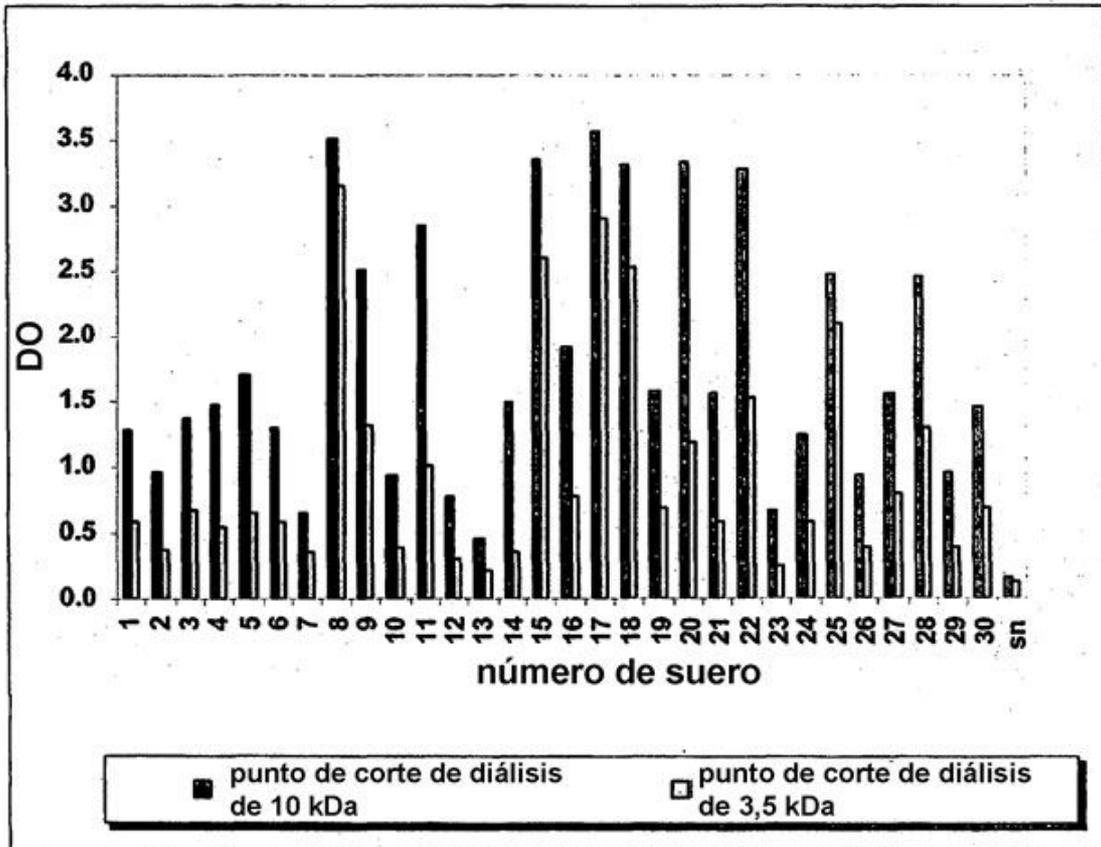
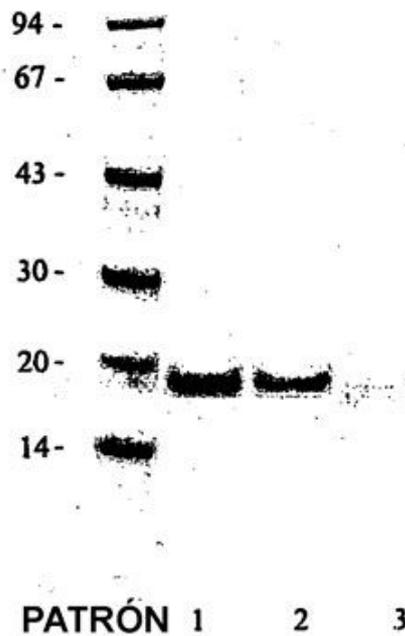


Figura 5. ELISA directo. Comparación de la reactividad de IgE de sueros de pacientes alérgicos al veneno de abeja frente a veneno de abeja sometido a diálisis de 3,5 kDa o 10 kDa



1-30: sueros de pacientes alérgicos al veneno de abeja
 sn; combinación de sueros de pacientes no alérgicos al veneno de abeja

Figura 6. Perfil de SDS-PAGE de veneno de abeja de 10 kDa nativo y modificado



- PATRÓN:** Patrones de peso molecular
- 1** Veneno de abeja sometido a diálisis de 10 kDa nativo
 - 2** Veneno de abeja modificado usando KCNO 0,05 M
 - 3** Veneno de abeja modificado usando KCNO 0,5 M