Alergol Inmunol Clin 2002; 17: 215-220

T. Obispo

Departamento de Producción,
ALK-Abelló, S. A.

Artículo especial

Nuevos conceptos en la fabricación de extractos de veneno de himenópteros

A lo largo del siglo XX se produjeron importantes avances clínicos en el tratamiento de la alergia a himenópteros. En un principio se utilizaron extractos de cuerpo completo de abeja como diagnóstico y tratamiento de pacientes sensibles a este insecto, más tarde se describió que la utilización de extractos de veneno de himenópteros era mucho más eficaz que los cuerpos completos y, por último, la aplicación de técnicas de biología molecular ha permitido ensayar nuevos tipos de tratamientos con proteínas recombinantes, cuyo perfil de seguridad y eficacia es similar al de los extractos de veneno. Todos estos avances clínicos han hecho cambiar de una manera significativa los criterios de fabricación de los extractos alergénicos en general y en particular el de los extractos de himenópteros, no solo por el ingrediente activo utilizado en la producción de extractos (cuerpo completo, veneno o proteína pura) o por los procesos de estandarización y de control de calidad empleados, sino también por la aplicación a los sistemas de producción de requerimientos farmacéuticos como las Normas de Correcta Fabricación (GMP's), que garantizan el control de las instalaciones, equipos, documentación, validación de los procesos y, por tanto, la consistencia de los productos para uso clínico.

Palabras clave: Estandarización. Fabricación. GMP's. Himenóptero y veneno.

New concepts in the manufacture of Hymenoptera venom extracts

Important clinical progresses have occurred in the therapeutic management of Hymenoptera venom allergy over the 20th Century. Whole body bee extracts were initially used in the diagnosis and therapy of patients sensitised to this insect. Later on it was reported that extracts of Hymenoptera venoms were much more effective than the whole body ones. Finally, the application of molecular biology techniques has led to new therapies being tested with recombinant proteins, the safety and effectiveness of which is similar to that of the venom extracts. All these clinical advances have significantly changed the criteria in the manufacture of allergenic extracts generally and of Hymenoptera in particular, not only because of the active ingredient used in the preparation of the extracts (whole body, venom or pure protein) or because of the standardisation or quality control procedures applied, but also because of the application to the manufacturing systems of pharmaceutical requirements such as those of the Good Manufacturing Practices (GMP's), which ensure the control of the installations, equipment, documentation and process validation, and thus the consistence of the resulting products for clinical use.

Key words: Standardisation. Manufacture. GMP's. Hymenoptera. Venoms.

Correspondencia:
Teodoro Obispo
Garantía de Calidad
Departamento de Producción,
ALK-Abelló, S. A.
C/ Miguel Fleta 19,
28037 Madrid
e-mail: teodoro.obispo@es.alk-abello.es

Desde que a finales de los años 20, se publicaron los primeros métodos de diagnóstico e inmunoterapia utilizando extractos de cuerpo completo en pacientes alérgicos a picadura de abeja, numerosos pacientes fueron diagnosticados y tratados con estos extractos[1-4]. Sin embargo, en 1978, Hunt et al.[5] demostraron que los diagnósticos y la inmunoterapia con extracto de veneno de abeja eran más eficaces que con cuerpo completo, y capaces de prevenir posteriores reacciones sistémicas en caso de repicadura.

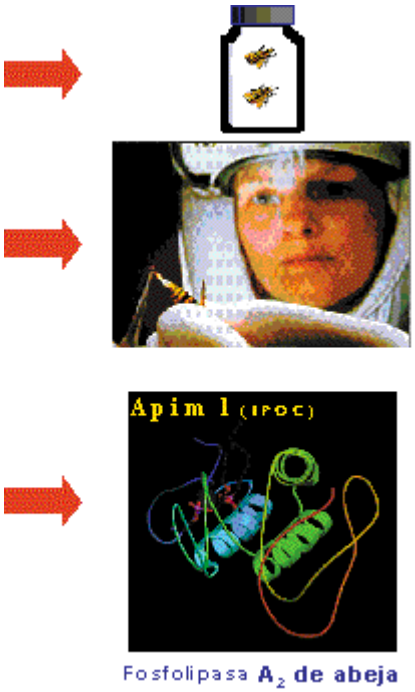
En esos primeros años de utilización de extractos de veneno de himenópteros surgieron numerosos interrogantes como, por ejemplo, la selección de venenos, procesos de fabricación, estandarización, pruebas cutáneas; y, específicamente, con respecto a la inmunoterapia: dosis, pautas y duración del tratamiento, etc. La mayor parte de estas preguntas se han ido respondiendo a lo largo de estos años.

Más recientemente, el mejor conocimiento de los mecanismos de acción de la inmunoterapia ha permitido realizar un estudio clínico con los principales epitopos-T (sitios de reconocimiento en la molécula alergénica por los linfocitos T) de la fosfolipasa A_2, alergeno mayoritario del veneno de abeja, y cuyos resultados preliminares son similares al tratamiento convencional con veneno completo[6].

Esta breve historia, señalando los hitos más importantes en el tratamiento y diagnóstico de la alergia a himenópteros, es paralela a la evolución que han seguido los procesos de fabricación farmacéutica de estos productos de uso clínico.

En un principio, los extractos se fabricaban a partir de cuerpos completos, utilizándose como método de control el contenido proteico. Durante los años 70 y 80 se empezaron a comercializar los extractos de venenos de himenópteros, y al mismo tiempo se comenzaron a identificar los principales componentes alergénicos y a determinar la potencia biológica, mediante pruebas *in vivo* e *in vitro* que es lo que conocemos como estandarización de extractos alergénicos. Las compañías farmacéuticas mejoraron los procesos de fabricación introduciendo controles de calidad más estrictos en sus productos y las autoridades sanitarias empezaron a registrar los primeros productos alergénicos, entre ellos el de veneno de himenópteros.

En los años 90, grupos de I+D de algunos laboratorios farmacéuticos iniciaron trabajos consistentes en la aplicación de las técnicas de biología molecular al estudio de los componentes alergénicos de los extractos. Esto ha



Años 30: Vacunas de 1ª generación. Extractos de cuerpos completos de himenópteros

Años 70-80: Vacunas de 2ª generación. Venenos de himenópteros. Estandarización.

Años 90: Vacunas de 3ª generación. Aplicación de técnicas de biología molecular para la obtención de proteínas recombinantes.

permitido el clonaje, expresión y modificación de los alergenos[7], identificación de epitopos T y B (sitios de reconocimiento en la molécula alergénica de la IgE), iniciándose lo que, probablemente, sea el futuro de nuevos productos de 3ª generación para uso clínico.

ESTANDARIZACIÓN DE EXTRACTOS ALERGÉNICOS DE HIMENÓPTEROS

La estandarización de un extracto alergénico se puede definir como el mantenimiento constante de la actividad biológica, además de minimizar las variaciones en su composición lote a lote con el fin de conseguir diagnósticos y tratamientos de mayor calidad, más seguros y eficaces. Estos tres importantes objetivos de la estandarización se pueden definir como que la calidad depende, principalmente, de la composición de los extractos en términos de presencia o ausencia de los componentes individuales y de su concentración en el extracto. La caracterización bioquímica y la determinación de la potencia hacen a los tratamientos y diagnósticos más seguros. La eficacia viene avalada por los numerosos estudios publicados utilizando extractos estandarizados[8].

Una vez definido el concepto de estandarización, y sus principales objetivos, se pueden enumerar cuáles son sus principales etapas:

Selección de la materia prima

Uno de los principales requisitos para obtener un buen extracto es tener una buena materia prima. La identificación, caracterización y definición de las especificaciones, hacen que las materias primas seleccionadas sean mucho más homogéneas.

Por todos estos motivos, la obtención de la materia prima de venenos de himenópteros es tan importante. En el caso del veneno de abeja se obtiene por estimulación eléctrica de los insectos vivos de *Apis mellifera*. El equipo colector (Figura 1), puesto en la entrada de una colmena, consiste en una malla de cobre o acero, electrificada que debajo tiene una membrana. Cuando la abeja entra o sale y se pone en contacto con la malla eléctrica recibe una electroestimulación que la hace picar la membrana, descargando el contenido del saco de veneno en un recipiente de cristal, evitando la penetración de otras partículas como heces, pelos, etc. Una media de 10-20 colmenas o alrededor de 10.000-20.000 insectos deben ser sometidos a este proceso para obtener 1 g de veneno de abeja.

En el caso de veneno de véspidos, el sistema de electro-estimulación no se puede emplear, al menos a escala comercial, debido a la agresividad que presentan las avispas. Por tanto, el procedimiento de obtención de la materia de véspidos es diferente. Las avispas son adormecidas en el avispero, llevadas al laboratorio y congeladas, una vez descongeladas son clasificadas por un entomólogo especialista, cada saco es diseccionado, los sacos son extraídos con un tampón, y los componentes insolubles son eliminados por centrifugación y/o filtración. Los venenos de diferentes especies del mismo género, Polistes o Vespula, integrantes del principio activo, son estabilizados, posteriormente, mediante un proceso de liofilización.

Alrededor de 30.000 insectos son necesarios para recoger aproximadamente 1g de veneno de avispa.

Esta no es la situación real en la naturaleza, donde las avispas pueden picar varias veces, inclusive de manera sucesiva, al mismo individuo, mientras que las abejas suelen morir tras su picadura.

Procesos de producción normalizados y documentados: Control del proceso

Otra etapa en la estandarización es que todos los procesos de fabricación estén normalizados y documentados, es decir, que cada uno de los pasos que se siguen queden registrados en la documentación de los lotes,

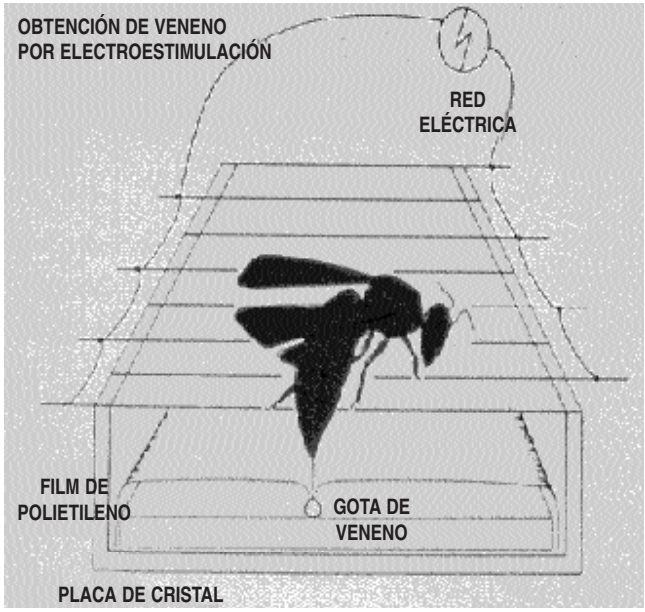


Fig. 1. Esquema del equipo colector del veneno de abeja.

contestando siempre a las preguntas: ¿qué se hizo?, ¿cómo se llevó a cabo?, ¿cuándo? y ¿quién fue el responsable de hacerlo? Se anota en observaciones cualquier incidencia durante el proceso de producción. Todos los controles en proceso como la valoración del pH, determinación del perfil proteico o alergénico de los extractos, punto de burbuja, etc., son adjuntados a la documentación del lote para controlar la trazabilidad del producto final.

Estandarización de los productos finales

Hasta ahora casi todas las compañías dedicadas a la fabricación de extractos alergénicos empleaban, generalmente, el concepto de estandarización a sus productos finales, describiendo un nivel básico para el conocimiento del contenido o del perfil proteico del extracto, un nivel intermedio cuando se determinaba la actividad biológica o potencia alergénica. Por último, estaría el nivel más alto de estandarización donde, además de estos análisis, se cuantifican los alergenos mayoritarios. En el caso de los extractos de venenos de himenópteros, podemos hablar del máximo nivel de estandarización ya que conocemos el contenido y perfil proteico y se determina la actividad de los alergenos mayoritarios como son la fosfolipasa A_2 e hialuronidasa mediante ensayos en geles de agarosa referenciados por la FDA *(Food Drug Administration,* USA). Sin embargo, debido a la pureza de los extractos de veneno, a la caracterización de sus componentes y, por tan-

Tabla I. Principales componentes de los venenos de himenópteros

Género	Componente (alergeno)	Peso Molecular (D)	Contenido %	Alergenicidad
Apis	– Fosfolipasa A_2 (Api m 1)	15.800	5-20	Fuerte
	– Hialuronidasa (Api m 2)	44.000	2	Moderada
	– Melitina (Api m 4)	2.840	50-60	Débil
	– Alergeno C (Api m 5)	105.000	1	Débil
Polistes	– Fosfolipasa A_1 B (Pol a 1)	37.000	6-14	Fuerte
	– Hialuronidasa (Pol a 2)	43.000	1-3	Moderada
	– Antígeno 5 (Pol a 5)	24.000	5-10	Moderada
Vespula	– Fosfolipasa A_1 B (Ves v 1)	37.000	6-15	Fuerte
	– Hialuronidasa (Ves v 2)	43.000	3-5	Moderada
	– Antígeno 5 C (Ves v 5)	22.000	5-10	Moderada

to, a la reproducibilidad de los lotes no hay una valoración de su actividad biológica como en otros extractos alergénicos.

Fabricación de Referencias

En todo proceso de estandarización hay un elemento clave: las referencias, que son, en general, extractos perfectamente caracterizados, de potencia conocida, los alergenos mayoritarios valorados en caso de que sea posible, estables, almacenados en condiciones óptimas para su conservación y utilizados para comparar la calidad de otros nuevos extractos. Esta comparación determinará las especificaciones de los diferentes extractos de veneno, todos los productos dentro de los rangos establecidos serán liberados para uso clínico y cualquier desviación significará el rechazo del lote.

La aplicación de las técnicas bioquímicas o inmunológicas a los extractos de veneno ha permitido obtener extractos de referencia donde los principales componentes han sido identificados, caracterizados y determinada su alergenicidad. Aunque la prevalencia de algunos de estos componentes puede ser discutida, es ampliamente aceptado que la fosolipasa A_2 es el alergeno mayoritario, probablemente, junto con la hialuronidasa (Tabla I).

Por tanto, el concepto de estandarización no solo debe aplicarse a nivel de producto final del extracto alergénico, sino que se debe ampliar a cada una de las etapas de este proceso como la selección de la materia prima, procesos de fabricación y caracterización de los extractos referencia, con el fin de obtener lotes más reproducibles y consistentes.

APLICACIÓN DE LAS NORMAS DE CORRECTA FABRICACIÓN EN LOS PROCESOS DE MANUFACTURACIÓN DE EXTRACTOS DE VENENOS

Una vez que la materia prima ha sido analizada y cumple las especificaciones establecidas con respecto al extracto de referencia, comienza el proceso de fabricación que consiste en la solubilización de la materia prima a 100 μg/ml. Se puede llevar a cabo un proceso de semipurificación para eliminar las substancias de bajo p.m. que pueden dar una respuesta inespecífica o tener actividades tóxicas, tras ajustar el pH, se esteriliza por filtración con 0,2 μm. La disolución es valorada para determinar la cantidad de proteína, dispensándose 120 μg en cada vial, que es el más concentrado, también llamado dosis de mantenimiento. En este paso se hacen diluciones sucesivas 1:10 para la presentación de las diferentes concentraciones: 12 μg/vial, 1,2 μg/vial y 0,12 μg/vial. Debido a la formulación de los extractos de veneno de himenópteros, los viales de las diferentes concentraciones son liofilizados; la sublimación del agua congelada de los viales, hace que la presentación final del producto sea como una especie de *cake* o *pastilla* que a la hora de utilizarse se debe resuspender en agua purificada. Esta presentación garantiza la estabilidad de los ingredientes activos desde los procesos de fabricación hasta su uso (Figura 2).

Una vez que el proceso de fabricación ha finalizado se realizan nuevos análisis de caracterización proteica, cuantificación de alergenos mayoritarios, esterilidad, etc., para comprobar las especificaciones del producto antes de su liberación.

La dosis de mantenimiento de 100 μg de proteína de

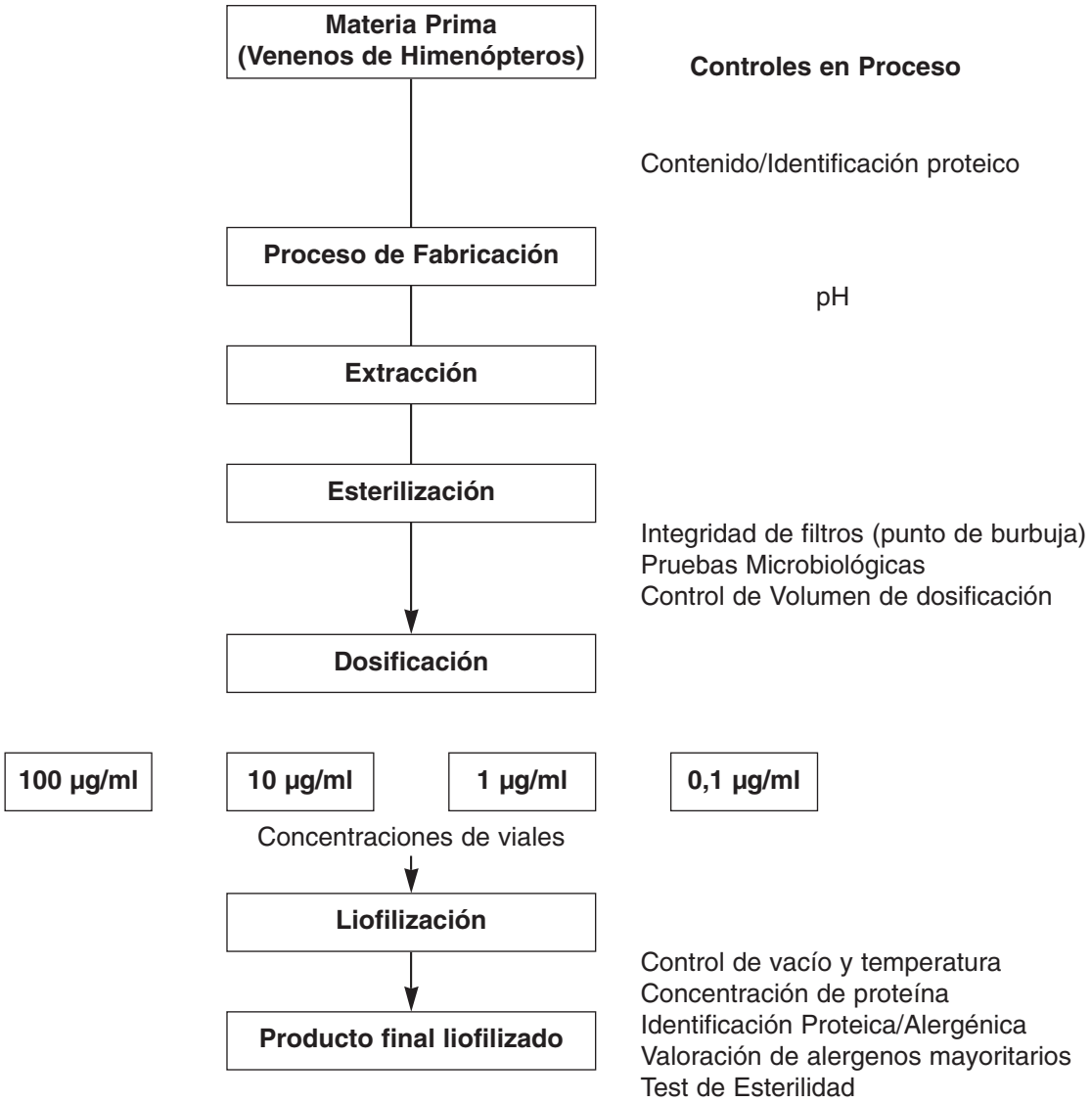


Fig. 2. Diagrama de flujo del proceso de fabricación de los extractos de veneno de himenópteros, desde la materia prima hasta el producto final.

veneno representa aproximadamente 2 veces el contenido proteico de la picadura de abeja y bastante más proteína que las picaduras de avispa. Sin embargo, hay un amplio consenso avalado por numerosos estudios clínicos sobre inmunoterapia de veneno de himenópteros que definen a esta dosis como la óptima para conseguir una mayor protección en caso de repicadura[9].

La prueba cutánea más aceptada para llevar a cabo el diagnóstico de la alergia a himenópteros es el test intradérmico, que mediante diluciones sucesivas se determina a qué concentraciones el paciente presenta una prueba positiva.

Tanto la valoración de las pruebas cutáneas como la indicación y seguimiento del tratamiento siempre deben estar bajo la supervisión del alergólogo.

Las compañías farmacéuticas dedicadas a la fabricación de extractos alergénicos deben aplicar las Normas de Correcta Fabricación o GMP´s (*Good Manufacturing Practice*)[10] con el fin de optimizar más y mejor sus procesos de producción, la calidad de sus extractos, cumplimentar los informes de registros, etc. Estas normas no sólo describen cómo se deben manipular y fabricar los productos farmacéuticos, sino que además describen cómo tienen que ser nuestras instalaciones: condiciones de esterilidad de las áreas de producción, los requerimientos básicos de control de calidad, o establecer las diferentes responsabilidades en los procesos de fabricación. Además, introduce un nuevo concepto, el de Garantía de Calidad, donde no se determina puntualmente un parámetro (pH, contenido

alergénico, alergenos mayoritarios, etc.), sino que se debe tener una visión global de todos los procesos de producción para identificar las posibles mejoras en los sistemas de fabricación (procesos, equipos, control de calidad, validaciones, áreas estériles, etc.) y garantizar una mejora continua de la calidad de los productos.

La combinación del trabajo clínico y búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento de los alergólogos junto con la investigación básica en el campo de la alergia e inmunología de los científicos permitirá un mejor conocimiento de los mecanismos de acción de las vacunas, lo cual abrirá nuevas perspectivas para los futuros productos de uso clínico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Braun LIB. Notes on desensitization of a patient hypersensitivity to bee stings. S Afr Med Rec 1925; 23: 408.

2. Benson RL, Semenov H. Allergy in its relation to the bee sting. J Allergy 1930; 1: 105.

3. Mueller JL. Further experiences with severe allergic reactions to insect sting. N Engl J Med 1959; 261: 374.

4. Mueller JL, Schmid WH, Rubinsztain R. Stinging-insect hypersensitivity: a 20-year study of immunologic treatment. Pediatric 1975; 55: 530.

5. Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK, Benton AW, Amodio FJ, Lichtenstein LM. A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. N Engl J Med 1978; 299: 157.

6. Müller UR, Fricken M, Aldis AC, Carballido J, Blase K. Successful immunotherapy with T-cell epitopes of bee venom phospholipase A_2 (PLA) in patients with bee venom (BV) allergy. J Allergy Clin Immunol 1996; 97: 426.

7. King PT, Jim SY, Monsalve RI, Sobtka, AK, Lichtenstein, LM, Spangfort MD. Recombinant Allergens with reduced allergenicity by retaining immunogenicity of natural allergens: hybrids of yellow jacket and paper wasp venom allergen antigen $5s^1$. J Immunol 2001; 166: 6057-6065.

8. Müller U, Mosbech H. Position Paper: Immunotherapy with Hymenoptera venoms. Allergy 1993; 48 Suppl: 14:36.

9. Armentia A, Acebes J, Ferreiro M, Fernández E, García P, Peláez A, Pérez-Santos C, Miranda A (Coordinador del Comité). Alergia a picaduras de himenópteros: presente y futuro en España. Rev Esp Alergol Immunol Clín 1996; 11: 131.

10. Good Manufacturing Practices, Medicinal Products for Human and Veterinary use, Pharmaceutical Legislation, Volume 4. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. European Commission. 1998; 1-136.