(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 647 242**

(51) Int. Cl.:

A61K 36/899 (2006.01)
A61K 8/97 (2007.01)
A61P 37/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2009 PCT/EP2009/061971**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2010 WO10054878**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009 E 09783051 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2365818**

(54) Título: **Composición dermatológica hipoalergénica**

(30) Prioridad:

14.11.2008 FR 0857755

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2017

(73) Titular/es:

PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE (100.0%)
45, place Abel-Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR

(72) Inventor/es:

MANDEAU, ANNE;
FABRE, BERNARD;
TEYSSEYRE, VALÉRIE;
BOE, JEAN-FRANÇOIS y
CREBASSA TRIGUEROS, VÉRONIQUE

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 647 242 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

Composición dermatológica hipoalergénica.

La presente invención se refiere a las alergias a los cereales.

En el contexto de la presente invención, los cereales comprenden las poáceas y los pseudocereales.

Mediante el término “cereales” se hace referencia a las gramíneas cuyo "grano" (cariopsis) maduro se utiliza como alimento, sobre todo debido a su riqueza en almidón (Paris R.R., Moyse H. Précis de matière médicale. II Pharmacognosie spéciale. Spermaphytes (continuación): Angiospermes. Monocotylédones - Dicotylédones. Apétales et Diapétales. 2ª edición. Paris: Masson, 1981, p. 16). El término “cereal” se refiere asimismo de manera específica a la semilla de estas plantas.

En el plano botánico, los cereales pertenecen a la familia de las poáceas (o gramíneas).

Dichas gramíneas son unas monocotiledóneas en general herbáceas con un tallo hueco entre los nudos (caña) que presenta unas hojas dísticas de vaina frecuentemente hendida y ligulada. La inflorescencia es en espiguillas, agrupadas de la manera más frecuente en espiga compuesta, o en racimo denominado “panículo”. La flor se reduce a las etaminas y al ovario: dos brácteas foliares o glumas protegen la espiguilla, y dos glumelas, de las cuales una anterior adosada, envolvente, frecuentemente aristada, acompaña la flor. Las tres etaminas exsertas son oscilantes, unidas por el dorso. El ovario presenta 1 carpelo con dos estilos plumosos, íntimamente unidos al óvulo y que se desarrollan en un fruto particular denominado cariopsis; el albumen abundante es amiláceo.

Esta familia agrupa aproximadamente 700 géneros y 12.000 especies.

La mayoría de las gramíneas se utilizan en la industria alimentaria (trigo, cebada, centeno, avena, sorgo, mijo, maíz, arroz, etc.).

Las especies de cereales consumidas más habitualmente se clasifican en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Principales especies de cereales consumidas, que pertenecen a la familia de las poáceas

Nombre latino	Nombre común
Avena abyssinica Hochst.	
Avena brevis Roth	
Avena nuda L.	Avena desnuda
Avena sativa L.	
Bromus mango E. Desv.	
Coix lacryma-jobi var. ma-yuen (Rom. Caill.) Stapf	
Dendrocalamus strictus (Roxb.) Nees	
Digitaria exilis (Kippist) Stapf	
Digitaria iburua Stapf	
Echinochloa esculenta (A. Braun) H. Scholz	mijo japonés
Eleusine coracana subsp. Coracana	mijo rojo
Eragrostis tef (Zuccagni) Trotter	Tef
Hordeum vulgare subsp. vulgare	cebada común
Oryza glaberrima Steud.	arroz africano
Oryza sativa L.	arroz
Panicum hirticaule J. Presl	
Panicum miliaceum subsp. Miliaceum	mijo común
Panicum sumatrense Roth	
Paspalum scrobiculatum L.	
Pennisetum glaucum (L.) R. Br.	mijo perla
Phalaris canariensis L.	alpiste
Secale cereale subsp. cereale	Planta de centeno
Secale strictum subsp. africanum (Stapf) K. Hammer	

Nombre latino	Nombre común
Setaria italica subsp. italica	mijo de Italia, mijo de pájaros, mijo menor, mijo de Hungría
Setaria palmifolia (J. Koenig) Stapf	
Setaria pumila subsp. pumila	setaria glauca
Sorghum bicolor subsp. bicolor	mijo mayor sorgo
×Triticosecale spp.	tritical
Triticum aestivum subsp. aestivum	trigo común, trigo
Triticum aestivum subsp. spelta (L.) Thell.	Trigo espelta
Triticum aestivum subsp. Sphaerococcum (Percival) Mackey	
Triticum monococcum subsp. Monococcum	esprilla, escanda menor
Triticum timopheevii subsp. Timopheevii	
Triticum turgidum subsp. Carthlicum (Nevski) A. Love & D. Love	trigo persa
Triticum turgidum subsp. durum (Desf.) Husn.	trigo duro
Triticum turgidum subsp. polonicum (L.) Thell.	trigo de Polonia
Triticum zhukovskyi A. M. Menabde & Eritzjan	
Urochloa deflexa (Schumach.) H. Scholz	
Urochloa ramosa (L.) T. Q. Nguyen	
Zizania palustris L.	
Zea mays subsp. mays L.	maíz

Algunos granos de otras familias botánicas se parecen a los cereales y se denominan pseudocereales. Estas especies emparentadas con los cereales pero que no pertenecen a la familia de las poáceas, que se consumen asimismo y que pueden ser objeto de alergias alimenticias se ejemplifican, entre otras, en la tabla 2 siguiente:

Tabla 2: Principales especies consumidas emparentadas con los cereales, que no pertenecen a la familia de las Poáceas

Nombre latino	Nombre común	Familia
Amaranthus caudatus L.	Amaranto trigo del inca bledo francés cola de zorro	Amaranteáceas
Amaranthus cruentus L.	Amaranto	Amaranteáceas
Amaranthus hypochondriacus L.		Amaranteáceas
Chenopodium album L.	cenizo	Quenopodiáceas
Chenopodium berlandieri subsp. nuttalliae (Saff.) H. D. Wilson & Heiser		Quenopodiáceas
Chenopodium pallidicaule Aellen		Quenopodiáceas
Chenopodium quinoa subsp. quinoa	quinoa, arroz del Perú	Quenopodiáceas
Fagopyrum esculentum Moench	Alforfón común, Alforfón de haya	Poligonáceas
Fagopyrum tataricum (L.) Gaertn.	Alforfón tartariano	Poligonáceas
Helianthus annuus L.	Girasol	Asteráceas
Sesamum indicum L.	Sésamo	Pedaleáceas

Los granos de cereales y pseudocereales contienen un gran número de proteínas: unas proteínas de estructura, unas proteínas biológicamente funcionales y unas proteínas de reserva. Osborne (1907) las han clasificado según sus solubilidades:

- Albúminas solubles en agua
- Globulinas solubles en las disoluciones salinas
- Prolaminas solubles en etanol acuoso

- Glutelinas insolubles en los disolventes anteriores, parcialmente solubles en las disoluciones de urea o de guanidinas.

Ejemplos:

	Trigo	Avena	Cebada	Maíz
Albúminas	Leukosinas			
Globulinas	Edestinas	Avenalinas		
Prolaminas	Gliadinas	Gliadinas	Hordeínas	Zeínas
Glutelinas	Gluteninas	Aveninas	Hordeninas	Zeaninas

En cambio, el contenido proteico de las partes aéreas, y especialmente de las hojas, consiste en particular en:

- unas proteínas membranarias de los cloroplastos (proteínas frecuentemente relacionadas con los lípidos y los pigmentos)

- unas proteínas solubles del cloroplasto (estroma): RuBPCase

Las hojas de quinoa, de girasol, de avena, de cebada, de *Zizania palustris*, los brotes de trigo así como los gérmenes de sésamo, de arroz, de trigo y de maíz, ya se usan en cosmética. Los brotes de cebada verde se usan, por ejemplo, como agente de antienvejecimiento.

Se ha descrito asimismo en la técnica anterior:

- Un extracto de hojas de *Amaranthus* usado como antiinflamatorio, en particular para tratar la dermatitis atópica (patente JP 2000143524).

- Una composición que contiene un extracto de paja de avena asociada con un extracto de epilobo con el objetivo de tratar las reacciones inflamatorias de la piel en el contexto de una utilización tópica (documento EP 1 474 159).

- Una composición cosmética protegida de la oxidación mediante aceite de germen de arroz (documento EP 1 704 898).

- Una composición cosmética que comprende un extracto de brote de trigo (documento WO 9526183)

- Un producto cosmético que presenta unos efectos de regeneración sobre la piel que contiene un extracto de tallos de girasol (documento FR 2487674).

- Un remedio para prevenir o tratar alergias que comprenden la “hierba de la avena” (documento UA 73690 C2)

- Unos extractos de plantas monocotiledóneas, por ejemplo avena, para la inmunomodulación. “Inmunomodulación” significa una actividad asociada al sistema inmunitario, inmunidad, sensibilidad inducida, y alergias (documento US2008/089957).

Las harinas de cereales, en particular de trigo, son conocidas por ser el origen del asma del panadero y de rinitis alérgicas por inhalación. La respuesta IgE más alta se ha observado con las albúminas y las globulinas, unas proteínas solubles en disoluciones neutras. Sin embargo, algunos estudios han demostrado asimismo una reactividad a las proteínas solubles en etanol o en medio ácido (gluteninas y gliadinas). Más recientemente, unos estudios de inmunotransferencia han mostrado que los alérgenos principales en las fracciones neutras de la harina de trigo y de cebada estaban localizados en la parte de bajo peso molecular (aproximadamente 20 kDa), en el suero de pacientes que padecen alergia del panadero.

En la ingestión, los cereales son a veces responsables de la enfermedad celíaca y de dermatitis herpetiforme. Varios estudios han mostrado que el antígeno más implicado sería la fracción gliadina de las proteínas solubles en etanol.

A pesar de la importancia de los cereales en la alimentación humana, se sospecha que deterioran los casos de dermatitis atópica, en particular en los niños. Asimismo, unos estudios inmunológicos (esencialmente ensayos SPT - Skin Prick Test - y RAST - Radioallergosorbent Test) han conducido a la identificación de las proteínas implicadas en el trigo, la avena, el centeno, la cebada, el arroz, el mijo y el maíz, y han demostrado unas reacciones cruzadas entre el trigo y la cebada o el centeno (Varjonen E, Vainio E, Kalimo K, Juntunen-Backman K, Savolainen J Skin-prick test and RAST responses to cereals in children with atopic dermatitis. Characterization

of IgE-binding components in wheat and oats by an immunoblotting method. Clin Exp Allergy 1995, 25:1100-1107) (Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Kalkkinen N, Reunala T. Rye γ-70 and γ-35 secalins and barley γ-3 hordein cross-react with ω-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. Clin Exp Allergy, 2001, 31:466-473). Las proteínas menos solubles (gliadinas y gluteninas) parecen estar implicadas cuando unos cereales ingeridos son el origen de dermatitis atópicas. Numerosos estudios preliminares han mostrado que la hipersensibilidad alimenticia desempeñaba una función importante en los niños que padecen dermatitis atópica, y que la eliminación de los alérgenos de la alimentación conllevaba una mejora clínica.

Algunos casos de alergia de contacto han sido relacionados con unos cosméticos a base de extractos de granos de cereales (esencialmente proteínas de trigo hidrolizadas o no pero también sésamo) en personas sensibilizadas. La hidrólisis de las proteínas de trigo, que podría haber sido una solución para evitar los problemas de alergia resultó por el contrario mucho más sensibilizante, desenmascarando las modificaciones de estructura inducidas por la hidrólisis, nuevos sitios antigénicos (Pecquet C, Laurière M. New allergens in hydrolysates of wheat proteins. Rev Fr Allerg Immunol Clin 2003, 43: 21-23).

Se cree que las proteínas de granos de cereales se deberían evitar en las personas alérgicas, tanto por vía oral como tópica, y especialmente en los niños.

Existe así una necesidad y una fuerte demanda en cosmética en personas sensibilizadas o alérgicas a los granos de cereales.

De manera inesperada y sorprendente, los inventores han demostrado que una composición cosmética que comprende un extracto de parte aérea de avena recogida antes de la espigación ("ear emergence") no provoca ninguna reacción cruzada con las proteínas responsables de las alergias a los granos de cereales.

El objetivo de la presente invención es por lo tanto proporcionar un extracto de parte(s) aérea(s) de avenas recogidas antes de la espigación para su utilización en la preparación de una composición dermatológica hipoalergénica que minimiza y/o previene los riesgos de reacciones alérgicas en personas alérgicas a proteínas de granos de cereales.

Mediante la expresión parte aérea de avenas se entiende cualquier parte situada por encima del suelo, con la exclusión de los granos.

Preferentemente, las "partes aéreas de avenas" incluyen las hojas y/o los tallos y/o las espiguillas y/o las flores, con la exclusión de los granos.

El extracto según la invención es un extracto de parte(s) aérea(s) de avenas recogidas antes de la espigación.

En el contexto de la presente invención, la expresión "partes aéreas de avenas recogidas antes de la espigación" se refiere a las partes aéreas de avenas recogidas después de la germinación (aproximadamente 2 semanas a 2 meses después de la germinación) durante la etapa de crecimiento de los tallos hasta, pero excluyendo, la espigación.

En el contexto de la presente invención, la expresión "crecimiento de los tallos" se refiere a la fase de crecimiento que corresponde a la elongación del tallo y al crecimiento de la espiga en formación, antes de la floración.

Un extracto de parte(s) aérea(s) de avena utilizado ventajosamente según la invención en las personas alérgicas a las proteínas de granos de cereales comprende entre 2 y 15% de flavonoides y entre 0,2 y 2% de avenacósidos A y B, preferentemente entre 5 y 10% de los flavonoides isovitexin-2''-O-arabinopiranósido e isoorientin-2''-O-arabinopiranósido y/o menos de 1 ppm de proteínas, preferentemente menos de 0,5 ppm y más preferentemente todavía menos de 0,3 ppm de proteínas.

El extracto de parte(s) aérea(s) de avena utilizado se caracteriza por su contenido en flavonoides y en saponinas de interés. Estas últimas se analizan mediante cromatografía líquida a alta presión, mediante dos métodos diferentes, apropiados para cada tipo de compuesto.

Los contenidos en estas diferentes moléculas varían en función de las condiciones de extracción. Los flavonoides principales son el isovitexin-2''-O-arabinopiranósido y el isoorientin-2''-O-arabinopiranósido. Los avenacósidos A y B son las principales saponinas. Son unas saponinas esteroideas bidesmosídicas.

Ventajosamente, el extracto según la invención es un extracto obtenido en disolvente orgánico.

El extracto según la invención se puede preparar mediante la extracción en disolvente orgánico de parte(s) aérea(s) de cereales o de pseudocereales (aproximadamente 2 semanas a 2 meses después de la germinación durante la etapa de crecimiento de los tallos hasta la espigación no incluida) después del secado y de la trituración. En particular, se usa un disolvente orgánico seleccionado de entre el grupo que consiste en las

cetonas, los ésteres, los alcoholes en C1 a C4 y las mezclas en cualquier proporción miscible de estos disolventes. Ventajosamente, se utiliza un disolvente orgánico seleccionado de entre el grupo que consiste en la acetona, la meti-etil-cetona, la metil-isobutil-cetona, el acetato de etilo, un alcohol en C1 a C4 y una mezcla en cualquier proporción miscible de estos disolventes.

La extracción se realiza bajo agitación o de manera estática.

La extracción se realiza a reflujo o a temperatura ambiente.

Ventajosamente, la extracción se realiza en una relación planta/disolvente que puede variar entre 1/7 y 1/20, preferentemente entre 1/8 y 1/12.

Preferentemente, la extracción se realiza durante de 30 minutos hasta 48 horas, de manera particularmente preferida de 60 a 120 minutos.

La extracción se puede renovar 2 o 3 veces.

El orujo obtenido mediante la etapa de extracción se separa a continuación del extracto mediante centrifugación o filtración, y la disolución puede ser más o menos concentrada hasta la obtención de un extracto seco.

Un tratamiento de decoloración se puede realizar mediante deslipidación por concentración, precipitación y filtración, añadiendo a la disolución extraída concentrada o no un soporte absorbente tal como el carbón activo o una resina absorbente.

Se puede añadir un soporte durante la etapa de secado en unas proporciones másicas con relación a la materia seca extraída que pueden estar comprendidas entre 1 y 75%. El soporte puede ser un azúcar tal como la maltodextrina, la lactosa, sílice o cualquier otro soporte cosméticamente aceptable.

Ventajosamente, este extracto se obtiene por extracción acetónica o acetona/agua hasta 20% de agua. Un extracto de tipo acetona o acetona/agua hasta 20% de agua comprende las moléculas de interés, flavonoides y saponinas, y está muy empobrecido en proteínas. En efecto, los métodos de dosificación de proteínas descritos en la European Pharmacopoeia no proporcionan ningún resultado, y una migración sobre gel SDS-page mediante electroforesis después de precipitación con acetona y revelación con azul de Coomassie o con nitrato de plata muestra la ausencia de banda que señala la presencia de proteína. El depósito de un control sobre esta misma electroforesis permite evaluar el límite de detección de proteína a aproximadamente 1 ng, presentando este extracto por lo tanto un contenido en proteína inferior a 1 ppm (reducido a la cantidad de extracto depositado sobre el gel). Preferentemente, dicho contenido en proteínas es inferior a 0,5 ppm y todavía más preferentemente inferior a 0,3 ppm de proteínas.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización de un extracto de parte(s) aérea(s) de cereales y/o de pseudocereales, con la exclusión de los granos, en las personas alérgicas a las proteínas de granos de cereales.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización de un extracto de parte(s) aérea(s) de cereales y/o de pseudocereales, con la exclusión de los granos, para la preparación de una composición dermatológica hipoalergénica, es decir, que minimiza y/o que previene los riesgos de reacciones alérgicas en unas personas alérgicas a las proteínas de granos de cereales.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización de una composición cosmética hipoalergénica que comprende un extracto de parte(s) aérea(s) de cereales y/o de pseudocereales en las personas alérgicas a las proteínas de granos de cereales.

La composición dermatológica o cosmética usada según la invención puede contener en particular unos aditivos y auxiliares para la formulación, tales como unos emulsionantes, unos espesantes, unos gelificantes, unos fijadores de agua, unos agentes de expansión, unos estabilizantes, unos colorantes, unos perfumes y unos conservantes.

La composición dermatológica o cosmética utilizada según la invención comprende, además, unos excipientes habituales dermatológicamente compatibles.

La composición se puede preparar en forma de una emulsión de agua en aceite (W/O) o de aceite en agua (O/W), de una emulsión múltiple tal como, por ejemplo, una emulsión de agua en aceite en agua (W/O/W) o de una emulsión de aceite en agua en aceite (O/W/O), o también en forma de una hidrodispersión o de una lipodispersión, un gel o un aerosol.

Los excipientes dermatológicamente compatibles pueden ser cualquier excipiente de entre los conocidos por el

experto en la materia, para obtener una composición para la aplicación tópica en forma de una crema, de una loción, de un gel, de una pomada, de una emulsión, de una microemulsión, de un pulverizador, de un champú, etc.

Ventajosamente, la composición dermatológica o cosmética utilizada según la invención comprende entre 0,1 y 10% de extracto de parte(s) aérea(s) de cereal o de pseudocereal con la exclusión de los granos, expresado en peso con relación al peso total de la composición. Preferentemente, dicha composición comprende una cantidad de extracto de parte(s) aérea(s) de cereal según la invención comprendida entre 0,1 y 5% en peso con relación al peso total de la composición.

Figuras

Figura 1: Comparación de los perfiles de las proteínas totales de granos y de brotes de avena, revelación con azul de Coomassie mediante electroforesis SDS-Page (Gel de poliacrilamida 12,5%).

Figura 2: Transferencia Western, revelación enzimática con anticuerpos policlonales anti-proteínas de partes aéreas.

Figura 3: Transferencia Western, revelación enzimática con anticuerpos policlonales antiproteínas de granos.
Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

Ejemplo 1: Preparación de un extracto de partes aéreas de avena recogidas antes de la espigación mediante extracción acetónica

Se trituran 400 kg secados de partes aéreas de avena antes de la espigación, y después se disponen en un reactor con 10 volúmenes de la mezcla acetona/agua, bajo agitación durante una hora a temperatura ambiente.

Una separación sólido/líquido permite obtener un primer caldo de extracción. El orujo se extrae una segunda vez con 10 volúmenes de la mezcla acetona/agua durante una hora a temperatura ambiente, bajo agitación. Una separación sólido/líquido permite obtener un segundo caldo de extracción que se reúne con el primero. La disolución obtenida se concentra en agua a 1,33 volúmenes/kg y después se filtra. El extracto así obtenido se seca mediante microondas después de la adición de un soporte de maltodextrina (c.s.p. 25%/extracto natural).

Se obtienen así 36 kg de un polvo marrón claro que contiene 6% de flavonoides (isovitexin-2”-O-arabinopiranósido e isoorientin-2”-O-arabinopiranósido) y 0,6% de avenacósido B, y el contenido en proteína del extracto así obtenido es inferior a 0,3 ppm.

Ejemplo 2: Comparación bioquímica e inmunológica de un extracto de grano de cereal y de un extracto de partes aéreas del mismo cereal recogidas antes de la espigación

La demostración de la ausencia de cruce entre unos extractos que proceden de granos de cereales y unos extractos que proceden de partes aéreas se ha realizado mediante unas técnicas bioquímicas (extracción y demostración de proteínas) e inmunoenzimáticas (detección específica, mediante la fabricación de anticuerpos, de la presencia de una proteína).

La preparación del extracto de proteínas de granos se puede realizar como se expone a continuación:

Los granos se trituran y se extraen con sosa a pH 8. Después de la filtración, el filtrado se precipita con ácido clorhídrico hasta un pH de 5,4. Después de la centrifugación, el precipitado se recoge, se solubiliza en agua y se dializa contra agua en un filtro de diálisis de límite de corte de 6-8 kDa a 4ºC durante una noche.

La preparación del extracto de partes aéreas se puede realizar como se expone a continuación:

A partir de material fresco:

- extracción mediante solubilización en un amortiguador Tris, HCl pH 8,0, y filtración seguida de dos precipitaciones consecutivas con acetona para eliminar las sales, o

- extracción mediante solubilización en un amortiguador de Laemmli pH 7,5 reductor que contiene urea y tiourea, y filtración seguida de dos precipitaciones consecutivas con acetona para eliminar las sales

A partir de material seco:

Extracción durante 27 horas mediante solubilización en un amortiguador de Laemmli pH 7,5 reductor que contiene urea y tiourea, y filtración seguida de dos precipitaciones consecutivas con acetona a fin de eliminar las sales.

Estudio bioquímico e inmunológico

Técnicas bioquímicas

I. Electroforesis

Principio: La técnica que permite demostrar específicamente las proteínas es la electroforesis SDS-Page: en presencia de SDS las proteínas cargadas negativamente se desplazan en un gel de poliacrilamida hacia el cátodo en función de su masa únicamente, y las proteínas se detectan mediante tinciones coloreadas tales como el azul de Coomassie o el nitrato de plata.

Los controles positivos utilizados corresponden a un extracto de proteínas totales de partes aéreas de avena antes de la espigación así como a un extracto de proteínas totales de granos preparadas tal como se ha mencionado anteriormente.

II. Ejemplo de resultado - figura 1

Comparación de los perfiles de las proteínas totales de granos y de partes aéreas de avena antes de la espigación mediante electroforesis SDS-Page (gel de poliacrilamida 12,5%) mediante tinción con azul de Coomassie.

El perfil electroforético presentado en la figura 1 hace aparecer claramente una diferencia significativa de la composición proteica de los dos extractos analizados, y principalmente para las proteínas mayoritarias. Pero la única manera de tener la certidumbre de una diferencia cualitativa entre estos dos lotes de proteínas es recurrir a unas técnicas inmunológicas, con un reconocimiento antígeno/anticuerpo específico.

Técnicas inmunoquímicas

Estas técnicas necesitan previamente la obtención de anticuerpos dirigidos contra las proteínas totales de partes aéreas o de granos. Para ello, los extractos de proteínas totales de las partes aéreas y de granos de una misma especie son administrados a unos conejos. Los anticuerpos policlonales se preparan a continuación a partir de los sueros de los animales.

El objetivo es demostrar que las proteínas de partes aéreas de avena antes de la espigación son diferentes de las de los granos, y que no existe ninguna reacción cruzada entre las proteínas de granos y de partes aéreas.

- Anticuerpos dirigidos contra las proteínas de partes aéreas de avena antes de la espigación contra las proteínas de granos de avena
- Anticuerpos dirigidos contra las proteínas de granos de avena contra las proteínas de las partes aéreas de avena antes de la espigación con la ayuda de técnicas ELISA y transferencia Western.

I. ELISA directo

La técnica de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) es una técnica inmunoquímica que permite detectar la presencia de un antígeno en una disolución. El principio consiste en fijar las proteínas de la disolución que se debe analizar en un pocillo y después en poner en contacto los anticuerpos policlonales antiproteínas. A continuación, un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado con una enzima permitirá, después del lavado, revelar la presencia de antígeno en el pocillo mediante una simple reacción colorimétrica.

II. Transferencia Western

Principio: La técnica de transferencia Western consiste en una electroforesis SDS-Page de una mezcla de proteínas, seguida de una revelación mediante una interacción antígeno-anticuerpo específico. Sólo las proteínas reconocidas por los anticuerpos policlonales serán reveladas: Los anticuerpos primarios son reconocidos a continuación por un anticuerpo secundario (en este caso un anticuerpo anti-IgG de conejo) acoplado a una enzima tal como la fosfatasa alcalina.

Resultado ilustrativo - figuras 2 y 3

Cruce entre las proteínas de granos y los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de partes aéreas de avena antes de la espigación (figura 2) y cruce entre las proteínas de partes aéreas de avena antes de la espigación y los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de granos (figura 3).

La técnica de transferencia Western confirma los primeros resultados obtenidos mediante ELISA, a saber, que

las proteínas de partes aéreas de avena antes de la espigación son diferentes de las proteínas de granos, pero asimismo que no existe ningún cruce entre las dos.

Un paciente inmunizado contra las proteínas de granos de avena mediante la alimentación no reaccionará por lo tanto a un extracto de parte aérea (con la exclusión de los granos), incluso si contiene unas proteínas.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de parte(s) aérea(s) de avenas recogida(s) antes de la espigación para su utilización en la preparación de una composición dermatológica hipoalergénica que minimiza y/o previene los riesgos de las reacciones alérgicas en personas alérgicas a las proteínas de grano de cereal.

2. Extracto para su utilización según la reivindicación 1, que comprende 2 a 15% de flavonoides y 0,2 a 2% de avenacósidos A y B.

3. Extracto para su utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que presenta un nivel de 5 a 10% de los flavonoides isovitexin-2''-O-arabinopiranósido e isoorientin-2''-O-arabinopiranósido.

4. Extracto para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende menos de 1 ppm de proteínas.

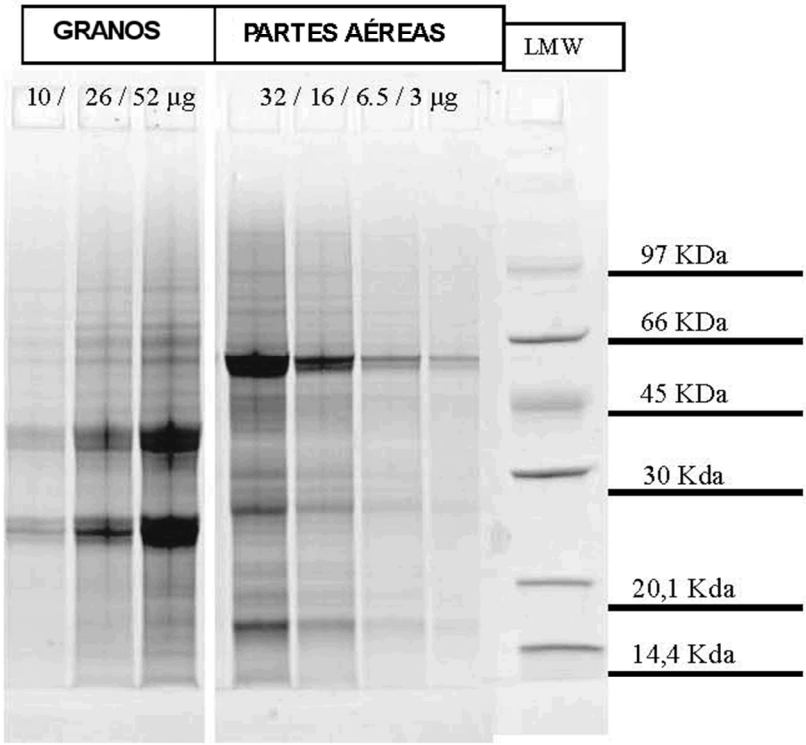
GRANOS
PARTES AÉREAS
LMW
10 / 26 / 52 µg
32 / 16 / 6.5 / 3 µg
97 KDa
66 KDa
45 KDa
30 Kda
20,1 Kda
14,4 Kda

Fig. 1

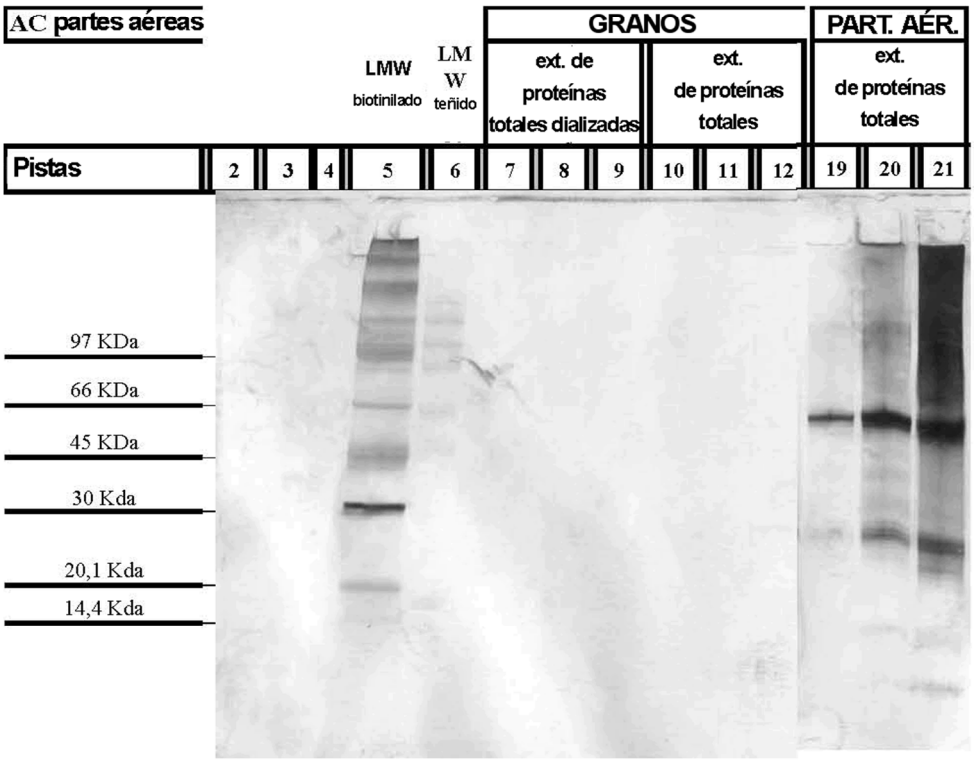
AC partes aéreas
GRANOS
PART. AÉR.
LMW
biotinilado
LM
W
teñido
ext. de
proteínas
totales dializadas
ext.
de proteínas
totales
ext.
de proteínas
totales
Pistas
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
19
20
21
97 KDa
66 KDa
45 KDa
30 Kda
20,1 Kda
14,4 Kda

Fig. 2

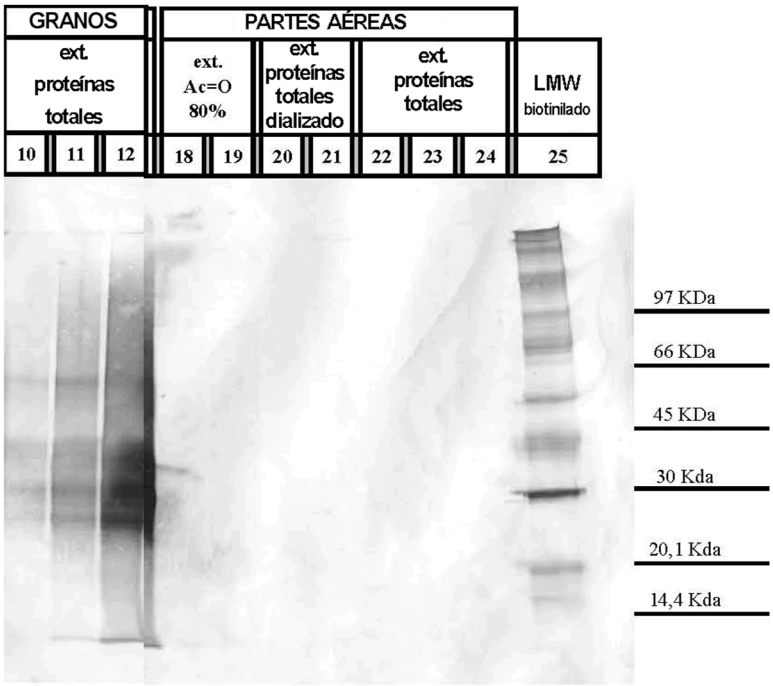
GRANOS
PARTES AÉREAS
ext. proteínas totales
ext. Ac=O 80%
ext. proteínas totales dializado
ext. proteínas totales
LMW biotinilado
10
11
12
18
19
20
21
22
23
24
25
97 KDa
66 KDa
45 KDa
30 Kda
20,1 Kda
14,4 Kda

Fig. 3