(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional

(43) Data de Publicação Internacional
14 de Abril de 2011 (14.04.2011)

PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2011/041865 A1

(51) Classificação Internacional de Patentes :
A61K 9/00 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2010/000337

(22) Data do Depósito Internacional :
7 de Outubro de 2010 (07.10.2010)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
PI0904036-6
7 de Outubro de 2009 (07.10.2009) BR
014100003510
7 de Outubro de 2010 (07.10.2010) BR

(71) Requerentes *(para todos os Estados designados, exceto US)* : **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG** [BR/BR]; Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2° Andar, Sala 2013, Cep: 31270-901 Pampulha, BeIo Horizonte - MG (BR). **FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS - FUNED** [BR/BR]; Rua Conde Pereira Carneiro 80, Gameleira, Cep: 30510-010 Belo Horizonte, MG (BR). **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG** [BR/BR]; Rua Raul Pompéia, nº 101 - 11° andar, São Pedro, Cep: 30330-080 Belo Horizonte, MG (BR).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Requerentes *(para US únicamente)* : **MARGARIDA ALVES, Esther** [BR/BR]; Rua Apucarana, 136, Bairro Ouro Preto, Cep: 31310-520 Belo horizonte - MG (BR). **DIAS HENEINE, Luiz Guilherne** [BR/BR]; Rua Conde Pereira Guimarães, 80, Bairro Gameleira, Cep: 30510-010 Belo Horizonte - MG (BR). **PESQUERO, Jorge Luiz** [BR/BR]; Rua Augusto Franco, 661, apto. 703, Bairro São João Batista, Cep: 31515-240 Belo Horizonte - MG (BR). **DE ALBUQUERQUE MERLO, Leonardo** [BR/BR]; Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Cep: 31270-901, Belo Horizonte - MG (BR).

(74) Representante comum : **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG**; DE CASTRO LEITE GORI, AnaLuíza, Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2° Andar, Sala 2013, Cep: 31270-901 Pampulha, BeIo Horizonte - MG (BR).

(81) Estados Designados *(sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes)* : AE, AG,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAININ AN APITOXIN FRACTION AND USE THEREOF

(54) Título : COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO FRAÇÃO DE APITOXINA E USO

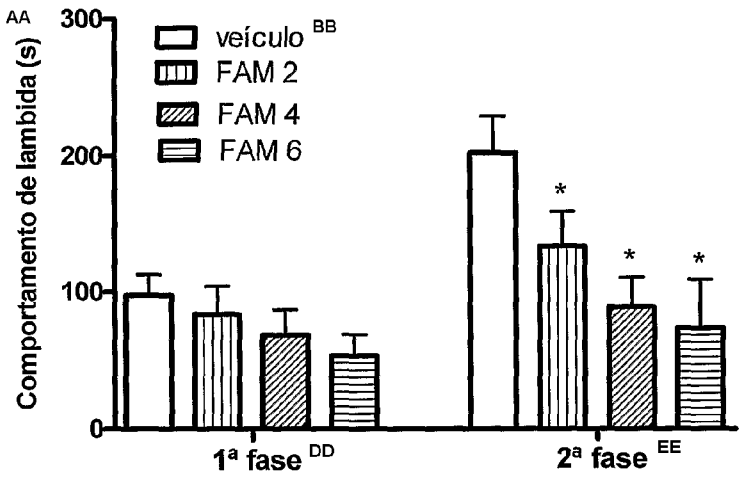


Figura 5

AA... Licking behaviour
BB... carrier
DD... Phase 1
EE... Phase 2

(57) Abstract : The present invention relates to pharmaceutical compositions containing an isolated fraction of bee apitoxin, of low allergenicity, with analgesic and anti-inflammatory properties, for treating patients suffering from rheumatoid arthritis or other painful inflammatory conditions.

(57) Resumo : A presente invenção refere-se a composicões farmacêuticas contendo fração isolada de apitoxina de abelhas, de baixa alergenicidade, com propriedades analgésicas e antiinflamatórias, para serem usadas no tratamento de pacientes com artrite reumatóide ou outras condições inflamatórias e dolorosas.

WO 2011/041865 A1

AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados *(sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*

"COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO FRAÇÃO DE APITOXINA E USO"

A presente invenção refere-se a composições farmacêuticas contendo fração isolada de apitoxina de abelhas, de baixa alergenicidade, com propriedades analgésicas e antiinflamatórias, para serem usadas no tratamento de pacientes com artrite reumatóide ou outras condições inflamatórias e dolorosas.

Apesar da picada de abelha induzir dor e edema locais e inclusive alergia em alguns indivíduos, a apitoxina tem sido usada empiricamente em intervenções terapêuticas para alívio da dor e do edema associados à artrite reumatoide e à osteoartrite. Encontram-se relatos do uso da apitoxina com objetivos terapêuticos desde a antiguidade. Cerca de 400 anos a.C., Hipócrates fazia referência ao uso da apitoxina e a chamava de "*Arcanum*", um remédio muito misterioso. Galeno (130-200 d.C.) também mencionou o uso da apitoxina 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 meliffera ou o veneno de abelhas considerado como um agente terapêutico"*. Em 1935, Beck escreveu o livro "*Terapia do Veneno de Abelhas"*, sendo considerado referência até os dias atuais.

Após 1945, foram iniciados diversos estudos controlados com o objetivo de investigar as propriedades terapêuticas da apitoxina. O reconhecimento internacional dos produtos das abelhas como potencialmente úteis na terapia de várias doenças é crescente e resulta principalmente de pesquisas devidamente conduzidas que fornecem sustentação ao que, na antiguidade, era apenas uma observação empírica.

Diversos estudos conduzidos em animais experimentais demonstraram ações anti-inflamatórias e antinociceptivas da apitoxina e de alguns de seus componentes. Nesses estudos, a apitoxina geralmente é administrada de forma diluída. A administração subcutânea da apitoxina inibe o edema e a resposta nociceptiva induzidos pela carragenina em ratos (CHANG, Y. H.; BLIVEN, M. L. Anti-arthritic effect of bee venom. Agents Actions, v.9, n.2, p.205-211, 1979;

LEE, J. H. KWON, Y. B.; HAN, H. J.; MAR, W. C.; LEE, H. J.; YANG, I. S.; BEITZ, A.J.; KANG, S. K. Bee venom pretreatment has both an antinociceptive and anti-inflammatory effect on carrageenan-induced inflammation. *J. Vet. Sci.*, v. 63, n. 3, p. 251-259, 2001). A apitoxina também inibe a resposta inflamatória induzida pelo adjuvante de Freund em ratos. Thomsem et al. (1984) verificaram que a injeção subcutânea da apitoxina inibe a inflamação articular induzida por complexo imune em coelhos, efeito caracterizado por uma redução do número de leucócitos no líquido sinovial, mas não altera a mobilidade e a fagocitose dessas células. A apitoxina também induz apoptose de fibroblastos obtidos do tecido sinovial de pacientes com artrite reumatoide (KANG, S. S.; PAK, S. C.; CHOI, S. H. The effect of whole bee venom on arthritis. *Am. J.Chin. Med.*, v.30, n.1, p.73-80, 2002.; LEE, J. Y.; KANG, S. S.; KIM, J. H.; BAE, C. S.; CHOI, S. H. Inhibitory effect of whole bee venom in adjuvant-induced arthritis. *In Vivo*, v.19, n.4, p.801-805, 2005; THOMSEN, P.; BJURSTEN, L. M.; AHLSTEDT, S.; BAGGE, U.; BJORKSTEN, B.Inhibitory effect of honey bee venom on immune complex mediated leukocyte migration into rabbit knee-joints. *Agents Actions,* v.14, n.5-6, p.662-666, 1984; HONG, S. J.; RIM, G. S.; YANG, H. I.; YIN, C. S.; KOH, H. G.; JANG, M. H.; KIM, C. J.; CHOE, B. K.; CHUNG, J. H. Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Toxicon,* v. 46, n.1, p.39-45, 2005).

A apitoxina tem sido usada empiricamente em técnicas de acupuntura. Segundo Lee et al. (2004), a injeção da apitoxina 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 da apitoxina, também administrada por meio dessa técnica, reduz o edema e a resposta nociceptiva induzida pelo adjuvante de Freund em ratos. Vários estudos demonstraram que a apitoxina inibe a expressão de ciclooxigenase 2 (COX 2) e a produção de citocinas inflamatórias e de óxido nítrico (NO). É possível que a inibição da síntese de NO e da expressão do gene da COX2 estejam associados à supressão do fator de transcrição NF-κB e da expressão da proteína quinase ativadora de mitose (LEE, J. D.; KIM, S. Y.; KIM, T. W.; LEE, S. H.; YANG, H. I.; LEE, D. I.; LEE, Y.

H. Anti-inflammatory effect of bee venom on type II collagen-induced arthritis. *Am. J. Chin. Med.,* v.32, n.3, p.361-367, 2004; KWON, Y. B.; LEE, H. J.; HAN, H. J.; MAR, W. C.; KANG, S. K.; ION, O. B.; BEITZ, AL J.; LEE, J. H. The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive and antiinflamatory effects on rheumatoid arthritis in rats. *Life Sci.,* v.71, p.191-204, 2002; NAM, K. W.; JE, K. H.; LEE, J. H.; HAN, H. J.; LEE, H. J.; KANG, S. K.; MAR, W. Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-1 beta) production by water-soluble sub-fractionated parts from bee (*Apis mellifera*) venom. *Arch. Pharm.,* v.26, n.5, p.383-388, 2003; JANG, H. S.; KIM, S. K.; HAN, J. B.; AHN, H. J.; BAE, H.; MIN, B. I. Effects of bee venom on the pro-inflammatory responses in RAW264.7 macrophage cell line. *J. Ethnopharmacol.,* v.99, n.1, p.157-160, 2005; REKKA, E.; KOUROUNAKIS, L.; KOUROUNAKIS, P. Antioxidant activity of and interleukin production affected by honey bee venom. *Arzneimittelforschung,* v.40, n.8, p.912-913, 1990; PARK, H. J.; LEE, S. H.; SON, D. J.; OH, K.W.; KIM, D.H.; SONG, H.S.; KIM, G. J.; OH, G.T.; YOON DO, Y.; HONG, J. T. Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by supression of NF-KappaB through interaction with the p50 subunit. *Arthritis Rheum.,* v. 50, n. 11, p. 3504-3515, 2004).

Vick & Shipman (1972) e Vick et al. (1972) demonstraram que a apitoxina e a melitina, também aumentam a produção de cortisol em macacos e cães. Chang & Bliven (1979) também sugeriram que o efeito anti-inflamatório induzido pela apitoxina está associado à produção de esteroides adrenais. Kwon et al. (2003) observaram que o efeito anti-inflamatório induzido pela apitoxina também depende de catecolaminas de origem adrenal. É provável que a estimulação adrenal induzida pela apitoxina resulte da ativação de mecanismos colinérgicos na medula espinhal (VICK,J.A. & SHIPMAN,W.H. Effects of whole bee venom and its fractions apamin and melittin) on plasma cortisol levels in the dog. Toxicon, 10: 377-80. 1972. VICK, J.A. et al. Effect of bee venom and melittin on plasma cortisol in the unanesthetized monkey. Toxicon, 10:.581-6. 1972; CHANG, Y. H.; BLIVEN, M. L. Anti-arthritic effect of bee venom. *Agents Actions,* v.9, n.2, p.205-211, 1979; KWON, Y. B.; KIM, H.

W.; HAM, T. W.; YOON, S. Y.; ROH, D. H.; HAN, H. J.; BEITZ, A. J.; YANG, IS. S.; LEE, J. H. The anti-inflammatory effect of bee venom stimulation in a mouse air pouch model is mediated by adrenal medullary activity. *J. Neuroendrocrinol.*, v.15, n.1, p. 93-96, 2003; YOON, S. Y.; KIM, H. W.; ROH, D. H.; KWON, Y. B.; JEONG, T. O.; HAN, H. J.; LEE, H. J.; CHOI, S. M.; RYU, Y. H.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. The anti-inflammatory effect of peripheral bee venom stimulation is mediated by central muscarinic type 2 receptors and activation of sympathetic preganglionic neurons. *Brain Res.,* v.1049, p. 210-216, 2005).

Os resultados de diversos estudos conduzidos em animais experimentais demonstrando o efeito anti-inflamatório da apitoxina 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 da apitoxina que induzem o efeito anti-inflamatório não causam alterações importantes de vários parâmetros fisiológicos, o que indica certo grau de segurança associado ao procedimento. A apitoxina é um dos mais importantes produtos apícolas devido à diversidade de suas atividades farmacológicas, constituindo uma rica fonte de peptídeos biologicamente ativos. Os principais componentes da apitoxina são proteínas (enzimas) de massa molecular entre 19.000 a 170.000 daltons; peptídeos com massas entre 2.000 a 11.500 daltons, entre os quais podem ser mencionados a melitina, apamina, secapina, tertiapina, peptídeo 401, procamina e adolapina, e aminas biologicamente ativas, incluindo a histamina, a dopamina e a norepinefrina (KIM, H. W.; KWON, Y. B.; HAM, T. W.; ROH, D. H.; YOON, S. Y.; KANG, S. Y.; YANG, I. S.; HAN, H. J.; LEE, H. J.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. General pharmacological profiles of bee venom and its water soluble fraction in rodent models. *J. Vet. Sci.* v.5, n.4, p.309-318, 2004; BROADMAN, J. Bee Venom - The Natural Curative for Arthritis and Rheumatism. New York: Putnam and Sons. 1962. 224 p; CHANG,Y.H & BLIVEN,M.L. Anti-arthritic effect of bee venom, Agents Actions, 9: 205-11. 1979; SWITZER, R.C. et al. Anal. Biochem., 98: 231-5. 1979; SZOKAN., G.Y. et al. Liquid chromatographic analysis and separation of polypeptide components from honey bee venoms. J. Liquid Chromatog.,17(16):

3333-49. 1994; VICK,J.A. & BROOKS R. B. JR. Pharmacological studies of the major fractions of bee venom. American Bee .J.: 288-9. 1978).

A melitina, peptídeo que representa 50% da massa seca da apitoxina, apresenta várias atividades, entre as quais podem ser mencionadas estimulação do eixo hipófise-adrenais com liberação de catecolaminas e cortisol, inibição do processo inflamatório, contração de músculos liso e cardíaco isolados, vasodilatação e redução da pressão arterial, anestesia, hemólise e redução da concentração plasmática de colesterol. Foi demonstrado que a melitina se liga à fosfolipase secretada e inibe sua atividade enzimática, o que pode contribuir para a sua atividade anti-inflamatória (SAINI,S.S. et al. Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 238 (2): 436-42. 1997).

A apamina é outro componente ativo da apitoxina, presente em menor proporção (2-3%). É fortemente básica, como a melitina, mas não apresenta atividade hemolítica. A apamina estimula o sistema nervoso central e, quando injetada por via intravenosa em ratos, induz hipermotilidade e convulsões, seguidas por parada respiratória e morte (ORLOV,B. N. et al. Sur quelques proprietes du venin d'abeille. XXVIII Apimondia Congress, Acapulco, Mexico, p.472 (abstract)1998; SZOKAN, 1994).

A fosfolipase A2, representando 10 a 12% da massa seca da apitoxina, é o principal alérgeno e apresenta marcante atividade inflamatória. A fosfolipase A2 catalisa a clivagem dos fosfolipídeos das membranas celulares, induz efeito hipotensor, inibe a atividade da tromboquinase com ação anticoagulante e apresenta propriedades antibacteriana e antiviral (BLASER, K. et al. Determinants and mechanisms of human immune responses to bee venom phospholipase A2. Int. Arch. Allergy Immunol., 117 (1): 1-10. 1998; COTTRELL, R.C. Phospholipase A2 from bee venom. Methods Enzymol., 71: 698-702. 1981; DHILLON, M et al. Mapping human T cell epitopes on phospholipase A2: the major bee-venom allergen. J. Allergy Clin. Immunol., 90 (1): 42-51. 1992).

A hialuronidase, presente em menor proporção (1,5 a 2%), despolimeriza o ácido hialurônico dos tecidos, o que facilita a distribuição da apitoxina, e apresenta elevada atividade alergênica. As reações alérgicas, que atingem cerca de 1-2% da população, são atribuídas, principalmente, às enzimas fosfolipase A2 e hialuronidase (MACHL, M. & KREIL, G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 (8): 3569-73. 1993).

A apitoxina é um produto que pode se tornar extremamente importante para a terapia da artrite reumatoide e da osteoartrite e de grande valor no mercado internacional.

A artrite reumatóide é uma doença de difícil tratamento e até o momento não existe cura para ela. O tratamento tem como objetivos: aliviar a dor, reduzir a inflamação, minimizar os efeitos colaterais indesejáveis, preservar a força e a massa muscular (atrofias são freqüentes) e o retorno ao estilo de vida normal do paciente o mais rapidamente possível.

Os antiinflamatórios não esteróides (AINEs) são a base do tratamento e dentre eles destaca-se o uso de ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno, indometacina, piroxicam, diclofenaco e atualmente, existe um aumento da utilização de antiinflamatórios não esteróides inibidores seletivos da cicloxigenase-2 (COX-2). Os efeitos colaterais destas drogas podem tornar-se um problema terapêutico e os mais comuns são: irritação gastrointestinal, reações na pele, aumento do tempo de coagulação sangüíneo, toxicidade hepática reversível e comprometimento da função dos rins.

Além disso, foi estimado, com base na média dos preços praticados nas compras realizadas por seis estados durante o ano de 2005, o custo mensal para tratar a população com os três principais medicamentos utilizados em casos de artrite leve ou moderada. Este cálculo teve como base os dados de compras fornecidos pelo Banco de Compras em Saúde do MS (BRASIL, 2005), utilizando a média da dosagem indicada para cada um desses medicamentos segundo o Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas de Artrite Reumatóide (BRASIL, 2002). Por ser a artrite uma doença que não tem notificação compulsória não se sabe ao certo o número de pacientes tratados pelo SUS.

No entanto, é sabido que 1,5 milhões de brasileiros têm artrite reumatóide. Alguns dados estimam que o tratamento de pelo menos 10 % dessa população (150.000 pessoas) custaria aos cofres públicos 11.160.000.000 de reais por mês. Ressalta-se ainda que o tratamento da artrite é mantido por longos períodos, podendo a prescrição desses medicamentos variar de meses a anos e que esses medicamentos pertencem a lista de Medicamentos de Alto Custo do Ministério da Saúde.

O uso da apitoxina no tratamento dessa doença é muito antigo e veio provavelmente da observação de que os primeiros apicultores recebiam muitas picadas e não tinham problema de reumatismo. A picada natural da abelha também é um método empregado, principalmente por acupunturistas; apesar de letal em grande quantidade, é um consagrado medicamento contra artrites, tendinite, bursite e esclerose múltipla.

O mecanismo de ação dos efeitos antiartríticos do veneno de abelha e da melitina (o principal peptídeo do veneno) foi investigado em cultura de macrófagos murinos in vitro (linhagem Raw 264.7). Estudos in vivo sobre animais experimentalmente inoculados com carragenina (modelo de inflamação aguda) e adjuvante de Freund (modelo de artrite crônica) foram também conduzidos (Park et al., 2004). O veneno e a melitina reduziram os efeitos da inflamação e artrite induzidas pela carragenina e adjuvante de Freund, respectivamente. Estes dados experimentais foram consistentes com efeitos inibitórios in vitro sobre o aumento da expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2), fosfolipase A2, sintetase NO, produção de prostaglandina E2 e óxido nítrico. Demonstrando, assim, o potencial farmacêutico da apitoxina na cura dos processos de artrites.

A revisão de patentes de produtos que utilizam veneno de abelha *Apis mellifera*, nos mostra a carência de medicamentos que utilizem frações de apitoxina ativas e de baixa alergenicidade. No Brasil encontramos dois registros de patentes de medicamentos para uso humano e veterinário sob o número: PI0105866-5, PI9505366-2, todos com formulação de cremes e pomadas a base de veneno de abelha na forma bruta, os quais oferecem risco de desencadear um processo alérgico nos usuários. Na Alemanha existe um

produto a base de veneno de abelha de frações não identificadas, com registro de patente GB425543, o qual é indicado para doenças reumáticas.

A apitoxina é um produto que pode se tornar extremamente importante para a terapia da artrite reumatóide e da osteoartrite 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.

Nesse sentido, a presente invenção obteve frações da apitoxina que associam a ação terapêutica com alergenicidade reduzida, visando a produção de uma formulação mais efetiva no tratamento de condições inflamatórias e dolorosas, em especial artrites. A invenção ora proposta ainda contempla o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para a composição desenvolvida, preferencialmente formas semi-sólidas ou líquidas, tais como pomada, cremes ou géis.

Breve descrição das Figuras

Figura 1 – A- Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando o perfil de purificação da fração FAM por ultrafiltração: 1. Apitoxina total; 2. Fração ativa FAM purificada em ultrafiltração. B- Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando o perfil de purificação de fração ativa FAM por ultrafiltraçaõ: 1. Apitoxina total; 2 Fração ativa FAM; 3. Retido.

Figura 2 - Cromatograma da gel filtração da apitoxina total. Observa-se o perfil cromatográfico padrão das apitoxinas utilizadas antes do processo de ultrafiltração. (1) corresponde às frações com massa molecular acima de 10,000 Daltons (1) e (FAM) corresponde às frações menores do que 10,000 Daltons.

Figura 3 - Cromatograma da gel filtração da fração ativa (FAM) da apitoxina. Nesta Figura observa-se o perfil cromatográfico padrão da fração obtida através do processo de ultrafiltração em membranas. Observa-se que os componentes da apitoxina de maior peso molecular, fração 1 da Figura 1, não estão presentes.

Figura 4 - Efeito da administração prévia (30 min) da apitoxina (VAM 2, 4 ou 6 mg/kg) ou o veículo, por via s.c. no dorso de camundongos, nas duas fases da resposta nociceptiva induzida por formaldeído. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $P < 0,05$ ($n = 7 - 8$). A segunda fase da resposta nociceptiva foi inibida em maior extensão do que a primeira fase (82 e 40 % de inibição máxima, respectivamente).

Figura 5 - Efeito induzido pela fração FAM sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído. A fração (2, 4 ou 6 mg/Kg) ou o veículo foram administrados 30 min antes da injeção de formaldeído. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $P < 0,05$ ($n = 7 - 8$).

Figura 6 - Efeito induzido pela melitina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído. A melitina (1, 2 ou 3 mg/Kg) ou o veículo foram administrados 30 min antes da injeção de formaldeído.
(*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $P < 0,05$ ($n = 7 - 8$).

Figura 7 - Efeito induzido pela apitoxina (VAM), fração com massa molecular inferior a 10.000 daltons (FAM) ou melitina sobre o edema de pata induzido por formaldeído. A apitoxina (6 mg/Kg), a fração (6 mg/Kg), a melitina (3 mg/Kg), a dexametasona (2 mg/Kg) ou o veículo foram administrados por via s.c. no dorso dos animais 30 min antes de injeção do formaldeído. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $P < 0,05$ ($n = 7 - 8$).

Figura 8 - Efeito induzido pela apitoxina sobre a resposta nociceptiva induzida pelo calor no modelo da placa quente. A apitoxina (VAM 2, 4 ou 6 mg/Kg), a morfina (10 mg/Kg) ou o veículo foram administrados 30 min antes da exposição ao estímulo nocivo ($n = 7 - 8$). * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $P < 0,05$ ($n = 7 - 8$).

Figura 9 - Efeito induzido pela fração com massa molecular inferior a 10.000 daltons sobre a resposta nociceptiva induzida pelo calor no modelo de placa quente. A FAM (2, 4 ou 6 mg/Kg), a morfina (10 mg/kg) ou o veículo foram administrados 30 min antes da exposição ao estímulo nocivo. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $P < 0,05$ ($n = 7 - 8$).

Figura 10 - Efeito induzido pela melitina sobre a resposta nociceptiva induzida pelo calor no modelo da placa quente. A melitina (3 mg/Kg), a morfina (10 mg/kg) ou o veículo foram administrados 30 min antes da exposição ao estímulo nocivo. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $P < 0,05$ (n = 7 - 8).

Figura 11 - Efeito induzido pela apitoxina (VAM), fração com massa molecular inferior a 10.000 daltons (FAM) ou melitina sobre o tempo de permanência na haste girante. A apitoxina (6 mg/Kg), a fração (6 mg/Kg), a melitina (3 mg/Kg), o fenobarbital (FENO; 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 = 7 - 8).

Figura 12 - Níveis de IL-10 obtidos em triplicata de plasma para cada animal tratado com o veneno bruto (Vb) ou com veículo (C).

Figuras 13 - Níveis de TNF-alfa detectado no plasma do grupo tratado com veneno (Vb) ou com veiculo (C).

Descrição detalhada da invenção

Os métodos de extração e ou obtenção da apitoxina diretamente das colméias, foram baseados em estímulo elétrico, evitando que o inseto perdesse 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 a apitoxina na placa coletora.

Os enxames para a produção da apitoxina devem ser bem populosos, com boa postura da rainha e bons produtores de própolis. O teor de umidade e a temperatura do ambiente são diretamente proporcionais à quantidade de apitoxina obtida em cada coleta, ou seja, quanto maior a umidade e temperatura, maior será a quantidade de apitoxina obtida. A apitoxina ejetada pelas abelhas nas placas coletoras foi retirada dentro de aproximadamente 5 horas, evitando exposição excessiva desta com o meio ambiente, protegendo-a 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 apitoxina foram instalados a cada 10 dias, permitindo a coleta de 0,5 a 1,8 gramas durante um período de aproximadamente 5 horas. A apitoxina, ao ser ejetada, tem aspecto líquido e cristaliza-se após tomar contato com o ar. Após a coleta em campo, as placas de vidro foram retiradas e transportadas em caixa térmica até o laboratório ou cômodo apropriado, para raspagem da apitoxina em condições assépticas. Em caso de armazenamento, a apitoxina deve ser acondicionada em frascos âmbar, hermeticamente fechados, por um período de até um ano em freezer sob temperatura aproximada de - 20 °C. A apitoxina armazenada nas condições citadas acima apresenta teor de umidade dentro dos parâmetros exigidos pela legislação vigente e atende aos requisitos mínimos de qualidade estabelecidos na Instrução Normativa N° 3 de 19 de janeiro de 2001 / Ministério da Agricultura (POP- Extração e manipulação de veneno de abelhas ***Apis mellifera***).

Obtenção de frações da apitoxina

A obtenção e a purificação das frações da apitoxina, contendo componentes bioativos de massa molecular reduzida e baixa alergenicidade, foram feitas por meio da técnica de ultrafiltração em membrana de fibra oca, que separa os componentes da amostra pela diferença de suas massas moleculares (Figuras 1 e 2). A seguir, estão indicadas as etapas envolvidas:

1. A apitoxina foi retirada do freezer (-20 °C) e deixada em repouso até atingir temperatura ambiente (±20 °C). A massa da apitoxina foi determinada em balança analítica e duas porções de 10 mg foram colocadas em pesa-filtros.

2. Os pesa-filtros foram colocados em estufa a 110 °C e deixados por 2 h para a quantificação da umidade, conforme Instrução Normativa Nº 3, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, publicada no DOU de 23/01/01, seção 1, páginas 18-23 do Ministério da Agricultura.

3. Outras duas porções foram separadas para análise do conteúdo de atividade fosfolipásica, conforme técnica descrita por Marinetti, G.V. (1965). The action of phospholipase A on lipoproteins – Lipids and Lipids

Metabolism. Biochimica et Biophysica Acta, 98 (3):554-565. A técnica se baseia na atividade fosfolipásica da amostra sobre uma solução de gema de ovo em salina. A solução de gema de ovo sem adição da amostra (controle) e com adição das amostras é colocada em banho-maria a 41°C e leituras da absorbância das soluções são medidas em espectrofotômetro a 900nm aos: 0 minutos, 5 minutos e 10 minutos de incubação. Se não houver atividade fosfolipásica a solução de gema de ovo permanece com leitura de absorção constante ou maior que a medida inicial. Se houver atividade fosfolipásica na amostra haverá uma queda na medida de absorção.

4. Outra porção foi pesada separadamente e uma solução de 1 mg/mL foi preparada usando água como solvente. A solução de apitoxina foi centrifugada a 10.000 g por 30 min a 4°C e o sobrenadante retirado e filtrado em filtro de papel Whatman n°4. O conteúdo protéico desta solução de apitoxina foi calculado conforme método de Lowry.

5. Utilizando o valor de proteína determinado pelo método de Lowry, o restante da apitoxina foi utilizado para preparar uma solução de 50 mg/mL.. Foi utilizado como solvente tampão formiato de amônio ou acetato de amônio, 0,1 a 1,0 M, sendo melhor a concentração próxima de 0,5 M. O pH foi entre 2,0 e 8,0, sendo melhor o pH abaixo de 5.0 Para a total dissolução dos componentes solúveis, foi utilizado um vórtex ou um agitador magnético, evitando a formação de espuma. A apitoxina não foi totalmente dissolvida porque contém impurezas.

6. A solução acima foi centrifugada a 10.000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e filtrado em filtro de papel, marca Whatman, nº4 e o filtrado límpido foi esterilizado por meio de filtração em filtro de 0,22 µ. O filtrado foi então levado ao sistema de fracionamento.

7. O volume da solução de apitoxina esterilizada contendo 50 mg/mL foi medido para se obter o volume total. A solução foi filtrada em sistema de filtração tangencial utilizando se equipamento de filtros hollow fiber (fibra oca) com corte nominal de massa molecular de 10.000 Daltons. A filtração foi realizada até que o volume do filtrado atingiu o volume igual à metade do

volume inicial. Uma pequena alíquota foi retirada do retido para o cálculo do valor de proteína, conforme método de Lowry. O conteúdo proteico deve ser igual à metade do valor inicial. Se for maior, a filtração deve ser continuada até que este valor atinja entre 40% e 50% do valor inicial. Por dedução, o filtrado deverá conter a outra quantidade de proteína, geralmente entre 50% e 60 % do valor protéico inicial. A pressão do sistema de filtração tangencial foi mantida entre 5 a 12 psi, sendo que a pressão próxima de 7 psi foi a melhor. A concentração de proteína do filtrado, fração FAM, é determinada indiretamente por meio da subtração do conteúdo protéico da solução, antes da ultrafiltração, pelo conteúdo protéico do material retido após a ultrafiltração.

8. Alíquotas do retido e do filtrado foram retiradas para análise da purificação em eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% com SDS sem redução. As amostras do gel (Figura 1) são: alíquota da apitoxina total e alíquota da fração com atividade (FAM) obtida por ultrafiltração. A Figura 2 mostra a apitoxina total, contendo a fração FAM e o retido no hollow fiber. O resultado do eletroferograma deve mostrar a separação de componentes da apitoxina por massa molecular. A apitoxina deve conter as frações com massa molecular acima de 10,000 Daltons (1) e frações menores do que 10,000 Daltons (FAM).

9. O filtrado foi novamente testado para atividade fosfolipásica (Marinetti, G.V.,1965; The action of phospholipase A in lipoproteins- Lipids and Lipids Metabolism. Biochimica et Biophysica Acta, 98(3):554-565). A Tabela 1 mostra os resultados da fração retida na ultrafiltração e da fração ativa, FAM, filtrada no filtro de fibra oca. Não havendo atividade ou apenas uma pequena atividade residual, os componentes da apitoxina com massa molecular abaixo de 10000 Daltons já podem ser usados na formulação do medicamento.

Tabela 1 - Atividade fosfolipasica da fração retida no processo de ultrafiltração e da fração ativa, FAM filtrada no processo de ultrafiltração.

Amostra	Leitura em 900 nm		
	0 minutos	5 minutos	10 minutos
Retida diluída 1:20	1,0	0,51	0,49
Retida diluída 1: 80	1,0	0,50	0,49
FAM diluída 1:20	0,89	0,8	0,76
FAM diluída 1:80	0,90	0,80	0,79

Os resultados da eletroforese e da ultrafiltração mostram que houve a separação da apitoxina em componentes de alto peso e baixo peso molecular. Este último é a fração com atividade e é chamada de FAM. Na Tabela 1 observa-se que a fração retida apresentou alta atividade fosfolipásica, com a diminuição da absorbância para valores iguais à metade do valor inicial. A fração filtrada, FAM, apresentou baixa atividade fosfolipásica. Não se observa diminuição significativa da absorção da solução de gema de ovo com a FAM. A purificação da melitina foi obtida em alto grau de pureza.

Controle de qualidade da apitoxina

Para o controle de qualidade foram utilizados os métodos descritos na Instrução Normativa do Ministério da Agricultura e também o perfil cromatográfico em coluna de Sephacryl peptide. A apitoxina foi dissolvida no mesmo tampão volátil utilizado para a formulação do medicamento. A coluna usada foi a Sephacryl peptide. O volume de 100 µL da apitoxina ou da fração FAM na concentração de 50 mg/mL foram aplicados na coluna e a eluição foi feita com o mesmo tampão sem gradiente. Utilizou-se o programa do cromatógrafo para a análise do número de picos e de suas proporções. Este perfil e as proporções dos picos eluídos foram utilizados como forma de controle de qualidade (Figuras 1 e 2).

Da mesma forma, foi feito o controle de qualidade das apitoxinas filtrada e retida. Na fração da apitoxina retida, os picos devem ser correspondentes aos componentes com massa molecular acima de 10000 Daltons, como a fosfolipase e a hialuronidase. Na fração da apitoxina filtrada, os picos devem ser correspondentes aos componentes com massa molecular abaixo de 10000 Daltons, como a melitina e a adolapina.

Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído

O modelo de formaldeído permite a avaliação do efeito induzido por drogas de ação central ou periférica que inibem ou facilitam a resposta nociceptiva. A resposta dos animais à administração s.c. de formaldeído (0,92%, 20 μl) no dorso da pata direita posterior apresenta duas fases de comportamento nociceptivo que parecem envolver diferentes mecanismos. A primeira fase começa imediatamente após a injeção de formaldeído, dura em torno de 5 min e, provavelmente, envolve a estimulação química direta dos nociceptores por meio de receptores específicos, entre eles o $TRPA_1$. Em seguida, há um período de 5 a 10 min, no qual os animais apresentam um reduzido comportamento sugestivo de nocicepção. A segunda fase do comportamento nociceptivo começa aproximadamente 15 min após a injeção de formaldeído, dura em torno de 30 min, no caso de camundongos, e está relacionada, com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória local e também com a ativação direta dos receptores $TRPA_1$ que induzem a sensibilização de nociceptores C e, consequentemente, de neurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal.

Nesse modelo, o controle da temperatura ambiente é importante, pois a segunda fase da resposta nociceptiva é bastante reduzida quando o experimento é realizado em temperatura ambiente inferior a 23°C.

No dia do experimento, os animais foram colocados sob funis de vidro (18 cm de diâmetro e 14 cm de altura) cerca de 30 min antes da administração de formaldeído, para ambientação. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias de massa corporal dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. A apitoxina, a fração e a melitina, foram administrados no dorso dos animais 30 min antes da injeção de formaldeído para avaliar os efeitos induzidos sobre a resposta nociceptiva.

Na Figura 4 pode-se observar que a administração prévia (30 min) da apitoxina (2, 4 ou 6 mg/kg), por via s.c. no dorso de camundongos, inibiu as duas fases da resposta nociceptiva induzida por formaldeído. A segunda fase da resposta nociceptiva foi inibida em maior extensão do que a primeira fase (82 e 40 % de inibição máxima, respectivamente).

Na Figura 5 observa-se que a fração da apitoxina com massa molecular inferior a 10.000 daltons (2, 4 ou 6 mg/Kg), administrada por via s.c. no dorso dos camundongos, 30 min antes da injeção de formaldeído, inibiu a segunda fase da resposta nociceptiva.

Na Figura 6 observa-e que a melitina (2 ou 3 mg/Kg), administrada por via s.c. no dorso dos camundongos, 30 min antes da injeção de formaldeído, inibiu a segunda fase da resposta nociceptiva.

Já a Figura 7 mostra que a administração prévia (30 min) da apitoxina (6 mg/Kg), mas não da fração com massa molecular inferior a 10.000 daltons (6 mg/Kg), melitina (3 mg/Kg) ou dexametasona (2 mg/Kg), inibiu o edema de pata induzido por formaldeído em camundongos.

Avaliação da resposta nociceptiva induzida pelo calor – modelo da placa quente

Antes da realização do experimento, os camundongos foram colocados sobre a superfície não aquecida para ambientação. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias de massa corporal dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. No momento do teste, os camundongos foram colocados, individualmente, sobre uma placa metálica aquecida (54 °C), 30 min após injeção s.c. da apitoxina, da fração FAM ou da melitina. A temperatura da placa foi constantemente monitorada por um termômetro em contato direto com a superfície. O tempo para que os animais agitassem, lambessem as patas ou saltassem foi determinado e considerado como a latência para a resposta nociceptiva. O tempo de corte foi de 30seg. a fim de evitar a ocorrência de lesão tecidual.

A administração prévia (30 min) da apitoxina (4 ou 6 mg/kg), por via s.c. no dorso dos camundongos, inibiu a resposta nociceptiva induzida pelo calor no modelo da placa quente (Figura 8).

A administração prévia (30 min) da fração com massa molecular inferior a 10.000 daltons (4 ou 6 mg/kg), por via s.c. no dorso dos camundongos, não alterou a resposta nociceptiva induzida pelo calor no modelo da placa quente (Figura 9).

Ainda, a administração prévia (30 min) da melitina (3 mg/kg) por via s.c. no dorso dos camundongos, não alterou a resposta nociceptiva induzida pelo calor no modelo da placa quente (Figura 10).

Avaliação da atividade motora

O teste da haste girante é utilizado para examinar possíveis deficiências da função motora que poderiam resultar de efeito depressor central ou relaxamento da musculatura esquelética. O aparelho para realização deste teste consiste de uma haste de 2,3 cm de diâmetro, dividida em cinco áreas por discos. Durante o teste, a haste gira a uma velocidade de 20 rotações por min (rpm). O tempo de corte para este teste foi de 120 s. Os animais foram submetidos a treinamentos sobre a haste na velocidade e duração especificadas acima, diariamente, durante sete dias antes do início do experimento. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias de massa corporal dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. A coordenação motora foi considerada sem prejuízo para aqueles animais que alcançaram o tempo mínimo de 120 s sobre a haste. Após a determinação dos tempos de permanência basais, os animais foram tratados com a apitoxina, a fração ou a melitina, 30 min antes do início do teste.

A apitoxina (6 mg/kg), a fração com massa molecular inferior a 10.000 daltons (6 mg/Kg) ou a melitina (3 mg/kg), administradas por via s.c. no dorso dos camundongos, 30 min antes, não alteram o tempo de permanência dos animais na haste girante (Figura 11).

Avaliação do edema de pata induzido por formaldeído

O volume da pata posterior direita foi determinado antes de qualquer tratamento por meio de um pletismômetro (Modelo 7140, Ugo Basile, Itália). A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias dos volumes de pata basais dos diversos grupos fossem similares. A apitoxina, a fração ou a melitina foram administradas por via s.c. no dorso dos animais, 30 min antes da injeção de formaldeído (0,92%, 20 µl) no dorso da pata posterior direita. O creme contendo apitoxina ou a fração foi aplicado sobre a pata posterior direita de camundongos anestesiados 30 min antes da injeção

de formaldeído. O volume da pata foi novamente determinado 30 e 60 min após a injeção do formaldeído. As medições foram feitas em duplicata. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Efeito induzido pela aplicação tópica de creme contendo apitoxina sobre o edema de pata induzido por formaldeído. A apitoxina (0,225, 0,45 ou 0,9 ml) ou o veículo foram aplicados sobre a pata posterior direita de camundongos anestesiados 30 min antes de injeção do formaldeído.

Tratamento	Edema (µl)	% de inibição
Veículo	56±14	-
Apitoxina 0,225 ml	47 ±12	16
Apitoxina 0,45 ml	43±9	23
Apitoxina 0,9 ml	18±12	68

Tabela 3 - Efeito induzido pela aplicação tópica de fração sobre o edema de pata induzido por formaldeído. A fração (0,225, 0,45 ou 0,9 ml) ou o veículo foram aplicados sobre a pata posterior direita de camundongos anestesiados 30 min antes de injeção do formaldeído.

Tratamento	Edema (µl)	% de inibição
Veículo	65±13	-
Fração 0,225 ml	49±9	25
Fração 0,45 ml	38±11	42
Fração 0,9 ml	32±8	51

Determinação da concentração de mediadores inflamatórios na pata de camundongos após a injeção intraplantar de carragenina

Após o tratamento com as drogas em investigação, carragenina (1%, 20 µl) foi injetado por via intraplantar na pata direita posterior. Quatro horas depois, foi feita a eutanásia dos animais e um fragmento de pele adjacente ao local da injeção de carragenina foi removido e sua massa determinada. O fragmento foi homogeneizado em 1 ml de tampão fosfato gelado (pH=7,4) por 1 min. Em seguida, feita centrifugação (3.000 rpm, 5 min) e o sobrenadante

coletado e armazenado em congelador – 70 °C. As concentrações do mediador inflamatório TNF-alfa, (avaliação indireta por meio da determinação da concentração de nitrato), bem como de uma citocina com atividade antiinflamatória (IL-10) foram determinadas por meio de kits específicos para cada mediador (R&D Systems).

Quantificação de Citocinas

A quantificação de citocinas como TNF-alfa e IL-10 foram realizadas utilizando o método de ELISA (Francischi, J. N., C. M. Yokoro, S. Poole, W. L. Tafuri, F. Q. Cunha, and M. M. Teixeira. 2000. Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. *Eur. J. Pharmacol. 399:243;* Poole, S., A. F. Bristow, S. Selkirk, and B. Rafferty. 1989. Development and application of radioimmunoassays for interleukin-1 and interleukin-1. *J. Immunol. Methods. 116:259*; Souza, D. G., Rodrigo Guabiraba,R., Pinho,V. Adrian Bristow, A., Poole,S. and M. M. Teixeira. IL-1-Driven Endogenous IL-10 Production Protects Against the Systemic and Local Acute Inflammatory Response Following Intestinal Reperfusion Injury1. *The Journal of Immunology.* **170**(9):4759-66. 2003). Os resultados estão mostrados nas Figuras 12 e 13. Resumidamente, amostras de soro foram obtidas através do sangue coletado do animal que foi incubado por 15 minutos a 37ºC e então 30 minutos a 4ºC. Este soro foi estocado a -20ºC até posterior utilização. As amostras de soro analisadas foram diluídas 1/1 em tampão fosfato salina (PBS). Amostras de tecido foram pesadas e 100 mg foram homogeneizados em 1 mL de PBS (tampão fosfato 10 mM pH 7,4 contendo de NaCl 0,15 M, inibidores de proteinases PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e 20 kU de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000xg e o sobrenadante foi utilizado no ensaio de ELISA diluído 1/5 em PBS. Placas de ELISA foram sensibilizadas por uma noite com anticorpos policlonais anti-IL-10 e anti-TNF-alfa de camundongo (1-2 µg/mL). No dia seguinte as placas foram lavadas por três vezes e bloqueadas com BSA 1%. Após nova lavagem as placas foram incubadas com as amostras ou citocinas (controle positivo) por uma noite. Os anticorpos policlonais biotinilados foram utilizados de acordo com a recomendação do fabricante.

A Figura 12 mostra que os níveis de IL-10 no grupo tratado apenas com veículo foi significativamente menor ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo tratado com veneno. Os dados sugerem 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 rachuradas respectivamente. Esses dados são concordantes com os achados histo-patológicos observados 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 veneno.

Na Figura 13 observamos que os níveis de TNF-alfa são significativamente menores no grupo tratado com veneno ($p < 0,001$), em comparação aos dados obtidos para o grupo controle. 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 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.

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 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.

Purificação da melitina:

O componente encontrado em maior proporção na apitoxina, melitina, foi isolado através de coluna de afinidade utilizando a resina Heparina Sepharose CL-6B (GE). Banks, B. E. C. et al,. New methods of isolating bee venom peptides. Analytical Biochemistry, 116, 48-52, 1981. A apitoxina foi utizada na concentração de 40 mg por ml. Foi aplicado na coluna 80 mg de apitoxina em 2 mL dissolvida em tampão fosfato de sódio, 0,2 M pH 6.8. Os componentes não ligados à resina foram eluídos com um volume de coluna do tampão inicial. Em seguida iniciou-se um gradiente de NaCl de 0 a 2M. A melitina sai com o gradiente de NaCl, como mostrado na Figura 14. As frações contendo a melitina foram misturadas diafiltradas contra água milliQ em membranas de 1kDa de ponto de corte (Figura 14).

REIVINDICAÇÕES

1. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO FRAÇÃO DE APITOXINA** caracterizada por compreender componentes com massa molecular abaixo de 10.000 Daltons e ao menos um carreador farmacêutica e fisiologicamente aceitável.

2. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO FRAÇÃO DE APITOXINA** de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelos componentes com massa molecular abaixo de 10,000 Daltons serem selecionados do grupo compreendendo melitina, apamina, secapina, tertiapina, peptídeo 401, procamina e adolapina.

3. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO FRAÇÃO DE APITOXINA** de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo componente com massa molecular abaixo de 10,000 Daltons ser preferencialmente metilina.

4. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO FRAÇÃO DE APITOXINA** de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizada por se apresentar nas formas semi-sólidas ou líquidas preferencialmente pomadas, cremes ou géis.

5. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO FRAÇÃO DE APITOXINA** de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizada por ser administrada pelas vias tópica, intradérmica, intramuscular, intravenosa, subcutânea, oral ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados.

6. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO FRAÇÃO DE APITOXINA,** de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizada por apresentar propriedades analgésicas, capacidade de imunomodulação, inibir a resposta inflamatória exacerbada e baixa alergenicidade.

7. **USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO FRAÇÃO DE APITOXINA** caracterizado por ser na preparação de um medicamento analgésico e antiinflamatório.

8. **USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO FRAÇÃO DE APITOXINA** de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por ser na preparação de um medicamento para o tratamento de distúrbios inflamatórios e dolorosos, preferencialmente no tratamento de artrite reumatóide.

FIGURAS

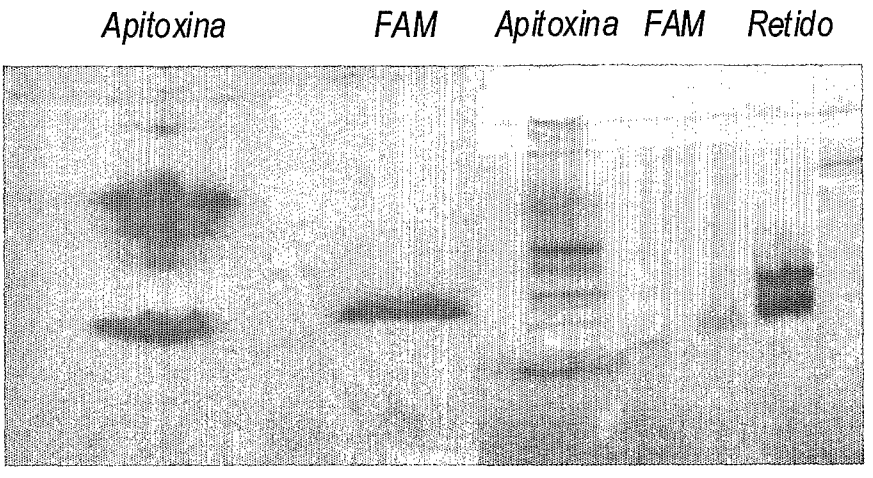


Figura 1

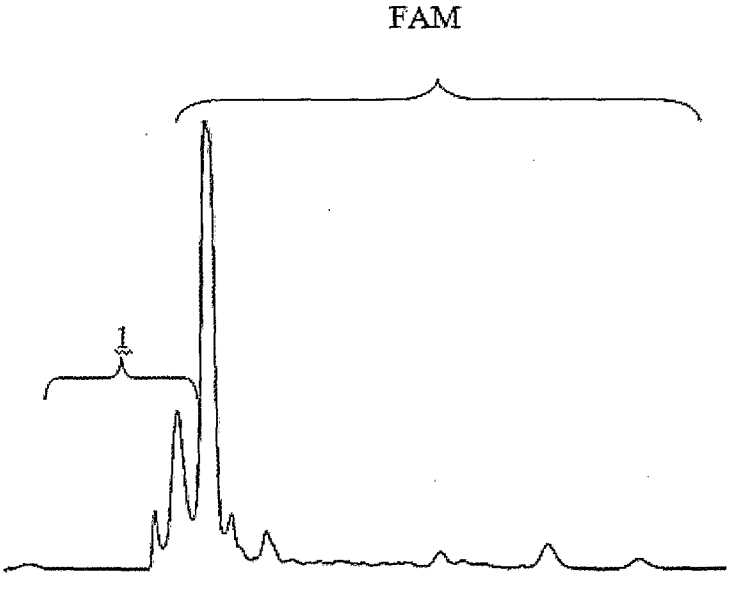


Figura 2

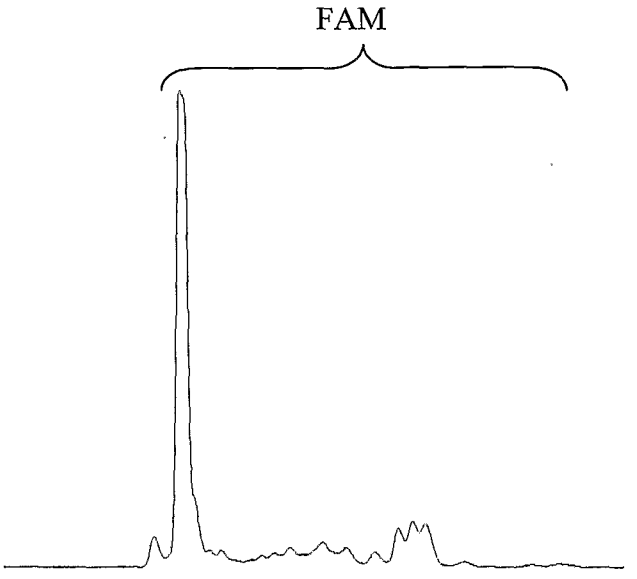


Figura 3

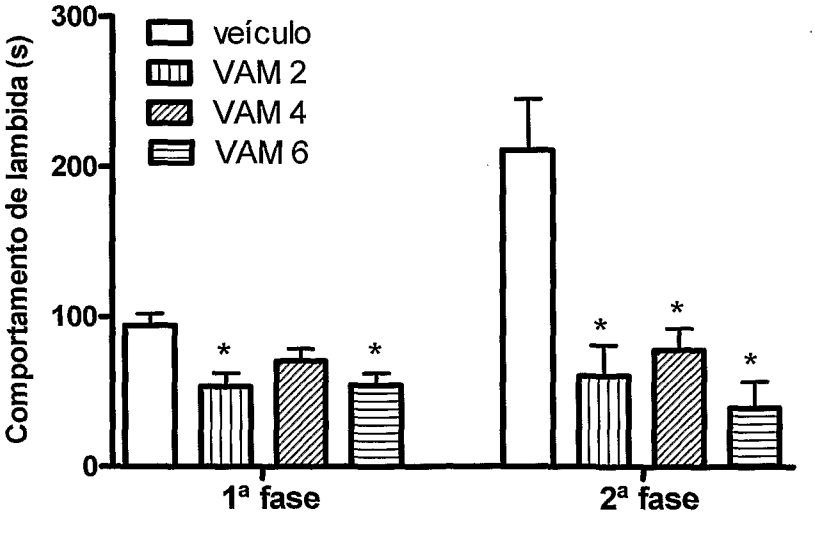


Figura 4

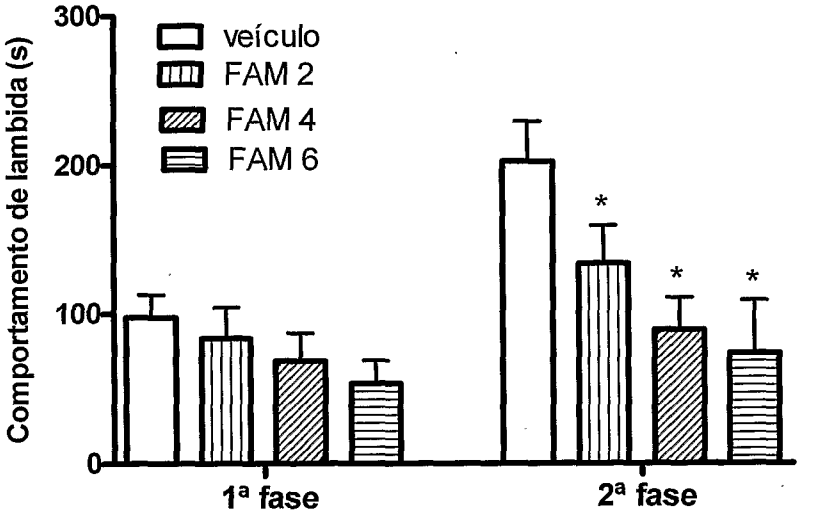


Figura 5

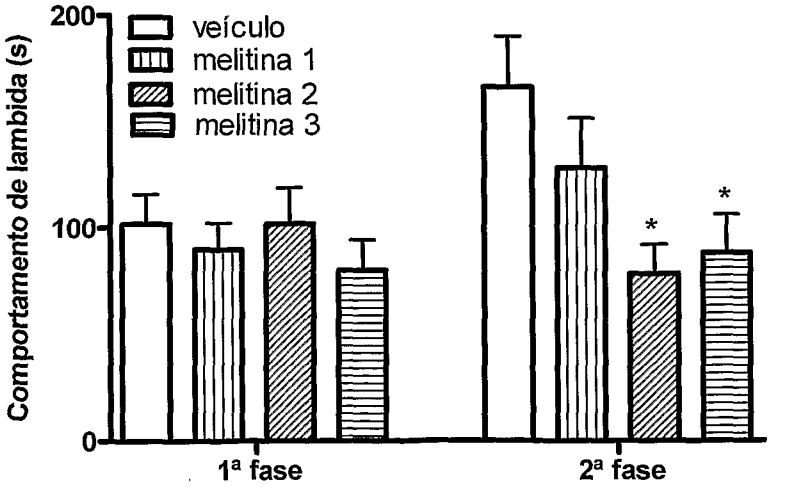


Figura 6

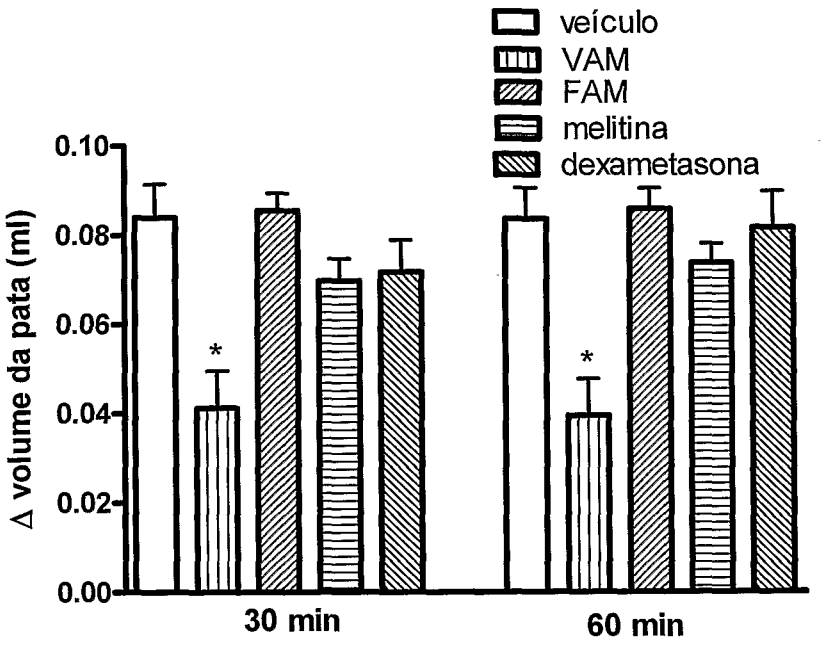


Figura 7

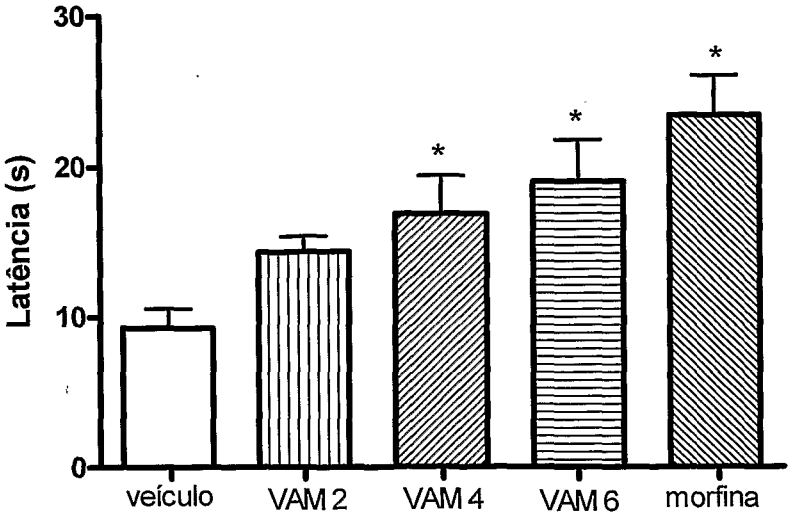


Figura 8

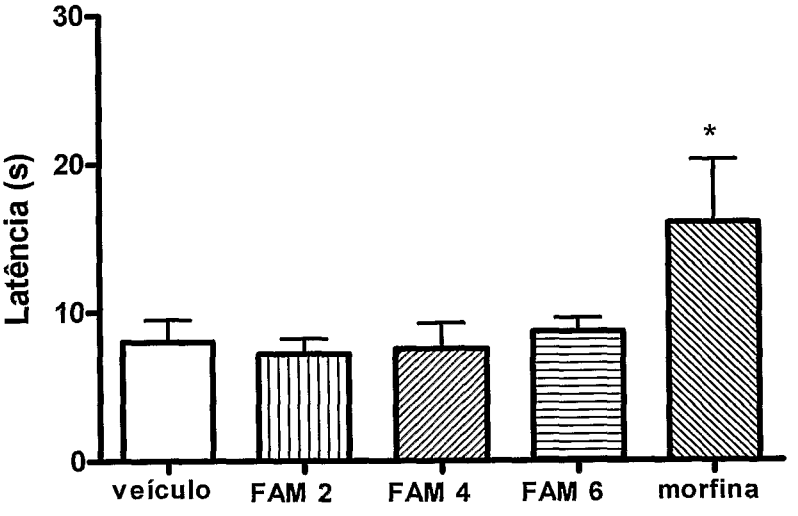


Figura 9

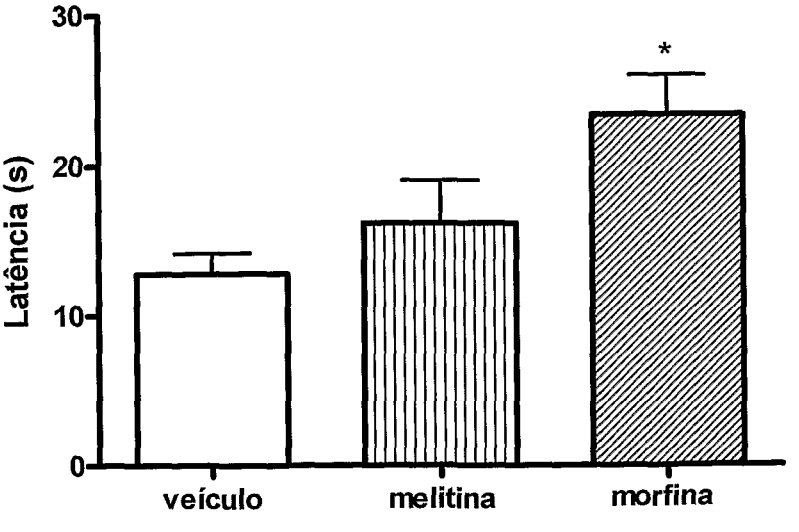


Figura 10

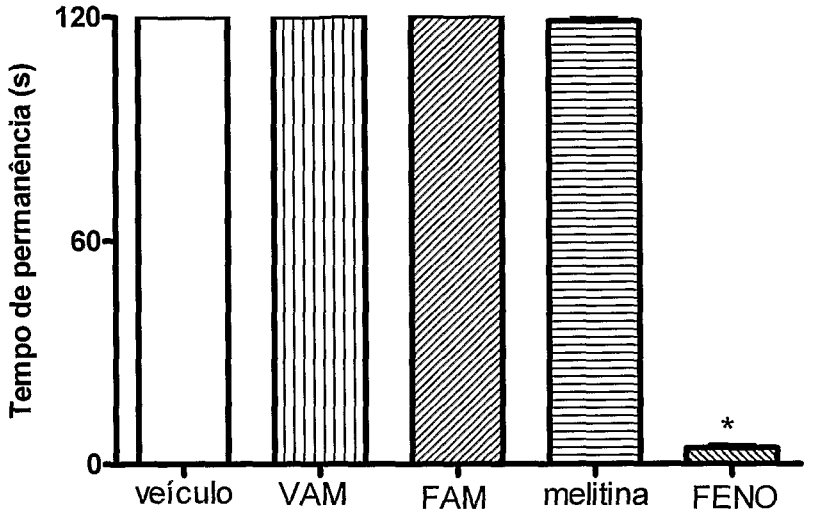


Figura 11

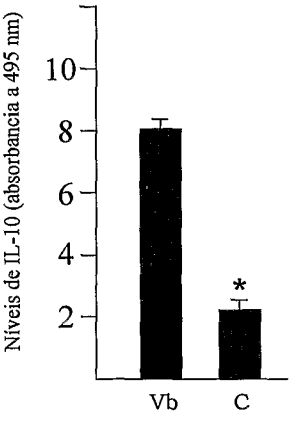


Figura 12

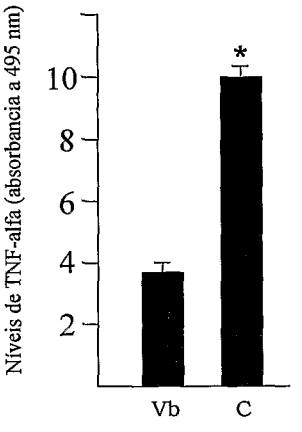


Figura 13

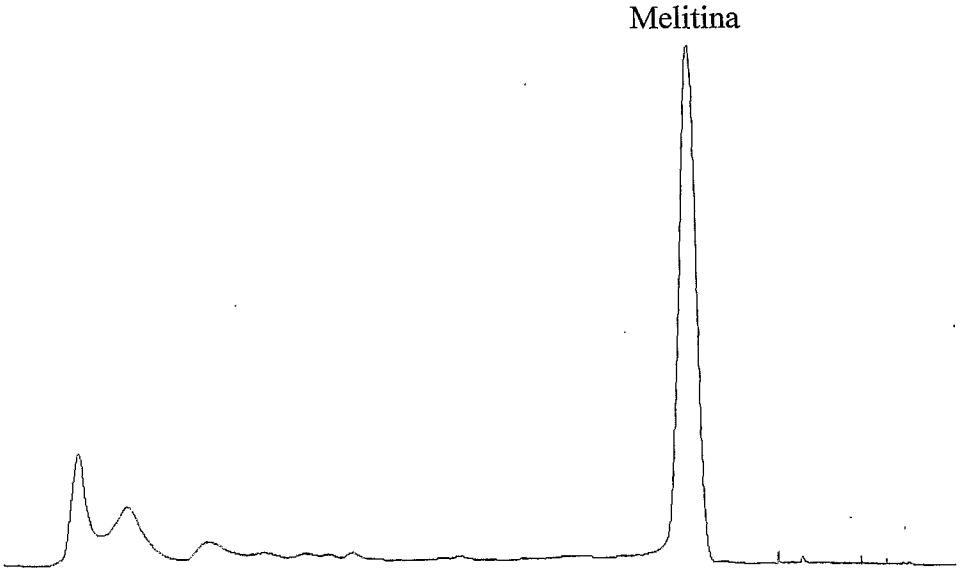


Figura 14

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº
PCT/BR 2010/000337

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

IPC[8]: ***A61K 9/00*** (2006.01); ***A61K 38/00*** (2006.01); ***A61P 19/02*** (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMINIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

IPC[8]: A61K

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPODOC, WPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	KR 2003/0026610 A (HAN H J) 3 **Abril** 2003 (03.04.2003) **Resumo de WPI**	1-4, 7, 8
	--	
X	RU 2279888 A (FEDOSEEVA V N) 20 **Julho** 2006 (20.07.2006) **Resumo de WPI**	1, 7, 8
	--	
X	WO 2009/081440 A2 (LOFARMA S.P.A.) 2 **Julho** 2009 (02.07.2009) *Claims 1, 2;*	1, 2, 4
	--	

☒ Documentos adicionais estão listados na continuação do Quadro C ☒ Ver o anexo de família da patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" depósito ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional.

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial (como especificado).

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita com o depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional	Data do envio do relatório de pesquisa internacional:
30 **Dezembro** 2010 (30.12.2010)	17 **Janeiro** 2011 (17.01.2011)
Nome e endereço da ISA/ **Austrian Patent Office** Dresdner Straße 87, A-1200 Vienna Facsimile No. +43 / 1 / 534 24 / 535	Funcionário autorizado HUNGER U. Telephone No. +43 / 1 / 534 24 / 363

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº
PCT/BR 2010/000337

Categoria*	Citação do documento com indicação de partes relevantes, quando apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	NZ 332905 A (IMMUNO LAB LTD) 22 **Dezembro** 2000 (22.12.2000) **Resumo de WPI** ----	1-4, 7, 8

Continuação da primeira página

Continuação do Quadro II:

Observações quando algumas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa
(Continuação do campo 2 na primeira página)

Esse relatório de pesquisa internacional não foi elaborado a respeito de algumas reivindicações, segundo o Artigo 17.2)a), pelas razões seguintes:

Reividincações 5 e 6, porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa internacional significativa, específicamente:

A reivindicação 5 é uma reivindicação de produto, mas não é possível caracterizar um produto por sua via de administração.

A reivindicação 6 também é uma reivindicação de produto, mas contém unicamente os efeitos provocados pela composição. Não é permitido descrever unicamente os efeitos.

KR	A	20030026610	KR	A	20030026610	2003-04-03
RU	A	2279888	RU	C1	2279888	2006-07-20
WO	A	2009081440	US	A1	2010297188	2010-11-25
			EP	A2	2222337	2010-09-01
			CA	A1	2708879	2009-07-02
			WO	A2	2009081440	2009-07-02
			IT	A1	MI20072421	2009-06-22
NZ	A	332905	NZ	A	332905	2000-12-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BR 2010/000337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC[8]: ***A61K 9/00*** (2006.01); ***A61K 38/00*** (2006.01); ***A61P 19/02*** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC[8]: A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 2003/0026610 A (HAN H J) 3 April 2003 (03.04.2003) *Abstract from WPI* --	1-4, 7, 8
X	RU 2279888 A (FEDOSEEVA V N) 20 July 2006 (20.07.2006) *Abstract from WPI* --	1, 7, 8
X	WO 2009/081440 A2 (LOFARMA S.P.A.) 2 July 2009 (02.07.2009) *Claims 1, 2;* --	1, 2, 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 December 2010 (30.12.2010)	17 January 2011 (17.01.2011)

Name and mailing address of the ISA/ AT	Authorized officer
Austrian Patent Office Dresdner Straße 87, A-1200 Vienna	HUNGER U.
Facsimile No. +43 / 1 / 534 24 / 535	Telephone No. +43 / 1 / 534 24 / 363

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BR 2010/000337

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NZ 332905 A (IMMUNO LAB LTD) 22 December 2000 (22.12.2000) *Abstract from WPI* ----	1-4, 7, 8

Continuation of first sheet

Continuation No. II:

Observations where certain claims were found unsearchable

(Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

Claims Nos.: 5, 6 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claim 5 presents a product claim, but a product cannot be specified by the route of administration.

Claim 6 also presents a product claim, but comprises exclusively effects, which are cause by the composition. Describing exclusively an effect is not allowed.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/BR 2010/000337

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)			Publication date
KR	A	20030026610	KR	A	20030026610	2003-04-03
RU	A	2279888	RU	C1	2279888	2006-07-20
WO	A	2009081440	US	A1	2010297188	2010-11-25
			EP	A2	2222337	2010-09-01
			CA	A1	2708879	2009-07-02
			WO	A2	2009081440	2009-07-02
			IT	A1	MI20072421	2009-06-22
NZ	A	332905	NZ	A	332905	2000-12-22