

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 752**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

A61K 36/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2010 E 16184996 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 3141262**

54 Título: **Reducción de la genotoxicidad in vitro de extractos de polen mediante la eliminación de flavonoides**

30 Prioridad:

05.06.2009 EP 09305517

29.10.2009 EP 09174479

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

05.08.2019

73 Titular/es:

**STALLERGENES (100.0%)
6, rue Alexis de Tocqueville
92160 Antony, FR**

72 Inventor/es:

**MOINGEON, PHILIPPE;
BATARD, THIERRY y
VILLET, BERTRAND**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 721 752 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

Reducción de la genotoxicidad *in vitro* de extractos de polen mediante la eliminación de flavonoides

5 **[0001]** La invención se refiere a extractos de polen de gramíneas que contienen una cantidad reducida de glucósidos flavonoides con el fin de minimizar los riesgos de genotoxicidad de los extractos de polen de gramíneas. La solicitud también describe un procedimiento de preparación de extractos de polen de gramíneas que contienen una cantidad reducida de glucósidos de flavonoides por ultrafiltración. Los glucósidos de flavonoides están presentes de forma natural en los extractos de polen de gramíneas y se han identificado como fuentes de agluconas de
10 flavonoides, que son genotóxicas *in vitro*, bajo la influencia de enzimas contenidas en los extractos de polen de gramíneas.

[0002] Según la directriz S2B del ICH, del 16 de julio de 1997, el registro de productos farmacéuticos requiere una exhaustiva evaluación de su potencial genotóxico. La batería de pruebas recomendadas incluye una prueba *in vitro* con la evaluación citogenética del daño cromosómico en células de mamíferos o un ensayo de mutación *in vitro* del gen de la timidina cinasa de linfoma de ratón (MLA/TK)
15 del gen de la timidina cinasa de linfoma de ratón (MLA/TK)

[0003] De conformidad con las directrices ICH-S2B, se llevó a cabo la prueba MLA/TK *in vitro* sobre extractos y/o materia prima de polen de cinco especies de gramíneas destinadas al uso para la desensibilización de pacientes alérgicos al polen de gramíneas.
20 alérgicos al polen de gramíneas.

[0004] Se encontró que el extracto liofilizado de polen no mostraba potencial genotóxico *in vitro* en una prueba MLA/TK al usar un tratamiento de corta duración de 3 horas con o sin activación metabólica. Sin embargo, se observaron resultados positivos en la prueba MLA/TK con una condición muy específica, concretamente, cuando la
25 prueba se realizó usando un tratamiento continuo de 24 horas sin activación metabólica ("S9-"). El potencial genotóxico observado en esta condición específica disminuyó ligeramente durante el proceso de preparación de los extractos liofilizados de polen. Por consiguiente, la actividad genotóxica *in vitro* no se introdujo durante este proceso, sino que se originó en la materia prima del polen. De hecho, se encontró que estaba asociada con el polen de las cinco especies de gramíneas usadas para preparar los extractos, con independencia del proveedor del polen de las
30 gramíneas.

[0005] Aunque los extractos liofilizados de polen no mostraron ninguna genotoxicidad *in vivo* en dos ensayos diferentes, para descartar cualquier posible riesgo, se investigó el agente causante de la genotoxicidad *in vitro*.

35 **[0006]** Dado que la genotoxicidad *in vitro* observada estaba ligada al polen de todas las especies de gramíneas usadas para la preparación de los extractos, con independencia del proveedor del polen de las gramíneas, lo más probable es que se debiera a una sustancia o sustancias intrínsecas del polen de las gramíneas, más que a contaminantes genotóxicos externos del entorno agrícola. De hecho, es virtualmente imposible imaginar que el mismo contaminante afecte al polen de múltiples especies de gramíneas procedente de varios proveedores.
40 Sin embargo, no puede excluirse totalmente que haya contaminantes genotóxicos externos que puedan explicar el potencial genotóxico, al menos parcialmente y en algunos casos.

[0007] Por lo tanto, los inventores procedieron a cuantificar los contaminantes genotóxicos externos en la materia prima del polen de gramíneas. Se encontró que los siguientes contaminantes genotóxicos ambientales no
45 eran detectables y/o estaban por debajo de las dosis límite calculadas en la materia prima del polen de gramíneas: radioelementos artificiales (¹³⁴Cs y ¹³⁷Cs), metales pesados (Cd, Ni, Cr), micotoxinas (aflatoxinas B1 y B2; G1 y G2; desoxinivalenol [DON]/vomitoxina; fumonisin B1 y B2; ocratoxina A; zearalenona) y el hidrocarburo aromático policíclico benzo[a]pireno.

50 **[0008]** A continuación, los inventores llevaron a cabo un estudio para determinar qué sustancia o sustancias intrínsecas del polen de gramíneas eran responsables del perfil genotóxico observado en la materia prima y extractos de polen de gramíneas. El polen de gramíneas se evaluó en cuanto a la presencia de los ácidos cafeico y clorogénico, cumarina, alcaloides y flavonoides.

55 **[0009]** De estos, en el polen de gramíneas solamente se detectaron flavonoides, en forma de glucósidos de flavonoides. No se sabe que estos últimos sean genotóxicos *in vitro*, pero las agluconas de flavonoides sí lo son.

[0010] Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que el potencial genotóxico *in vitro* observado en el polen de gramíneas es debido a la desglucosilación mediante enzimas específicas de los glucósidos de flavonoides no
60 genotóxicos para dar agluconas de flavonoides, siendo extraíbles tanto los glucósidos de flavonoides como las

enzimas del polen de gramíneas.

[0011] De hecho, se demostró que en el polen de gramíneas se identifican glucósidos de flavonoides en forma de: diglucósido de isorramnetina, diglucósido de quercetina y diglucósido de canferol. En las condiciones del protocolo de larga duración de 24 h de la prueba MLA/TK, estos glucósidos de flavonoides se desglucosilan para dar las correspondientes agluconas de flavonoides (es decir, isorramnetina, quercetina y canferol, respectivamente), siempre que estén en presencia de las proteínas del polen de gramíneas. En particular, el 20 % del diglucósido de quercetina se desglucosila para dar quercetina, siendo esta última, con diferencia, la más genotóxica de las tres agluconas de flavonoides liberadas del polen de gramíneas.

[0012] Se ha descrito previamente que los flavonoides están firmemente adsorbidos a proteínas por interacciones físicas y químicas en extractos de polen de árboles, gramíneas, plantas herbáceas y plantas florales.

[0013] Por ejemplo, la patente US 5.770.698 describió la eliminación de compuestos indeseados no alergénicos de extractos acuosos de polen mediante la disrupción de fuerzas electrostáticas, fuerzas hidrófobas u otras fuerzas físicas, en particular con el uso de materiales ácidos o alcalinos, sales y corrientes eléctricas (electroforesis). La eliminación de flavonoides y/o glucósidos se contempló más específicamente ya que se ha descrito que estos compuestos probablemente modulan la respuesta biológica normal de los mastocitos, basófilos, leucocitos polimorfonucleares y neutrófilos. En particular, se describió que los flavonoides, que están firmemente adsorbidos a proteínas, resistían una simple diálisis o ultrafiltración a pH neutro a través de membranas con un límite de exclusión nominal de 10 kDa. La patente US 5.770.698 describe más específicamente la eliminación de pigmentos, incluidos flavonoides, por diálisis de un extracto de polen en agua acidificada a pH 2 frente a 100 volúmenes de agua (pH 6-7,5). Este procedimiento se describe para eliminar el 15-65 % (p/p) de los pigmentos adsorbidos con respecto al peso seco de la preparación de proteínas de polen original. Sin embargo, la patente US 5.770.698 también señala posibles desventajas asociadas a este procedimiento, es decir, la desnaturalización o pérdida de determinantes estructurales esenciales de las proteínas debido a la exposición de las proteínas a un pH tan bajo.

[0014] También se ha descrito que se eliminan los pigmentos, inclusive flavonoides, adsorbidos físicamente a alérgenos de polen de ambrosía mediante la acidificación del extracto acuoso del polen a pH 2 y sometiendo el extracto posteriormente a diálisis frente a agua acidificada a pH 2 (Hidvégi T., Berrens L., Varga L., Marañón F., Schmidt B., Kirschfink M., Füst G., Clin. Exp. Immunol., abril de 1997, 108(1): 122-7). Se ha descrito que este procedimiento elimina el 37 % (p/p) del material de pigmentos (flavonoides) adsorbido.

[0015] Sin embargo, se encontró inesperadamente que los flavonoides pueden eliminarse satisfactoriamente de extractos acuosos de polen simplemente por intensificación de la ultrafiltración, sin perjudicar la inmunogenicidad de los alérgenos. De hecho, la ultrafiltración puede ser perjudicial para las proteínas, ya que estas se someten a altas fuerzas de cizallamiento durante el proceso. Por consiguiente, la intensificación de la ultrafiltración de un extracto acuoso de polen podría haber causado una alteración de los alérgenos. Además, dado que se sabe que los flavonoides y los glucósidos de flavonoides están firmemente adsorbidos a proteínas, era impredecible que un procedimiento basado solamente en ultrafiltración con agua pudiera conseguir la disrupción de la interacción entre flavonoides/glucósidos de flavonoides y proteínas.

[0016] El procedimiento de ultrafiltración optimizado descrito en este documento hizo posible preparar un extracto de polen de gramíneas que contenía menos del 0,001 % (p/p), respectivamente, de isorramnetina, quercetina y canferol (expresados en equivalentes de agluconas) en extractos liofilizados de polen de gramíneas (es decir, menos de 0,001 g, respectivamente, de isorramnetina, quercetina y canferol —expresados en agluconas— por 100 g de los extractos liofilizados de polen de gramíneas). En comparación, el extracto liofilizado de polen de gramíneas obtenido previamente usando el procedimiento de ultrafiltración no optimizado contenía un total del 0,17 % (p/p) de flavonoides (expresados en equivalentes de agluconas) (valor medio de tres lotes).

[0017] Una concentración del 0,001 % (p/p) de agluconas de flavonoides en un extracto liofilizado de polen de gramíneas es equivalente a una relación ponderal de 0,0057-0,0064 g de agluconas de flavonoides en 100 g de material de partida de polen, ya que se obtiene 1 g de liofilizado a partir de 5,7-6,4 g de materia prima de polen.

[0018] En consecuencia, la cantidad de flavonoides administrada con un comprimido de 300 IR al día hecho de extractos de polen de gramíneas obtenidos usando la etapa de ultrafiltración optimizada llevará a una ingestión diaria teórica inferior a 0,15 µg de flavonoides procedentes del polen (expresados en diglucósido de flavonol). En comparación, la ingestión diaria de flavonoides a través de la dieta común (frutas, verduras) es de 20 mg a 1 g (Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T. C., Pharmacol. Rev., 2000, 52: 673-751).

[0019] Por tanto, el posible riesgo asociado con estas muy bajas cantidades de flavonoides queda totalmente suprimido con la etapa de ultrafiltración optimizada, que conduce a una eliminación prácticamente completa de los flavonoides de los extractos de polen de gramíneas, por debajo de los límites de detección de procedimientos analíticos de alta sensibilidad como HPLC-DAD.

Resumen de la invención

[0020] La invención es como se define en las reivindicaciones.

Definiciones

[0021] Según se usa en este documento, un “alérgeno” se define como una sustancia, usualmente una proteína, que induce la producción de anticuerpos IgE en individuos predispuestos. Definiciones similares se presentan en las referencias siguientes: Clin. Exp. Allergy, n.º 26, págs. 494-516 (1996); Mol. Biol. of Allergy and Immunology, ed. R. Bush, Immunology and Allergy Clinics of North American Series (agosto de 1996). Un alérgeno puede ser cualquier cadena aminoacídica que tienda a desencadenar una respuesta alérgica, incluidos péptidos cortos de aproximadamente 6 a 20 aminoácidos, polipéptidos o proteínas completas. Pueden estar glucosilados.

[0022] Algunos ejemplos no limitantes de alérgenos incluyen alérgenos de polen (tales como alérgenos de polen de árboles, hierbas, malas hierbas y gramíneas), alérgenos de insectos (tales como alérgenos de saliva y veneno, p. ej., alérgenos de cucarachas y mosquitos, alérgenos del veneno de himenópteros), alérgenos de ácaros, alérgenos de animales (p. ej., de perros, gatos, caballos, ratas, ratones, etc.) y alérgenos alimentarios.

[0023] Alérgenos de polen importantes son tales alérgenos del género *Ambrosia*, alérgenos del género *Lolium*, alérgenos del género *Cryptomeria*, alérgenos del género *Alternaria*, alérgenos del género *Alder*, alérgenos del género *Betula*, alérgenos del género *Quercus*, alérgenos del género *Olea*, alérgenos del género *Artemisia*, alérgenos del género *Plantago*, alérgenos del género *Parietaria*, alérgenos del género *Cupressus*, alérgenos del género *Thuya*, alérgenos del género *Chamaecyparis*, alérgenos del género *Periplaneta*, alérgenos del género *Agropyron*, alérgenos del género *Secale*, alérgenos del género *Triticum*, alérgenos del género *Cynorhodon*, alérgenos del género *Juniperus*, alérgenos del género *Dactylis*, alérgenos del género *Festuca*, alérgenos del género *Poa*, alérgenos del género *Avena*, alérgenos del género *Holcus*, alérgenos del género *Anthoxanthum*, alérgenos del género *Arrhenatherum*, alérgenos del género *Agrostis*, alérgenos del género *Phleum*, alérgenos del género *Phalaris*, alérgenos del género *Paspalum* y alérgenos del género *Sorghum*.

[0024] Algunos ejemplos de diversos alérgenos de polen conocidos de algunos de los géneros identificados anteriormente incluyen: *Cynorhodon* Cyn d 1; *Ambrosia (artemisiifolia)* Amb a 1, Amb a 2, Amb a 3, Amb a 4; *Lolium (perenne)* Lol p 1, Lol p 2, Lol p 3, Lol p 4, Lol p 5, Lol p 9; *Cryptomeria (japonica)* Cry j 1, Cry j 2, Cry j 3; *Juniperus (sabinooides o virginiana)* Jun s 1, Jun v 1; *Juniperus (ashei)* Jun a 1, Jun a 2; *Dactylis (glomerata)* Dac g 1, Dac g 5; *Poa (pratensis)* Poa p 1, Poa p 5; *Phleum (pratense)* Phl p 1, Phl p 5; *Anthoxanthum (odoratum)* Ant o 1, Ant o 5; *Betula (verrucosa)* Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4; y *Sorghum (halepensis)* Sor h 1.

[0025] Los alérgenos de insectos, alérgenos de ácaros y alérgenos de animales pueden incluir, en particular, alérgenos del género *Blomia*, alérgenos del género *Dermatophagoides*, alérgenos del género *Blattella* y alérgenos del género *Apis*; alérgenos del género *Felis* y alérgenos del género *Canis*. Los alérgenos preferidos incluyen: *Blomia tropicalis* Blo t 1, Blo t 3, Blo t 5, Blo t 12; *Dermatophagoides (pteronyssinus o farinae)* Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 5, Der p 7, Der f 1, Der f 2, Der f 3, Der f 5, Der f 7; *Felis (domesticus)* Fel d 1; *Canis (familiaris)* Can f 1, Can f 2; *Blattella (germanica)* Bla g 1, Bla g 2.

[0026] En el contexto de la invención, los términos “tratar”, “que trata” o “tratamiento” significa revertir, aliviar o inhibir el curso de una reacción patológica del sistema inmune o uno o más de los sistemas de la misma.

[0027] En el contexto de la invención, los términos “prevenir” o “que previene” significan el inicio de una reacción patológica del sistema inmune o uno o más de los síntomas del mismo.

[0028] Como se usa en este documento, el término “paciente” se refiere preferentemente a un ser humano, pero puede ser más generalmente un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate.

Procedimiento de reducción de la genotoxicidad in vitro de extractos de polen

[0029] La materia prima y extractos de polen (preparados convencionalmente mediante extracción de los alérgenos del polen con una disolución acuosa, seguida de separación, clarificación por filtración y ultrafiltración con una membrana de 1 kDa y lavado con 2,5 volúmenes de agua purificada) resultaron ser genotóxicos *in vitro* en una prueba MLA/TK al usar un tratamiento continuo de 24 h sin activación metabólica ("S9-").

5

[0030] Los flavonoides fueron identificados por los inventores como los agentes responsables de esta actividad genotóxica *in vitro*.

[0031] Por lo tanto, la solicitud describe un procedimiento de reducción de la genotoxicidad *in vitro* de un extracto de polen que comprende la etapa consistente en reducir la cantidad de un flavonoide en el extracto de polen.

[0032] El flavonoide puede ser al menos una aglucona de flavonoide o al menos un glucósido de flavonoide, preferentemente al menos un glucósido de flavonoide. El glucósido de flavonoide puede ser, en particular, una forma glucosilada de flavona, ramnetina, isorramnetina, canferol o quercetina. Preferentemente, el flavonoide se selecciona del grupo que consiste en diglucósido de isorramnetina, diglucósido de quercetina, diglucósido de canferol, glucósido de isorramnetina, glucósido de quercetina, glucósido de canferol, malonilglucósido de isorramnetina, malonilglucósido de quercetina y malonilglucósido de canferol.

[0033] Los inventores han identificado glucósido de isorramnetina, glucósido de quercetina, glucósido de canferol, malonilglucósido de isorramnetina, malonilglucósido de quercetina y malonilglucósido de canferol como los flavonoides presentes en el polen de ambrosía.

[0034] Aun preferentemente, el procedimiento de reducción de la genotoxicidad *in vitro* comprende la reducción de la cantidad de diglucósido de isorramnetina, diglucósido de quercetina y diglucósido de canferol en el extracto de polen.

[0035] También preferentemente, el procedimiento de reducción de la genotoxicidad *in vitro* comprende la reducción de la cantidad de glucósido de isorramnetina, glucósido de quercetina, glucósido de canferol, malonilglucósido de isorramnetina, malonilglucósido de quercetina y malonilglucósido de canferol.

[0036] Según se usa en este documento la "reducción de la cantidad de un flavonoide en el extracto de polen" significa una reducción detectable de la cantidad de al menos un flavonoide en el extracto de polen, p. ej., al menos dos veces, preferentemente 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces o 300 veces. Preferentemente, los flavonoides se eliminan completamente del extracto de polen, es decir, se eliminan en una medida tal que su cantidad o concentración queda por debajo de los límites de detección.

[0037] Según un aspecto preferido, la cantidad de cada flavonoide en el extracto de polen es inferior al 0,002 %, preferentemente el 0,001 %, expresada en peso de flavonoide con respecto al peso de la fracción derivada del polen (es decir, 0,002 g, preferentemente 0,001 g de flavonoide por 100 g de la fracción derivada del polen), estando expresada la cantidad de flavonoide en el equivalente de aglucona.

[0038] La fracción derivada del polen es la fracción de material que deriva del polen, que excluye por tanto cualquier aditivo usado en el transcurso del proceso de purificación, como sales, aditivos de liofilización, etc.

45

[0039] El "extracto de polen" puede ser un extracto de polen de árboles, un extracto de polen de gramíneas, un extracto de polen de hierbas, un extracto de polen de malas hierbas o mezclas de los mismos. Por ejemplo, el extracto de polen puede ser una mezcla de extractos de polen de árboles, una mezcla de extractos de polen de gramíneas, una mezcla de extractos de polen de hierbas, una mezcla de extractos de polen de malas hierbas o una mezcla de polen de malas hierbas o una mezcla de extractos de polen de árboles y/o gramíneas y/o hierbas y/o malas hierbas. El polen puede ser una mezcla de polen de árboles, una mezcla de polen de gramíneas, una mezcla de polen de hierbas o una mezcla de polen de malas hierbas o una mezcla de polen de árboles y/o gramíneas y/o hierbas y/o malas hierbas. El extracto de polen puede ser entonces un extracto de estas mezclas de polen. Un extracto de polen contiene alérgenos de polen.

55

[0040] Preferentemente, el extracto de polen es un extracto de una mezcla que consiste en o comprende polen de dactilo, espiguilla, raigrás, grama de olor y hierba timotea.

[0041] El procedimiento para reducir la genotoxicidad *in vitro* puede implementarse utilizando cualquier procedimiento disponible para el experto en la materia para reducir la cantidad de flavonoides en un extracto de

60

polen.

5 **[0042]** Se pueden utilizar procedimientos tales como los descritos en la patente US 5.770.698 o según lo publicado por Hidvégi y col. (Clin. Exp. Immunol., abril de 1997; 108(1): 122-7), que implica la acidificación de extractos de polen acuosos a un pH inferior a 3, preferentemente a aproximadamente un pH de 2, seguido de diálisis. Sin embargo, debido a estas condiciones drásticas, los alérgenos pueden sufrir desnaturalización. Por lo tanto, se prefiere utilizar procedimientos alternativos para reducir el contenido de flavonoides de los extractos de polen.

10 **[0043]** La eliminación de los flavonoides se realiza preferentemente mediante ultrafiltración del extracto o extractos de polen con agua, preferentemente que contenga bicarbonato de amonio.

15 **[0044]** De hecho, los inventores demostraron que, en contra de asunciones anteriores, la ultrafiltración con agua purificada, es decir, la ultrafiltración a pH neutro puede usarse satisfactoriamente para reducir la cantidad de flavonoides o eliminarlos. Para ello, se aumentó el grado de purificación del extracto de polen por ultrafiltración. Sin embargo, dado que la intensificación de la ultrafiltración podría conducir a la degradación de los alérgenos, se diseñó un procedimiento de ultrafiltración optimizado que puede usarse para implementar el procedimiento de reducción de la genotoxicidad *in vitro* según la invención. A continuación, se ofrece una descripción más detallada de este procedimiento de ultrafiltración optimizado. Todas las características descritas en relación con este
20 procedimiento de ultrafiltración optimizado deben considerarse como descritas en combinación con el presente procedimiento de reducción de la genotoxicidad *in vitro* de extractos de polen.

Extractos de polen purificados con genotoxicidad in vitro reducida

25 **[0045]** El procedimiento anterior de reducción de la genotoxicidad *in vitro* de un extracto de polen, especialmente cuando se implementa usando un procedimiento de ultrafiltración optimizado como se describe en este documento, conduce ventajosamente a extractos de polen que tienen una cantidad de cada flavonoide inferior al 0,002 %, expresada en peso de flavonoide con respecto al peso de la fracción derivada del polen (es decir, inferior a 0,002 g de flavonoide por 100 g de la fracción derivada del polen), estando expresada la cantidad de flavonoide en
30 equivalentes de flavonoide.

[0046] Por consiguiente, la invención también proporciona un extracto de polen purificado en que cada flavonoide está contenido en una cantidad inferior a 0,002 g por 100 g de la fracción derivada del polen, expresada en el equivalente de aglucona. Preferentemente, cada flavonoide está contenido en una cantidad inferior a 0,001 g
35 por 100 g de la fracción derivada del polen, expresada en el equivalente de aglucona.

[0047] El extracto de polen puede ser tal como se define anteriormente. Preferentemente, el extracto de polen es un extracto de una mezcla que consiste en o comprende polen de dactilo, espiguilla, raigrás, grama de olor y hierba timotea.
40

[0048] El extracto de polen purificado carece esencialmente de flavonoides y, en consecuencia, ya no presenta genotoxicidad *in vitro* en la prueba MLA/TK.

45 **[0049]** Por consiguiente, el extracto de polen purificado según la invención puede formularse en forma de una composición farmacéutica, junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Dicho extracto de polen purificado, proporcionado opcionalmente en forma de una composición farmacéutica, puede usarse ventajosamente para tratar y/o prevenir la alergia al polen, mediante desensibilización, al tiempo que minimiza el riesgo de genotoxicidad inducida en el paciente que recibe el tratamiento.

50 **[0050]** Por lo tanto, la solicitud describe un extracto de polen purificado en el que cada flavonoide está contenido en una cantidad que es inferior a 0,002 g, preferentemente menor a 0,001 g, por 100 g de fracción derivada de polen, expresada en equivalente de aglucona, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una alergia al polen, en particular para la desensibilización de la alergia al polen. Este tratamiento o prevención de la alergia al polen se asocia con un riesgo reducido de genotoxicidad.
55

[0051] La solicitud también describe un procedimiento para tratar y/o prevenir una alergia al polen, en particular un procedimiento de desensibilización de la alergia al polen, cuyo procedimiento comprende administrar repetidamente a un paciente que lo necesite un extracto de polen purificado, en el que cada flavonoide está contenido en una cantidad que es inferior a 0,002 g, preferentemente inferior a 0,001 g, por 100 g de fracción
60 derivada de polen, expresada en equivalentes de aglucona.

[0052] La administración del extracto de polen o la composición farmacéutica se puede mantener, por ejemplo, durante un periodo de menos de 6 semanas a más de 3 años.

5 **[0053]** La alergia al polen puede ser una alergia al polen de los árboles, una alergia al polen de las gramíneas, una alergia a las malas hierbas o alergias combinadas. Sin embargo, preferentemente se usa un extracto de polen de árboles para tratar una alergia al polen de los árboles, se usa un extracto de polen de hierbas para tratar una alergia al polen de las hierbas, se usa un extracto de polen de malas hierbas para tratar una alergia al polen de las malas hierbas y se usa un extracto de polen de gramíneas para tratar una alergia al polen de las gramíneas.
10

Procedimiento de ultrafiltración optimizado

[0054] Extractos de alérgenos purificados, en particular extractos de polen y extractos de ácaros purificados, se han preparado anteriormente mediante extracción de los alérgenos de la materia prima del polen o de ácaros del polvo doméstico con una disolución acuosa, seguida de separación, clarificación por filtración, concentración y ultrafiltración con una membrana de 1 kDa y lavado con 2,5 volúmenes de agua purificada.
15

[0055] Los inventores han conseguido desarrollar un procedimiento de ultrafiltración optimizado que permite aumentar el grado de purificación de los alérgenos sin efectos perjudiciales sobre la calidad de la preparación de alérgenos, p. ej., desnaturalización de las proteínas. Más específicamente, los análisis de los extractos de alérgenos mediante IEF (isoelectroenfoque), electroforesis SDS-PAGE e inmunotransferencias, respectivamente, demuestran que el perfil de los extractos de alérgenos no se altera por la modificación del procedimiento de ultrafiltración. En conjunto, el contenido de proteína y la actividad inmunológica de los alérgenos purificados se mantienen inalterados.
20

[0056] Sin embargo, si los alérgenos son alérgenos de polen, el procedimiento de ultrafiltración optimizado permite eliminar los flavonoides por debajo de límites detectables.
25

[0057] El mismo procedimiento se aplicó a la purificación de alérgenos de ácaros, en particular, alérgenos de ácaros del polvo doméstico, y permitió aumentar el nivel de pureza de la preparación de alérgenos.
30

[0058] Por consiguiente, el procedimiento de ultrafiltración optimizado debería poderse aplicar generalmente a la purificación de cualquier extracto de alérgenos, es decir, alérgenos de polen (de árboles, gramíneas, hierbas, malas hierbas), insectos, veneno, ácaros, animales y alérgenos alimentarios, alérgenos de veneno.
35

[0059] El procedimiento de preparación de extractos de alérgenos purificados puede comprender una etapa de ultrafiltración de un extracto acuoso de alérgenos con una membrana de 1-10 kDa y al menos 5 volúmenes de agua purificada.
40

[0060] En comparación con la ultrafiltración con una membrana de 1 kDa y lavado con 2,5 volúmenes de agua purificada, estas condiciones permiten eliminar esencialmente todos los flavonoides presentes en un extracto de polen. Sin embargo, cuando el extracto de polen purificado se somete después a una filtración final a través de un filtro de 0,22 µm para esterilizar el extracto, se observa una obstrucción de la filtración. El mismo fenómeno se observó con extracto de ácaros. Sin querer limitarse a una teoría, se piensa que el aumento de los volúmenes de agua usada para la ultrafiltración conduce a una disminución de la fuerza iónica, lo que a su vez puede inducir esta obstrucción de la filtración.
45

[0061] Esta desventaja se eliminó usando una disolución de bicarbonato de amonio para la ultrafiltración, en lugar de agua purificada. Se pueden usar otras disoluciones acuosas tamponadas, como en particular, disoluciones tamponadas con fosfatos, en lugar de la disolución de bicarbonato de amonio. Alternativamente, puede añadirse bicarbonato de amonio y una sal de tampón con fosfato al extracto de alérgenos purificado después de la ultrafiltración, pero antes de la subsiguiente filtración de esterilización.
50

[0062] Por consiguiente, la solicitud describe un procedimiento de preparación de un extracto de alérgenos purificado, cuyo procedimiento comprende una etapa de ultrafiltración de un extracto acuoso de alérgenos con una membrana de 1-10 kDa y al menos 5 volúmenes de disolución de bicarbonato de amonio. En particular, dicha ultrafiltración puede realizarse con una membrana de 2-10 kDa, preferentemente de 5-10 kDa, y al menos 10 volúmenes de una disolución acuosa seleccionada del grupo que consiste en agua purificada y una disolución tamponada, tal como una solución de bicarbonato de amonio y una disolución tamponada con fosfato. Según un aspecto, pueden usarse como máximo 30 volúmenes de la disolución acuosa.
60

- [0063]** El número de volúmenes de la solución acuosa usados para la ultrafiltración se expresa en referencia al volumen del extracto acuoso de alérgenos cargado en la membrana.
- 5 **[0064]** Preferentemente, en el procedimiento, la etapa de ultrafiltración se realiza con una membrana de 2-10 kDa, preferentemente una membrana de 5-10 kDa y aun preferentemente con una membrana de 5 kDa.
- [0065]** Cuando la disolución acuosa es agua purificada, se prefiere que se use para la ultrafiltración entre 5 y 15 volúmenes de agua purificada, aun preferentemente 10, 11, 12, 13, 14 o 15 volúmenes de agua purificada, ya
10 que se podría observar una disminución de la alergenicidad con mayores volúmenes de agua purificada.
- [0066]** Cuando la disolución acuosa es una disolución de bicarbonato de amonio u otra disolución tamponada, como una disolución tamponada con fosfato, pueden usarse hasta 30 volúmenes de disolución sin efectos perjudiciales para la alergenicidad de la preparación. Podrían usarse volúmenes mayores, pero sin una
15 ganancia significativa en cuanto al grado de purificación. Por lo tanto, se prefiere usar para la ultrafiltración de 10 a 30 volúmenes, preferentemente de 10 a 20, aun preferentemente de 10 a 15 volúmenes, lo más preferentemente 11, 12, 13, 14 o 15 volúmenes de disolución de bicarbonato de amonio.
- [0067]** La disolución de bicarbonato de amonio puede contener entre aproximadamente 100 y 150 ppm de
20 amoníaco, preferentemente aproximadamente 120 ppm de amoníaco. Tales contenidos de amoníaco pueden alcanzarse con disoluciones de bicarbonato de amonio con una concentración en el intervalo de 0,4 a 0,8 g/l, preferentemente de 0,46 g/l a 0,7 g/l, aun preferentemente de 0,5 a 0,6 g/l, lo más preferentemente de 0,56 g/l.
- [0068]** De este modo, el procedimiento de preparación de un extracto de alérgenos purificado puede
25 comprender una etapa de ultrafiltración de un extracto acuoso de alérgenos con una membrana de 5-10 kDa y de 10 a 30 volúmenes de una disolución de bicarbonato de amonio de 0,4 g/l a 0,8 g/l.
- [0069]** Preferentemente, la ultrafiltración del extracto acuoso de alérgenos se realiza con una membrana de 5
30 kDa y de 10 a 20 volúmenes, aun preferentemente de 10 a 15 volúmenes, lo más preferentemente con 11, 12, 13, 14 o 15 volúmenes de una disolución de bicarbonato de amonio de 0,5 a 0,6 g/l.
- [0070]** Lo más preferentemente, la ultrafiltración de dicho extracto acuoso de alérgenos se realiza con una membrana de 5 kDa y 15 volúmenes de una disolución de bicarbonato de amonio de 0,56 g/l.
- 35 **[0071]** El extracto de alérgenos es preferentemente una mezcla de extractos de polen que consiste en o comprende extractos de dactilo, espiguilla, raigrás, grama de olor y hierba timotea.
- [0072]** El proceso de ultrafiltración optimizado hace posible la preparación de un extracto de polen purificado que contiene una cantidad total de flavonoides inferior al 0,001 %, expresada en peso de flavonoides secos con
40 respecto al peso del extracto de polen seco (es decir, 0,001 g de flavonoides secos por 100 g de extracto de polen seco). En comparación, el extracto de polen purificado preparado mediante el proceso de ultrafiltración usado previamente (una membrana de 1 kDa y lavado con 2,5 volúmenes de agua purificada) contiene el 0,36 % (p/p) de flavonoides.
- 45 **[0073]** Otros extractos de alérgenos preferidos son extractos de ácaros del polvo doméstico, en particular, extractos de alérgenos de *Blomia tropicalis* o *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Dermatophagoides farinae*. Preferentemente, los extractos de alérgenos comprenden Der p I y/o Der p II.
- [0074]** El procedimiento de preparación de extractos de alérgenos purificados comprende además una etapa
50 de filtración con un filtro de 0,22 µm.
- [0075]** El procedimiento de preparación de extractos de alérgenos purificados puede comprender un secado, p. ej., por liofilización o por pulverización, del extracto de alérgenos purificado para su posterior almacenamiento o formulación en una composición farmacéutica sólida, como un comprimido.
55
- [0076]** El procedimiento de preparación de extractos de alérgenos purificados puede comprender además una etapa de formulación de dicho extracto de polen purificado en una composición farmacéutica.
- [0077]** La solicitud describe además un extracto de alérgeno purificado que se puede obtener mediante el
60 procedimiento de preparación de extracto de alérgeno purificado.

[0078] También se describe una composición farmacéutica que comprende un extracto de alérgeno purificado, cuya composición farmacéutica se puede obtener mediante el procedimiento de preparación de extracto de alérgeno purificado y la formulación de dicho extracto de alérgeno purificado en una composición farmacéutica.

5

[0079] Preferentemente, la composición farmacéutica es un comprimido para su uso en la desensibilización de la alergia sublingual.

Composiciones farmacéuticas

10

[0080] Según se usa en este documento, un “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, retardantes de absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica.

15

[0081] En el marco de la invención, las composiciones farmacéuticas pueden incluir cualquier adyuvante de vacunación convencional, incluidas la enterotoxina termolábil (LT), la toxina del cólera (CT), la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), liposomas polimerizados o toxinas mutantes.

20

[0082] Para la administración por vía oromucosal, los adyuvantes pueden ser preferentemente un *Bifidobacterium*, una bacteria del ácido láctico (en forma de una suspensión celular, células liofilizadas, un lisado, subcomponentes purificados o moléculas purificadas) o una combinación de un corticosteroide con vitamina D3 o cualquier metabolito o análogo de esta última.

25

[0083] Ventajosamente, si se contempla la administración por vía mucosal, el adyuvante puede ser un vector particulado sintético que comprende un núcleo hidrófilo no líquido, el cual comprende un polisacárido reticulado. Se ha encontrado que una formulación semejante es particularmente eficiente en la inducción de tolerancia inmunitaria. Las partículas que pueden usarse se describen en la solicitud de patente internacional PCT/IB2007/002379.

30

[0084] Brevemente, el polisacárido reticulado puede derivar de cualquier monómero sacárido, preferentemente glucosa. Los polisacáridos tienen preferentemente un peso molecular de entre 2.000 y 100.000 Da y lo más preferentemente de 3.000 a 10.000 Da. Los polisacáridos preferidos son almidón (polímeros de glucosa α ,1-4) y dextrano (polímeros de glucosa α ,1-6 de origen bacteriano) o hidrolizados de los mismos como dextrinas o maltodextrinas.

35

[0085] Opcionalmente, existen grupos iónicos, es decir, grupos aniónicos (p. ej., sulfato o carboxilato) o catiónicos (p. ej., iones de amonio cuaternario y aminas primarias, secundarias o terciarias) insertados en el núcleo del polisacárido reticulado (preferentemente de 0 a 3 miliequivalentes, más preferentemente de 0 a 2 miliequivalentes de carga iónica por gramo).

40

[0086] Opcionalmente, el núcleo del polisacárido reticulado está al menos parcialmente recubierto con una capa de compuestos anfífilos y/o una capa de compuestos lipídicos.

45

[0087] El diámetro de las partículas puede estar comprendido entre 10 nm y 5 μ m y, preferentemente, entre 20 y 200 nm.

50

[0088] Para la administración por vía parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y el líquido diluyente debe hacerse primeramente isotónico con suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas concretas son especialmente adecuadas para la administración por vía intramuscular y subcutánea. En este sentido, los expertos en la técnica conocerán los medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente descripción.

55

[0089] Preferentemente, la composición farmacéutica ha de administrarse por vía mucosal, más preferentemente por vía oromucosal y lo más preferentemente por vía sublingual. Como tal, la composición farmacéutica y el medicamento se formulan preferentemente en una forma adaptada a tales vías de administración.

60

[0090] Una administración por vía mucosal denota cualquier procedimiento de administración en el que la formulación entra en contacto parcial o totalmente con una mucosa. Una mucosa se refiere al tejido epitelial que reviste las cavidades internas del cuerpo. La superficie mucosal puede seleccionarse del grupo que consiste en una superficie nasal, bucal, oral, vaginal, ocular, auditiva, de las vías pulmonares, uretral, del aparato digestivo y rectal.

5 [0091] La administración por vía oromucosal comprende cualquier procedimiento de administración, en el que la formulación entra en contacto parcial o totalmente con la mucosa de la cavidad oral y/o la faringe del paciente. Incluye, en particular, la administración por vías sublingual, perlingual (es decir, a través de la mucosa de la lengua) y oral.

[0092] Preferentemente, la composición farmacéutica se formula en forma de un comprimido para la administración sublingual.

10 [0093] Según una realización, la composición farmacéutica comprende un extracto de una mezcla de polen que consiste en o comprende dactilo, espiguilla, raigrás, grama de olor y hierba timotea.

15 [0094] Según otro aspecto, la composición farmacéutica comprende un alérgeno de ácaros del polvo doméstico, tal como un alérgeno de *Blomia tropicalis* o de *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Dermatophagoides farinae*. Preferentemente, el alérgeno es Der p 1 y/o Der 2 y/o Der f 1 y/o Der f 2.

[0095] La invención se ilustrará adicionalmente a la vista de las figuras y ejemplos siguientes.

FIGURAS

20

[0096]

La figura 1 muestra el área acumulada de los picos correspondientes a los diferentes flavonoides encontrados en extractos de polen de gramíneas antes (0 h) y después de una incubación de 3 h y de 24 h a 37 °C.

25 La figura 2 ilustra la cantidad de flavonoides contenidos en un extracto concentrado de polen de cinco gramíneas antes y después de una ultrafiltración con 2,5 volúmenes (según el proceso de preparación no optimizado anterior) y 15 volúmenes (según el proceso de preparación optimizado) de bicarbonato de amonio de 120 ppm. Los resultados se expresan como la suma de las superficies integradas del pico 1 (tiempo de retención 14,83 min) y el pico 2 (tiempo de retención 15,00 min).

30

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materia prima y proceso inicial (es decir, proceso no modificado) para la preparación de extractos de polen

35

[0097] La materia prima consistió en polen desengrasado de dactilo, espiguilla, raigrás, grama de olor y hierba timotea.

40 [0098] El proceso de purificación usado para preparar un extracto de polen purificado o una mezcla purificada de extractos de polen comprende típicamente las etapas de:

- opcionalmente, mezclar polen procedente de diferentes especies, si se pretende purificar una mezcla de polen;
- extraer el polen mediante su puesta en contacto con una disolución de extracción, típicamente una disolución acuosa como agua destilada o una disolución en agua destilada tamponada;
- 45 - separar la fase acuosa de la fase sólida, por ejemplo, por centrifugación, para recuperar la fase acuosa que contiene los alérgenos extraídos del polen (extracto de polen);
- clarificar el extracto de polen por filtración;
- concentrar el extracto de polen mediante su paso a través de una membrana de 1 kDa o de 5 kDa;
- someter el material retenido a ultrafiltración con una membrana de 1 kDa y lavado con 2,5 volúmenes de agua purificada; y
- 50 - filtrar a través de un filtro de 0,22 µm para esterilizar el extracto de polen purificado.

[0099] Típicamente, el extracto de polen purificado luego se liofiliza y se formula en una composición farmacéutica apropiada, p. ej., un comprimido.

55

[00100] La materia prima del polen y los extractos de polen preparados según el proceso anterior resultaron ser genotóxicos en un ensayo de linfoma de ratón (MLA)/TK al usar un tratamiento continuo de 24 h sin activación metabólica ("S9-").

60 **Ejemplo 2: Cuantificación de los contaminantes genotóxicos externos**

[00101] Se evaluaron cuatro grupos de elementos genotóxicos del entorno agrícola en la materia prima del polen de gramíneas, según se resume a continuación en la tabla 1:

5 **Tabla 1.** Contaminantes genotóxicos analizados en comprimidos de materia prima

Clase de contaminantes potenciales	Procedimiento de cuantificación	Muestras analizadas	Resultados	Conclusiones
Radioelementos artificiales ¹³⁴ Cs y ¹³⁷ Cs	Espectrometría Gamma	Dos lotes (de dos proveedores diferentes) de polen de cada una de las especies dactilo, espiguilla, raigrás, grama de olor o hierba timotea = un total de 10 lotes	No se detectó actividad debida a los radioelementos artificiales ¹³⁴ Cs y ¹³⁷ Cs en la materia prima del polen de gramíneas	Cumple el reglamento de la CEE (Reglamento del Consejo (CE) n.º 616/200 del 20 de marzo de 2000)
Metales pesados (Cd, Ni y Cr)	<u>Cadmio (Cd):</u> espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) tras mineralización <u>Níquel (Ni) y cromo (Cr):</u> espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (GFAAS)	Un total de 17 lotes de polen de las especies dactilo, espiguilla, raigrás, grama de olor o hierba timotea de tres proveedores Dos lotes (de dos proveedores diferentes) de polen de cada una de las especies dactilo, espiguilla, raigrás, grama de olor o hierba timotea = un total de 10 lotes	Cd fue indetectable (<0,5 ppm) en todos los lotes analizados Ni y Cr fueron <10 ppm y <2 ppm, respectivamente en los lotes analizados	Cd está muy por debajo (al menos 250 veces) de la dosis límite calculada (125 ppm) Ni y Cr están muy por debajo (más de 10 veces y 60 veces, respectivamente) de la dosis límite calculada (125 ppm)
Micotoxinas (aflatoxinas B1 y 2, G1 y 2; DON* / vomitoxin; fumonisinias B1 y 2; ocratoxina A; zearalenona)	HPLC	Dos lotes (de dos proveedores, excepto para una especie) de polen de cada una de las especies dactilo, espiguilla, raigrás, grama de olor o hierba timotea = un total de 10 lotes	Indetectables o justo por encima del límite de detección (aflatoxina B1 en un lote) en todos los lotes analizados	Todas las micotoxinas están muy por debajo (1.250 veces o más) de las dosis límite calculadas (dependientes de la aflatoxina considerada)
Benzo[a]pireno	Cromatografía de gases con dilución isotópica seguida de espectrometría de masas (GC-MS)	Dos lotes (de dos proveedores diferentes) de polen de cada una de las especies dactilo, espiguilla, raigrás, grama de olor o hierba timotea = un total de 10 lotes	Indetectable o justo por encima del límite de detección (en un lote) en todos los lotes analizados	El benzo[a]pireno está muy por debajo (al menos 1,6 x 10 ⁵ veces) de la dosis límite calculada (125 ppm)

* Desoxinivalenol

[00102] Las cuatro categorías de contaminantes que podrían ocasionar un potencial genotóxico *in vitro* resultaron indetectables y/o muy por debajo de las dosis límite calculadas según las directrices apropiadas (es decir, de sanidad alimentaria) en al menos 10 lotes de la materia prima usada para preparar los comprimidos de polen de gramíneas.

[00103] Por lo tanto, el perfil genotóxico de la materia prima del polen de gramíneas y de sus extractos *solamente* puede explicarse por una *sustancia o sustancias intrínsecas* del polen de gramíneas.

Ejemplo 3: Búsqueda de sustancias intrínsecas con potencial genotóxico *in vitro*

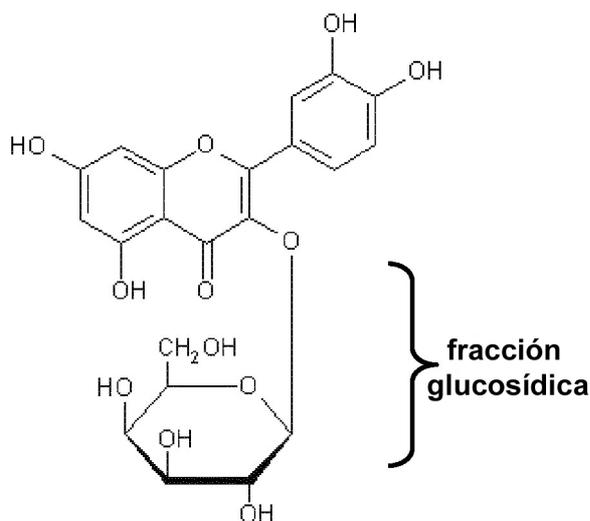
5

[00104] Cuatro sustancias o grupos de sustancias que podrían ser las sustancias intrínsecas del polen de gramíneas que explicarían el potencial genotóxico *in vitro* observado se seleccionaron para un análisis más detallado:

- 10 - ácidos clorogénico y cafeico (Fung V. A., Cameron T. P., Hughes T. J., Kirby P. E., Dunkel V. C., Mutat. Res. 1988, 204: 219-228),
 - cumarina (Kevekordes S., Spielberger J., Burghaus C. M., Birkenkamp P., Zietz B., Paufler P., Diez M., Bolten C., Dunkelberg H., Anticancer Res. 2001, 21: 461-469; Möller M., Stopper H., Haring M., Schlegler Y., Epe B., Adam W., Saha-Moller C. R., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, 216: 693-701),
- 15 - alcaloides (Liu S. X., Cao J., Yuan J., Huang P., Shua P. Q., Honma M., Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2003, 28: 957-961), y
 - flavonoides (Caria H., Chaveca T., Laires A., Rueff J., Mutat. Res. 1995, 343: 85-94; Müller L. y Kasper P., Mutat. Res. 2000, 464: 19-34 (revisión); Antognoni F., Ovidi E., Taddei A. R., Gambellini G., Speranza A., Altern. Lab. Anim. 2004, 32: 79-90; Meltz M. L., McGregor J. T., Mutat. Res. 1981, 88: 317-324; Snyder R. D., Gillies P. J., Environ. Mol. Mutagen. 2002, 40: 266-276; Nagao M., Morita N., Yahagi T., Shimizu M., Kuroyanagi M., Fukuoka M., Yoshihira K., Natori S., Fujino T., Sugimura T., Environ. Mutagen. 1981, 3: 401-419).

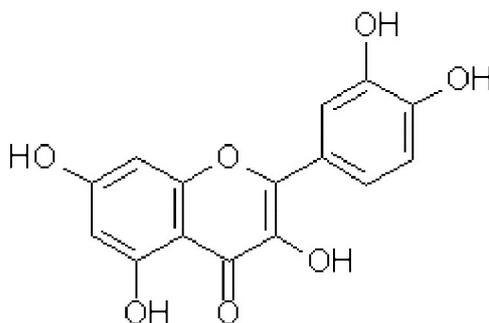
[00105] De manera importante, pueden distinguirse dos formas de flavonoides:

- 25 - glucósidos de flavonoides, como se ejemplifica por hiperósido:



- y agluconas de flavonoides, como se ejemplifica por quercetina (la aglucona de hiperósido)

30



[00106] La presencia o ausencia de los ácidos cafeico o clorogénico, cumarina, alcaloides, flavonoides glucosilados o agluconas en pólenes de gramíneas se evaluó mediante cromatografía en capa fina (TLC).
 5 Brevemente, la materia prima o extractos de polen de gramíneas se procesaron usando disolventes orgánicos (hexano, metanol...) y se les permitió migrar en un gel de sílice en una mezcla de disolventes específica para el compuesto analizado.

[00107] No pudieron encontrarse ni ácido clorogénico, ni ácido cafeico, cumarina o alcaloides en una mezcla
 10 de polen de cinco gramíneas.

[00108] Con respecto a los flavonoides, se observaron bandas en el polen de cada una de las especies de gramíneas individuales usando un protocolo destinado a la detección de glucósidos de flavonoides. A la inversa, no
 15 pudieron encontrarse agluconas de flavonoides en el polen de gramíneas usando el protocolo apropiado.

[00109] Por consiguiente, de todas las sustancias o grupos de sustancias ensayados que se conoce que tienen un potencial genotóxico *in vitro*, solamente se encontraron flavonoides en el polen de gramíneas. Más específicamente, los flavonoides encontrados en el polen de gramíneas fueron únicamente glucósidos de flavonoides, ya que no pudieron detectarse agluconas de flavonoides. Esto es consistente con los datos publicados,
 20 ya que los flavonoides más comunes aislados de polen son glucósidos de flavonoides, mientras que las agluconas no se presentan en el polen de forma natural (Mo Y., Nagel C., Taylor L. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992, 89: 7213-7217; Campos M. G., Webby R. F., Markham K. R., Z. Naturforsch. [C]. 2002, 57: 944-946).

Ejemplo 4: Explicación del potencial genotóxico *in vitro* de los extractos de polen de gramíneas por los flavonoides intrínsecos

4.1 Hipótesis de trabajo y planteamiento científico

[00110] A la vista de los resultados anteriores, se concluyó que el potencial genotóxico de los extractos de polen de gramíneas debía estar asociado con flavonoides intrínsecos. Sin embargo, no se ha descrito una toxicidad *in vitro* para los glucósidos de flavonoides contenidos en los extractos de polen, mientras que se sabe que las agluconas de flavonoides, que no son detectables en los extractos, presentan potencial genotóxico *in vitro* (Antognoni F., Ovidi E., Taddei A. R., Gambellini G., Speranza A., Altern. Lab. Anim. 2004, 32: 79-90; Nagao M., Morita N., Yahagi T., Shimizu M., Kuroyanagi M., Fukuoka M., Yoshihira K., Natori S., Fujino T., Sugimura T., Environ. Mutagen. 1981, 3: 401-419; Brown J. P., Mutat. Res. 1980, 75: 243-277).
 35

[00111] Dado que se ha descrito una enzima capaz de desglucosilar un glucósido de flavonoide para dar su aglucona correspondiente en un modelo de polen (Taylor L. P., Strenge D., Miller K. D. The role of glycosylation in flavonol-induced pollen germination, Adv. Exp. Med. Biol. 1998, 439: 35-44), se planteó la hipótesis de que el potencial genotóxico *in vitro* observado en los extractos de polen de gramíneas sería debido a la desglucosilación de los glucósidos de flavonoides no genotóxicos para dar agluconas de flavonoides genotóxicas *in vitro* mediante una enzima o enzimas específicas, siendo tanto los glucósidos de flavonoides como la enzima o enzimas extraíbles de los pólenes.
 40

[00112] Para demostrar esta hipótesis de trabajo, se investigó si:
 45

- los flavonoides del polen de gramíneas pueden identificarse como glucósidos de flavonoides solamente presentes en cantidades cuantificables,
- estos glucósidos de flavonoides se desglucosilan para dar agluconas de flavonoides en las condiciones del

protocolo de larga duración de 24 h, pero no en los protocolos de corta duración de 3 h de la prueba MLA/TK, - las cantidades de agluconas de flavonoides liberadas en tales condiciones son consistentes con los resultados de la prueba MLA/TK obtenidos con los extractos liofilizados de polen de gramíneas.

5 *4.2. Identificación de los flavonoides del polen de gramíneas por HPLC en fase inversa y HPLC en fase inversa tras hidrólisis con HCl*

[00113] Los flavonoides del polen de gramíneas se identificaron primeramente por HPLC en fase inversa, en función de su hidrofobicidad. El análisis de HPLC en fase inversa se realizó en una columna Atlantis dC18, 4,6 x 250 mm, 5 µm, de Waters, Milford, MA, EE. UU.; con elución en gradiente: de ácido fórmico al 0,1 % en agua a ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo en 30 min; tasa de flujo: 1 ml/min; tiempo de ejecución: 45 min; longitud de onda de detección: 354 o 254 nm; volumen de inyección: 50 µl. De manera importante, los extractos de polen de gramíneas se diluyeron cinco veces en metanol antes del análisis con el fin de solubilizar tanto los glucósidos de flavonoides como las agluconas de flavonoides, siendo estas últimas difícilmente solubles en agua.

[00114] También se usó la hidrólisis con HCl antes del análisis de HPLC en fase inversa porque la hidrólisis de los glucósidos de flavonoides conduce a la desglucosilación. El análisis de HPLC de las moléculas desglucosiladas permite entonces la identificación de sus fracciones áglucónicas. Para la hidrólisis con HCl, los flavonoides de un extracto crudo de polen de gramíneas se purificaron primeramente en Amberlite XAD-2, una resina usada actualmente para el aislamiento de flavonoides (Gil M. I., Ferreres F., Tomás-Barberán F. A., J. Agric. Food Chem. 1998, 46: 2007-2012; D'Arcy B. R. Antioxidants in Australian floral honeys: Identification of health-enhancing nutrient components: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation. D'Arcy B. R., Barton, A. C. T.: Rural Industries, Research and Development Corporation, 2005, 84 p). Los estándares de agluconas de flavonoides y glucósidos de flavonoides se adquirieron de Extrasynthese (Genay, Francia).

[00115] El análisis de HPLC en fase inversa indicó que un extracto de polen de cinco gramíneas contiene: 1. una mayor parte de flavonoides de alta polaridad, que aparecen como los picos n.º 1 y n.º 2; 2. pequeñas cantidades de flavonoides de polaridad moderada, que aparecen como los picos n.º 3, n.º 4 y n.º 5; 3. no contiene agluconas de flavonoides detectables. Los tiempos de retención (RT) fueron los siguientes: pico n.º 1: 14,975; pico n.º 2: 15,151; pico n.º 3: 15,449; pico n.º 4: 16,022; pico n.º 5: 16,365; pico n.º 6: 17,117 (absorbancia a 354 nm).

[00116] Sobre la base del área de los picos, los picos n.º 1 y n.º 2 representan más del 90 % de los flavonoides detectados en total dentro del polen de gramíneas. En consecuencia, la identificación se centró en los componentes de los picos n.º 1 y n.º 2.

[00117] Según su RT, los principales flavonoides del extracto de polen de gramíneas (picos n.º 1 y n.º 2) eran probablemente diglucósidos de flavonoides. Sin embargo, dado que los RT observados no se correspondían con ninguno de los estándares de flavonoides probados (flavona, ramnetina, isoramnetina, canferol, quercetina, 4'-O-glucósido de quercetina, 3-O-glucósido de isoramnetina, 3-O-glucósido de canferol, 3-O-galactósido de quercetina, 3-O-glucósido de quercetina, 3-O-glucorramnósido de canferol, 3-O-glucorramnósido de quercetina, 3-O-robinósido-7-O-ramnósido de canferol), los principales flavonoides de los extractos de polen de gramíneas no pudieron identificarse en esta fase.

[00118] Con el fin de determinar las fracciones áglucónicas de los glucósidos de flavonoides del polen de gramíneas, se llevó a cabo una desglucosilación por hidrólisis con HCl de los flavonoides purificados de un extracto crudo de polen de gramíneas. La hidrólisis con HCl liberó quercetina, canferol e isoramnetina. Por lo tanto, los flavonoides de los extractos de polen eran formas glucosiladas de quercetina, canferol e isoramnetina.

[00119] Asumiendo que las áreas de los picos obtenidos para quercetina, canferol e isoramnetina son representativas de sus concentraciones respectivas, las agluconas de flavonoides producidas por hidrólisis con HCl de un extracto de polen de gramíneas se componen del 18 % de quercetina, el 5 % de canferol y en 77 % de isoramnetina.

4.3. Identificación adicional de los flavonoides del polen de gramíneas por análisis de espectrometría de masas

[00120] Previamente al análisis de espectrometría de masas, los flavonoides de extractos de polen de gramíneas se separaron mediante el procedimiento de HPLC descrito anteriormente y se recogieron manualmente de la columna de HPLC. Los análisis de espectrometría de masas se realizaron mediante ionización por electronebulización y espectrometría de masas en tándem (ESI-MS/MS), en modo de iones negativos, en un espectrómetro de masas con trampa iónica ThermoElectron LCQ Duo (San José, CA, EE. UU.), después de la

infusión directa de las muestras. La fragmentación se obtuvo por disociación inducida por colisión con helio.

- [00121]** Según los datos obtenidos de los estándares disponibles comercialmente, los espectros de masas de los glucósidos de flavonoides pueden interpretarse fácilmente: la fragmentación por electronebulización conduce principalmente a la pérdida de parte o la totalidad de sus fracciones glucosídicas. De manera muy especial, todos los glucósidos de flavonoides analizados (3-O-glucósido de canferol, 3-O-glucósido de quercetina, 3-O-glucósido de isorramnetina, 3-O-glucorramnósido de quercetina y 3-O-robinósido-7-O-ramnósido de canferol) pierden una parte de 120 Da de la glucosa o la totalidad de la fracción de glucosa de 163 Da durante la fragmentación.
- 10 **[00122]** Los dos picos principales resueltos en el procedimiento de HPLC se analizaron por espectrometría de masas:
1. Pico n.º 2 con un tiempo de retención medio de 15,00 min:
- 15 **[00123]** Un solo ion apareció como principal ion parental, con una m/z de 639, correspondiente por tanto a una molécula de 640 Da de masa, denominada "[M]". Se observó un ion parental de menor importancia con una m/z de 1.279 que, lo más probablemente, correspondía a un ion dímero negativo [2M-H]⁻ de la molécula de 640 Da (en que "H" representa "un átomo de hidrógeno").
- 20 **[00124]** Se ha descrito que los pólenes de dactilo y hierba timotea contienen un diglucósido de flavonoide de 640 Da denominado 3,4'-diglucósido de isorramnetina (Inglett G. E., Nature 1956, 178: 1346; Inglett G. E., J. Org. Chem. 1957, 22: 189-192), que también se encuentra en otros pólenes como el de los crocos (Kuhn R., Low I., Chem. Ber. 1944, 77: 196-202). Dado que el espectro de fragmentación obtenido para el pico de HPLC de 15,00 min puede interpretarse fácilmente como el de 3,4'-diglucósido de isorramnetina, se concluyó que el componente del
- 25 pico principal de HPLC, pico n.º 2, corresponde a 3,4'-diglucósido de isorramnetina.
2. Pico n.º con un tiempo de retención medio de 14,83 min:
- [00125]** Según el análisis de espectrometría de masas en modo de iones negativos, aparecieron cuatro iones
- 30 como principales iones parentales: con m/z de 639, 625, 609 y 463, correspondientes por tanto a moléculas de 640 Da, 626 Da, 610 Da y 464 Da, respectivamente. Según el análisis de fragmentación, la molécula de 640 Da era el diglucósido de isorramnetina del pico n.º 2 que contaminaba el pico n.º 1.
- [00126]** Los espectros de fragmentación de los iones parentales con m/z de 625 y 609 pueden interpretarse
- 35 fácilmente como los de diglucósido de quercetina y diglucósido de canferol, respectivamente. Asumiendo que ambos glucósidos de flavonoides se producen a través del mismo metabolismo que el 3,4'-diglucósido de isorramnetina y que se desglucosilarán mediante la misma maquinaria enzimática específica, se concluyó que se trata de 3,4'-diglucósido de quercetina (m = 626 Da) y 3,4'-diglucósido de canferol (m = 610), respectivamente.
- 40 **[00127]** El 3,4'-diglucósido de canferol ha sido ya descrito en polen, concretamente en polen de especies de *Trillium* (Yoshitama K., Tominaga T., Kanemaru Y., Yahara S., XVI International Botanical Congress, resumen n.º 2539). El 3,4'-diglucósido de quercetina también se ha descrito en plantas, concretamente en cebolla (Bonaccorsi P., Caristi C., Gargiulli C., Leuzzi U., J. Agric. Food Chem. 2005, 53: 2733-2740; Mullen W., Crozier A., J. Oil Palm Res. 2006, número especial (abril): 65-80). Sin embargo, por lo que sabemos, esta es la primera vez que se describe el
- 45 3,4'-diglucósido de quercetina en pólenes.
- [00128]** Según su masa molecular, la molécula de 464 Da puede ser un monoglucósido de quercetina. Esto se confirma por el ion fragmentado con una m/z de 301, que corresponde a quercetina. La presencia de un monoglucósido de quercetina en el pico n.º 1 es sorprendente, ya que los monoglucósidos de quercetina estándar
- 50 muestran mayor retención. El monoglucósido de quercetina del pico n.º 1 podría formar complejos con otros componentes de este pico y tener así el mismo tiempo de retención. Esto también podría deberse a una alteración del diglucósido de quercetina del pico n.º 1 durante las etapas de purificación. De cualquier modo, según el espectro de masas, este componente del pico n.º 1 tiene menor importancia cuantitativa que los diglucósidos de quercetina y canferol.
- 55 **[00129]** En conjunto, de este modo se encontró que los extractos de polen de cinco gramíneas contenían los siguientes glucósidos de flavonoides principales, en orden de cantidad decreciente: diglucósido de isorramnetina, diglucósido de quercetina y diglucósido de canferol.

4.4. Cuantificación de los glucósidos de isorramnetina, quercetina y canferol en extractos liofilizados de polen de cinco gramíneas por HPLC-DAD tras hidrólisis con HCl

- [00130]** Dado que no se dispone de estándares para los diglucósidos de isorramnetina, quercetina y canferol, 5 estos flavonoides se cuantificaron tras hidrólisis con HCl. Esto induce la desglucosilación para dar isorramnetina, quercetina y canferol (agluconas), para las que sí existen estándares. Sabiendo las masas moleculares de las agluconas y los diglucósidos, la concentración de estos últimos puede deducirse fácilmente a partir de las correspondientes concentraciones de los primeros.
- 10 **[00131]** La cuantificación de isorramnetina, quercetina y canferol obtenidos después de la hidrólisis con HCl se realizó por HPLC-DAD. En este procedimiento, la agluconas de flavonoides se separan por HPLC y la detección se lleva a cabo mediante un detector con un detector de matriz de diodos (o DAD). Esto permite recoger el espectro de absorción en el intervalo ultravioleta. Dado que no hay dos agluconas con el mismo espectro de absorción, el análisis por HPLC-DAD hace posible la identificación de una aglucona de flavonoide a partir de su tiempo de 15 retención y de su espectro de absorción, en comparación con la molécula estándar correspondiente. Conociendo las relaciones entre las masas moleculares de los diglucósidos y las agluconas, puede deducirse fácilmente la concentración de los diglucósidos de isorramnetina, quercetina y canferol a partir de la concentración medida de las correspondientes agluconas.
- 20 **[00132]** Se analizaron tres lotes de extractos liofilizados de polen de cinco gramíneas obtenidos usando la etapa de ultrafiltración no optimizada para cuantificar los diglucósidos de isorramnetina, quercetina y canferol después de su transformación en las correspondientes agluconas por hidrólisis con HCl.

Tabla 2. Concentración de isorramnetina, quercetina y canferol en tres lotes de extractos tamizados de polen de cinco gramíneas, según medición por HPLC-DAD tras hidrólisis con HCl y concentración deducida de los dicucósidos correspondientes respectivos. (en µg/mg)

N.º de lote	Concentración de agluconas de flavonoides					Concentración deducida de diglucósidos de flavonoides				
	Isorramnetina (316 Da)	Quercetina (302 Da)	Canferol (286 Da)	Agluconas de flavonoides totales	Dicucósido de isorramnetina (640 Da)	Dicucósido de quercetina (626 Da)	Dicucósido de canferol (610 Da)	Dicucósidos de flavonoides totales	Dicucósidos de flavonoides totales	Dicucósidos de flavonoides totales
50299	1,70	0,34	0,10	2,14	3,44	0,70	0,21	4,36	4,36	
50300	1,00	0,26	0,08	1,34	2,03	0,54	0,17	2,73	2,73	
50311	1,30	0,35	0,09	1,74	2,63	0,73	0,19	3,55	3,55	
Media	1,33	0,32	0,09	1,74	2,70	0,66	0,19	3,55	3,55	
%	77	18	5	100	76	19	5	100	100	

[00133] Las cantidades relativas medias de isorramnetina, quercetina y canferol obtenidas después de la hidrólisis con HCl de extractos liofilizados de polen de gramíneas son exactamente las mismas que las estimadas después de la hidrólisis con HCl de los flavonoides purificados de un extracto de polen crudo que contiene: el 77 % de isorramnetina, el 18 % de quercetina y el 5 % de canferol. Estos resultados confirman que, desde el punto de vista cuantitativo, los flavonoides del polen de gramíneas están presentes en el orden siguiente de más a menos abundante: diglucósido de isorramnetina, diglucósido de quercetina, diglucósido de canferol.

[00134] En conjunto, los extractos liofilizados de polen de cinco gramíneas obtenidos usando la etapa de ultrafiltración no optimizada contienen el 0,36 % (p/p) de diglucósidos de flavonoides.

10 *4.5. Desglucosilación de los glucósidos de flavonoides del polen de gramíneas en las condiciones del protocolo de 24 h pero no de los protocolos de 3 h de la prueba MLA/TK.*

[00135] Los protocolos de corta y de larga duración de la prueba MLK/TK implican la incubación durante 3 h a 15 37 °C y la incubación durante 24 h a 37 °C, respectivamente. Para demostrar que los glucósidos de flavonoides del polen de gramíneas se desglucosilan en las condiciones del protocolo de larga duración, pero no en los protocolos de corta duración de la prueba MLA/TK, se puso un extracto crudo de polen de gramíneas a 37 °C y se tomaron muestras del mismo al cabo de 3h y de 24 h de incubación. Las muestras se mantuvieron congeladas hasta su análisis para determinar el contenido de glucósidos de flavonoides y de agluconas de flavonoides.

20 **[00136]** Para demostrar que la desglucosilación era debida a un proceso activo dependiente de enzimas, los flavonoides del polen de gramíneas se separaron de las proteínas del polen de gramíneas por purificación mediante la resina Amberlite XAD-2 (Gil M. I., Ferreres F., Tomás-Barberán F. A., J. Agric. Food Chem. 1998, 46: 2007-2012; D'Arcy B. R. D'Arcy B. R., Barton, A. C. T.: Rural Industries, Research and Development Corporation, 2005, 84 p) y 25 después se analizaron antes y después de su incubación durante 24 h a 37 °C.

[00137] El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante el procedimiento de HPLC descrito anteriormente para la detección de flavonoides.

30 **[00138]** La incubación de un extracto de polen de gramíneas a 37 °C induce una ligera, aunque detectable disminución de los niveles de diglucósidos de flavonoides (picos con tiempos de retención (RT) de 14,98 min y 15,16 min) tan pronto como después de 3 h. Sin embargo, después de 3 h, la aparición de las agluconas quercetina (RT = 20,2 min) e isorramnetina (RT = 22,2 min) sigue siendo despreciable, mientras que no pudo detectarse ningún canferol (RT = 22,0). De hecho, la disminución de los diglucósidos de flavonoides corresponde principalmente a un 35 aumento de aproximadamente el doble de las superficies de dos picos, con tiempos de retención de 16,4 y 17,1 min, respectivamente. Un RT de 16,4 min corresponde a un monoglucósido de quercetina y un RT de 17,1 min corresponde a monoglucósidos tanto de canferol como de isorramnetina. Por lo tanto, lo más probable es que el aumento de los dos picos sea una consecuencia de una desglucosilación parcial de diglucósidos de flavonoides para dar monoglucósidos de flavonoides.

40 **[00139]** La extensión de la incubación de 37 °C a 24 h ocasiona una notable disminución de los diglucósidos de flavonoides, un notable aumento de los monoglucósidos de flavonoides y un drástico aumento de las agluconas de flavonoides quercetina, canferol e isorramnetina (figura 1).

45 **[00140]** En cambio, cuando los glucósidos de flavonoides aislados de un extracto de polen de gramíneas se incubaron a 37 °C durante 24 h, no se observó ningún cambio en el perfil de HPLC. Dado que los flavonoides aislados no contenían ninguna proteína detectable, según un experimento de SDS-PAGE, esto confirma que el fenómeno observado con un extracto completo de polen es una desglucosilación enzimática de glucósidos de flavonoides.

50 **[00141]** Ya que (a) la suma de las áreas de todos los picos se mostró bastante bien conservada y (b) la disminución del pico correspondiente a un diglucósido de flavonoide estaba ligada al aumento o la aparición del pico o picos correspondientes a monoglucósidos y/o agluconas de flavonoides, pudo considerarse que la relación entre las áreas de los dos picos era equivalente a la relación molar de los flavonoides correspondientes. Por este motivo, 55 la disminución del diglucósido de quercetina condujo a un aumento igual en moléculas de monoglucósido de quercetina y en moléculas de la aglucona quercetina.

[00142] Basado en las áreas de estos picos, la disminución de los diglucósidos de flavonoides después de 24 h de incubación a 37 °C fue de aproximadamente el 40 %. Dado que aproximadamente la mitad del diglucósido de

quercetina se transformó en la aglucona quercetina, esto significa que aproximadamente el 20 % del diglucósido de quercetina se transformó en quercetina (aglucona) en las condiciones del protocolo de larga duración de 24 h de la prueba MLA/TK.

5 **[00143]** En conjunto, estos resultados indican que:

- en las condiciones del protocolo de larga duración de 24 h de la prueba MLA/TK se produce una desglucosilación de los diglucósidos de flavonoides del polen de gramíneas para dar agluconas de flavonoides,
 - una desglucosilación tan completa apenas tiene lugar en las condiciones de los protocolos de corta duración de 3 h
- 10 de la prueba MLA/TK,
- la desglucosilación de los glucósidos de flavonoides se debe a enzimas extraíbles del polen de gramíneas.

[00144] Más concretamente, aproximadamente el 20 % del diglucósido de quercetina del polen de gramíneas se transforma en quercetina (aglucona).

15

4.6. Consistencia de las cantidades de agluconas de flavonoides liberadas en las condiciones del protocolo de larga duración de 24 h de la prueba MLA/TK con los resultados de esta prueba

[00145] Por lo que sabemos, quercetina es la única aglucona de flavonoide que ha sido estudiada en la prueba MLA/TK, concretamente en un trabajo de Meltz y MacGregor que usaba un protocolo de corta duración de 4 h (Mutat. Res. 1981, 88: 317-324). Por otro lado, se demostró que era la aglucona de flavonoide más genotóxica en otras pruebas de genotoxicidad *in vitro* (Nagao M., Morita N., Yahagi T., Shimizu M., Kuroyanagi M., Fukuoka M., Yoshihira K., Natori S., Fujino T., Sugimura T., Environ. Mutagen. 1981, 3: 401-419; Brown J. P., Mutat. Res. 1980, 75: 243-277; Czeczot H., Tudek B., Kuzstelak J., Szymczyk T., Dobrowolska B, Glinkowska G., Malinowski J., Strzelecka H., Mutat. Res. 1990, 240: 209-216; MacGregor J. T., Jurd L. Mutat. Res. 1978, 54: 297-309).

[00146] Por lo tanto, a partir del estudio de Meltz y MacGregor, se determinó si la desglucosilación del diglucósido de quercetina del polen de gramíneas para dar la aglucona quercetina podía explicar por sí misma los resultados de la prueba MLA/TK obtenidos con los extractos liofilizados de polen de gramíneas.

30

[00147] Las cantidades de quercetina liberada durante la prueba MLA/TK de 24 horas/S9- se calcularon a partir de: la concentración media del diglucósido de quercetina en los extractos liofilizados, según se determinó anteriormente; y el nivel de desglucosilación de esta molécula para dar la aglucona quercetina en las condiciones de este protocolo, según se determinó también anteriormente.

35

[00148] Las relaciones de inducción que deberían resultar de estas cantidades se dedujeron de los datos de Meltz y MacGregor. A continuación, se compararon estas relaciones de inducción deducidas con la relación de inducción observada realmente.

40 **[00149]** Anteriormente se indicó que:

- los extractos liofilizados obtenidos usando la etapa de ultrafiltración no optimizada contenían una media de 0,32 µg/ml de quercetina en forma de glucósidos de flavonoides, principalmente diglucósido de quercetina;
 - aproximadamente el 20 % del diglucósido de quercetina se desglucosila para dar la aglucona quercetina en las
- 45 condiciones del protocolo de larga duración de 24 h de la prueba MLA/TK.

[00150] Las concentraciones de los extractos liofilizados analizados en el protocolo de 24h/S9- de la prueba MLA/TK fueron de 13,5 mg/ml o inferiores. Las concentraciones correspondientes de quercetina liberada fueron entonces de 0,864 µg/ml (20 % × 0,32 µg/mg × 13,5 mg/ml) o inferiores.

50

[00151] La concentración más baja de quercetina probada por Meltz y MacGregor fue de 10 µg/ml. Por consiguiente, para determinar la relación que debería obtenerse con la concentración más baja de 0,864 µg/ml o inferior se modeló matemáticamente la relación entre (a) las concentraciones de quercetina probadas por Meltz y MacGregor y (b) las relaciones de inducción correspondientes que observaron. Ya que estas relaciones empezaron a estabilizarse para la primera concentración probada, elegimos usar una función logarítmica para tal modelo. Teniendo en cuenta que la relación es necesariamente de 1 para 0 µg/ml de mutágeno (control), la función logarítmica adoptará la forma:

55

$$y = a \cdot \ln(x + 1) + 1 \quad (1)$$

en que y es la relación de inducción, x es la concentración de quercetina y a es un número constante.

[00152] De hecho, según la ecuación (1), la relación de inducción y es de 1 para una concentración de quercetina x de 0.

5

[00153] El uso de las relaciones obtenidas por Metz y MacGregor para 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$ de quercetina permite un establecer un modelo matemático mediante la ecuación siguiente con un excelente coeficiente de correlación ($r = 0,99$):

10

$$y = 3,0822 \times \ln(x + 1) + 1 \quad (2)$$

[00154] Se estudiaron en la prueba MLA/TK de 24h/S9- dos extractos liofilizados obtenidos usando la etapa de ultrafiltración no optimizada, concretamente: los lotes n.º 40244 y n.º 52494, que mostraron un potencial genotóxico a concentraciones de 13,5 y 12,9 mg/ml , respectivamente. La concentración correspondiente de quercetina liberada durante la prueba es de 0,83-0,86 $\mu\text{g/ml}$ (véase anteriormente para el cálculo). Según la ecuación (2), la relación de inducción que debería obtenerse para esta concentración es de 2,9 (2,86-2,91). Las relaciones de inducción obtenidas experimentalmente para los lotes n.º 40244 y n.º 52494 fueron de 2,1 y 3,5, respectivamente, es decir, una media de 2,8, que es prácticamente idéntica a la relación de inducción interpolada de 2,9.

[00155] Dado que la relación de inducción observada en realidad es idéntica a la relación de inducción interpolada de los datos publicados sobre el potencial genotóxico de quercetina en la prueba MLA/TK, concluimos que la mayor parte, si no la totalidad, del potencial genotóxico de los extractos liofilizados de polen de gramíneas obtenidos usando la etapa de ultrafiltración no optimizada puede explicarse por la producción de quercetina a través de la desglucosilación del diglucósido de quercetina durante la prueba.

25

[00156] Sin embargo, no puede excluirse una contribución de la desglucosilación de diglucósidos de canferol e isoramnetina, aunque sea teóricamente despreciable.

4.7. Optimización de la etapa de ultrafiltración

30

[00157] El proceso de preparación de extractos de polen de gramíneas supone una etapa de ultrafiltración con 2,5 volúmenes de lavado con agua purificada y una membrana de 1 kDa.

[00158] La etapa de ultrafiltración con una membrana de 1 kDa se comparó con una etapa de ultrafiltración con una membrana de 5 kDa. Los lavados se realizaron con 1 a 15 volúmenes de agua purificada. Se encontró que el límite de exclusión de la membrana no tenía efecto sobre la inmunorreactividad ni el contenido de proteínas de la preparación de alérgenos de polen. El volumen de agua purificada para el lavado tampoco afectó a la calidad de la preparación de alérgenos. Se concluyó que la etapa de ultrafiltración puede realizarse con una membrana de 5 kDa y hasta 15 volúmenes de agua sin alterar la calidad del extracto de polen.

40

[00159] Sin embargo, se observó una obstrucción posterior en la filtración con un filtro de 0,22 μm .

[00160] Para evitar esta obstrucción, en la ultrafiltración se usó una disolución que contenía 120 ppm de amoníaco, equivalentes a 0,56 g/l de bicarbonato de amonio, para el lavado en lugar de agua purificada. No pudo observarse ninguna obstrucción en la filtración con un filtro de 0,22 μm .

45

[00161] Además, se comprobó que la actividad y el contenido de proteínas de los extractos de polen se mantenían inalterados al sustituir el agua purificada por una disolución de bicarbonato de amonio de 0,56 g/l para el lavado. No pudo verse ninguna diferencia entre las dos disoluciones de lavado para hasta 15 volúmenes de lavado. Sin embargo, por encima de 15 volúmenes de agua purificada se detectó una disminución de la actividad alérgica, mientras que la disolución de bicarbonato de amonio se ensayó para hasta 30 volúmenes de lavado sin efectos perjudiciales sobre la actividad alérgica del extracto de polen.

50

[00162] La cuantificación de flavonoides indicó que el lavado con 2,5 volúmenes de agua purificada o bicarbonato de amonio de 0,56 g/l permitía eliminar aproximadamente el 80 % de los flavonoides. Los flavonoides se eliminaron totalmente con 15 volúmenes de agua purificada o bicarbonato de amonio de 0,56 g/l . El lavado con 30 volúmenes de bicarbonato de amonio de 0,56 g/l no mejoró adicionalmente la eliminación de flavonoides.

[00163] La ultrafiltración con 15 volúmenes de lavado y una membrana de 5 kDa se seleccionó para su

caracterización posterior.

4.8. Demostración de la eliminación de los flavonoides del polen de gramíneas mediante una etapa de ultrafiltración optimizada

- 5
- [00164]** El proceso de preparación de extractos de polen de gramíneas ha sido optimizado en la etapa de ultrafiltración, utilizando 15 volúmenes de lavado con una membrana de 5 kDa en lugar de los 2,5 volúmenes usados anteriormente con una membrana de 1 kDa.
- 10 **[00165]** Para determinar si este proceso optimizado es capaz de eliminar totalmente los flavonoides, se analizaron estos últimos en diferentes momentos de la etapa de ultrafiltración optimizada, concretamente: justo antes de la ultrafiltración, es decir, después de la etapa de concentración, después de la ultrafiltración con 2,5 volúmenes de lavado y después de la ultrafiltración con 15 volúmenes de lavado. Esto se realizó mediante el procedimiento de HPLC descrito anteriormente para este fin.
- 15 **[00166]** Los flavonoides se analizaron también en tres lotes de extractos liofilizados tamizados obtenidos usando la etapa de ultrafiltración optimizada, en comparación con tres lotes obtenidos usando el procedimiento no optimizado anterior. Para este ensayo se usó el mismo procedimiento de HPLC.
- 20 **[00167]** Finalmente, los flavonoides se cuantificaron exactamente en tres lotes de extractos liofilizados tamizados obtenidos usando la etapa de ultrafiltración optimizada. La cuantificación se realizó mediante HPLC-DAD tras hidrólisis con HCl.
- [00168]** Al contrario que con el proceso de preparación no optimizado anterior de extractos de polen de cinco
25 gramíneas, el proceso optimizado conduce a la eliminación total de los flavonoides del polen de gramíneas (figura 2).
- [00169]** Esto se confirmó con extractos liofilizados obtenidos usando la etapa de ultrafiltración optimizada, que
30 no contenían flavonoides detectables, en contraposición con los extractos liofilizados obtenidos mediante el proceso no optimizado anterior.
- [00170]** En el análisis de HPLC-DAD tras hidrólisis con HCl, los flavonoides, expresados en equivalentes de
35 agluconas, estuvieron por debajo del límite de cuantificación en los extractos liofilizados tamizados de polen de gramíneas, es decir, por debajo del 0,003 % (o g/100 g), lo que lleva a una concentración total de diglucósidos de flavonoides inferior a 0,15 µg por comprimido de 300 IR (tabla 3).

Tabla 3. Concentración de isorramnetina, quercetina y canferol en tres lotes de extracto liofilizado tamizado de polen de cinco gramíneas (sustancia activa) obtenidos usando la etapa de ultrafiltración optimizada, según medición por HPLC-DAD tras hidrólisis con HCl, concentración deducida de los correspondientes diglucósidos respectivos y concentración deducida de todos los diglucósidos de flavonoides en un comprimido de 300 IR correspondiente

N.º de lote	Concentración de agluconas de flavonoides (en % o g/100 g)				Concentración deducida de diglucósidos de flavonoides (en % o g/100 g)*				Concentración deducida de diglucósidos de flavonoides en un comprimido de 300 IR (en µg)**
	Isorramnetina	Quercetina	Canferol	Agluconas de flavonoides totales	Diglucósido de isorramnetina	Diglucósido de quercetina	Diglucósido de canferol	Diglucósidos de flavonoides totales	
60099	<0,001	<0,001	<0,001	<0,003	<0,002	<0,002	<0,002	<0,006	<0,15
60106	<0,001	<0,001	<0,001	<0,003	<0,002	<0,002	<0,002	<0,006	<0,15
60113	<0,001	<0,001	<0,001	<0,003	<0,002	<0,002	<0,002	<0,006	<0,15

[00171] Por lo tanto, la etapa de ultrafiltración optimizada en el proceso de preparación resultó en una completa eliminación de los flavonoides de los extractos.

Conclusiones

5

[00172] En nuestros esfuerzos para determinar las causas intrínsecas del potencial genotóxico *in vitro* de extractos de polen de gramíneas, se demostró lo siguiente:

10 - los extractos de polen de cinco gramíneas contenían glucósidos de flavonoides, identificados en su mayor parte como diglucósido de quercetina, diglucósido de canferol y diglucósido de isorramnetina;

- en las condiciones del protocolo de larga duración de 24 h de la prueba MLA/TK, los glucósidos de flavonoides se desglucosilan para dar las agluconas correspondientes, concretamente: quercetina, canferol e isorramnetina;

15 - muy especialmente, aproximadamente el 20 % del diglucósido de quercetina se transforma en quercetina (aglucona) en estas condiciones;

20 - sobre la base de los datos publicados, las cantidades correspondientes de quercetina producida pueden explicar totalmente el nivel de genotoxicidad observado con los extractos liofilizados tamizados de polen de cinco gramíneas obtenidos usando la etapa de ultrafiltración no optimizada;

- apenas se obtienen agluconas de flavonoides en las condiciones de los protocolos de corta duración de 3 h de la prueba MLA/TK, lo que es consistente con la ausencia de potencial genotóxico en estas condiciones;

25 - la intensificación de la etapa de ultrafiltración, como en la etapa de ultrafiltración optimizada, resulta en la eliminación de los flavonoides de los extractos hasta cantidades indetectables.

[00173] Dado que no se detectaron contaminantes genotóxicos externos y/o estos estuvieron muy por debajo de las dosis límite calculadas en la materia prima del polen de gramíneas, el potencial genotóxico *in vitro* de los extractos de polen de gramíneas observado en el protocolo de 24 h/S9- de la prueba MLA/TK debe explicarse por sustancias intrínsecas del polen de gramíneas. A este respecto, se demostró que en las condiciones del ensayo tiene lugar el mecanismo siguiente: los glucósidos de flavonoides no genotóxicos del polen de gramíneas, concretamente diglucósido de isorramnetina, diglucósido de quercetina y diglucósido de canferol, se desglucosilan mediante enzimas procedentes del polen para dar las agluconas correspondientes, concretamente isorramnetina, quercetina y canferol, respectivamente, de las que es bien sabido que muestran un potencial genotóxico *in vitro*, aunque nunca se ha demostrado que sean genotóxicas *in vivo*.

[00174] Sobre la base de los datos publicados sobre la genotoxicidad de quercetina en la prueba MLA/TK, las cantidades de quercetina liberadas por el polen de gramíneas pueden explicar totalmente el potencial genotóxico *in vitro* del polen de gramíneas.

[00175] El riesgo teórico asociado con la presencia de flavonoides en extractos de polen de gramíneas ha sido definitivamente eliminado al intensificar la etapa de ultrafiltración del proceso de preparación, lo que resulta en la completa eliminación de los flavonoides procedentes del polen de los extractos. Se calculó que una administración diaria de comprimidos de 300 IR de extracto de polen de gramíneas obtenido usando la etapa de ultrafiltración optimizada conduciría a una ingestión diaria teórica inferior a 0,15 g de flavonoides procedentes del polen, muy por debajo de la ingestión diaria de flavonoides a través de la dieta común, que es de 20 mg a 1 g.

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de polen purificado que contiene alérgenos de polen, en el que cada flavonoide está contenido en una cantidad que es inferior a 0,001 g por 100 g de fracción derivada de polen seco, expresada en equivalente de aglucona, en el que dicho extracto de alérgeno de polen purificado se puede obtener mediante un procedimiento que comprende una etapa de ultrafiltración de un extracto de alérgeno de polen acuoso en una membrana de 1-10 kDa y al menos 5 volúmenes de una disolución de bicarbonato de amonio, y una etapa de filtración estéril a través de un filtro de 0,22 µm.
- 5
- 10 2. El extracto de polen purificado según la reivindicación 1, en el que dicho extracto de polen es una mezcla que consiste en o comprende extractos de dactilo, espiguilla, raigrás, grama de olor y hierba timotea.
3. Un extracto de alérgeno de polen purificado según la reivindicación 1 o 2, en el que la ultrafiltración de dicho extracto de alérgeno de polen en el procedimiento de preparación del extracto de alérgeno de polen purificado se realiza con una membrana de 5-10 kDa y de 10 a 30 volúmenes de una disolución de bicarbonato de amonio de 0,4 g/l a 0,8 g/l.
- 15
4. Una composición farmacéutica que comprende un extracto de polen purificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20
5. Un extracto de polen purificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento y/o prevención, en el que dicho tratamiento y/o prevención de la alergia al polen se asocia con un riesgo reducido de genotoxicidad.

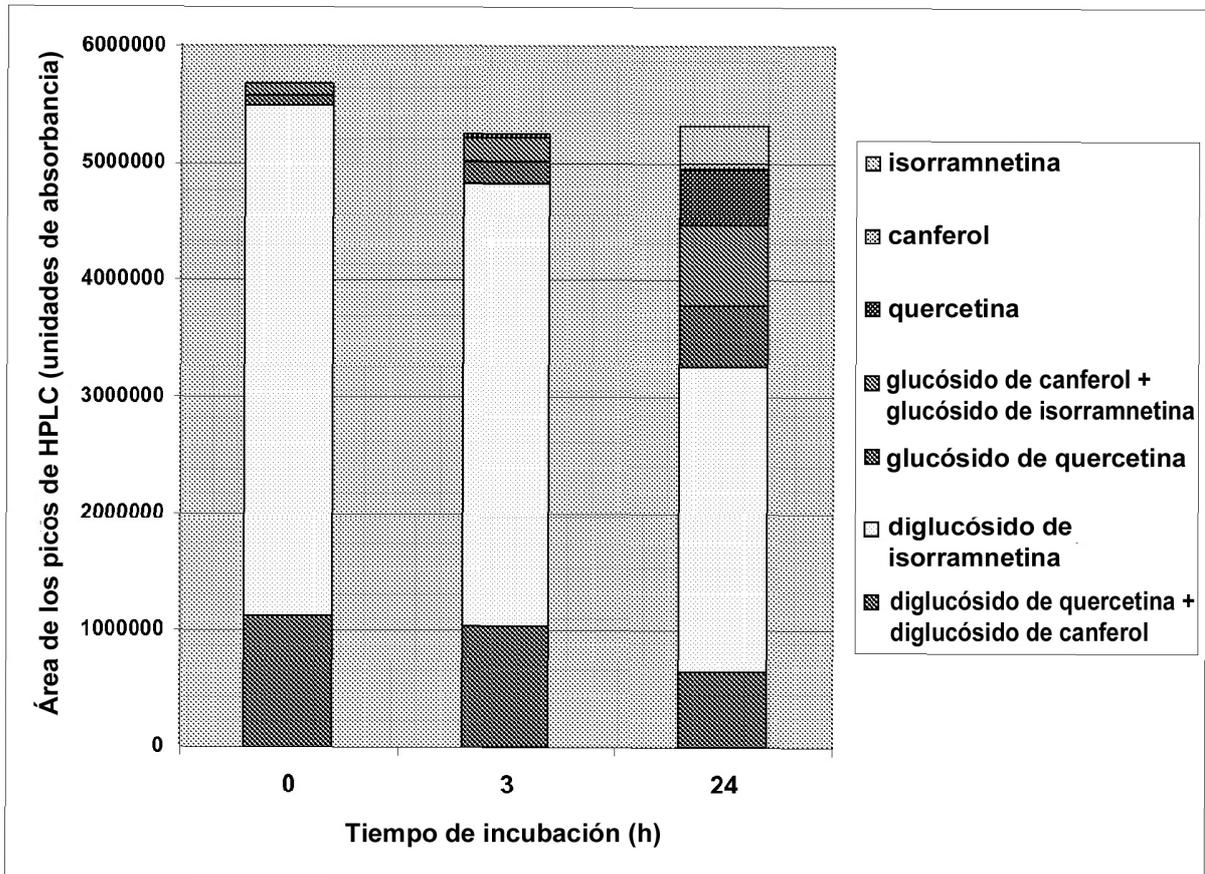


FIG.1

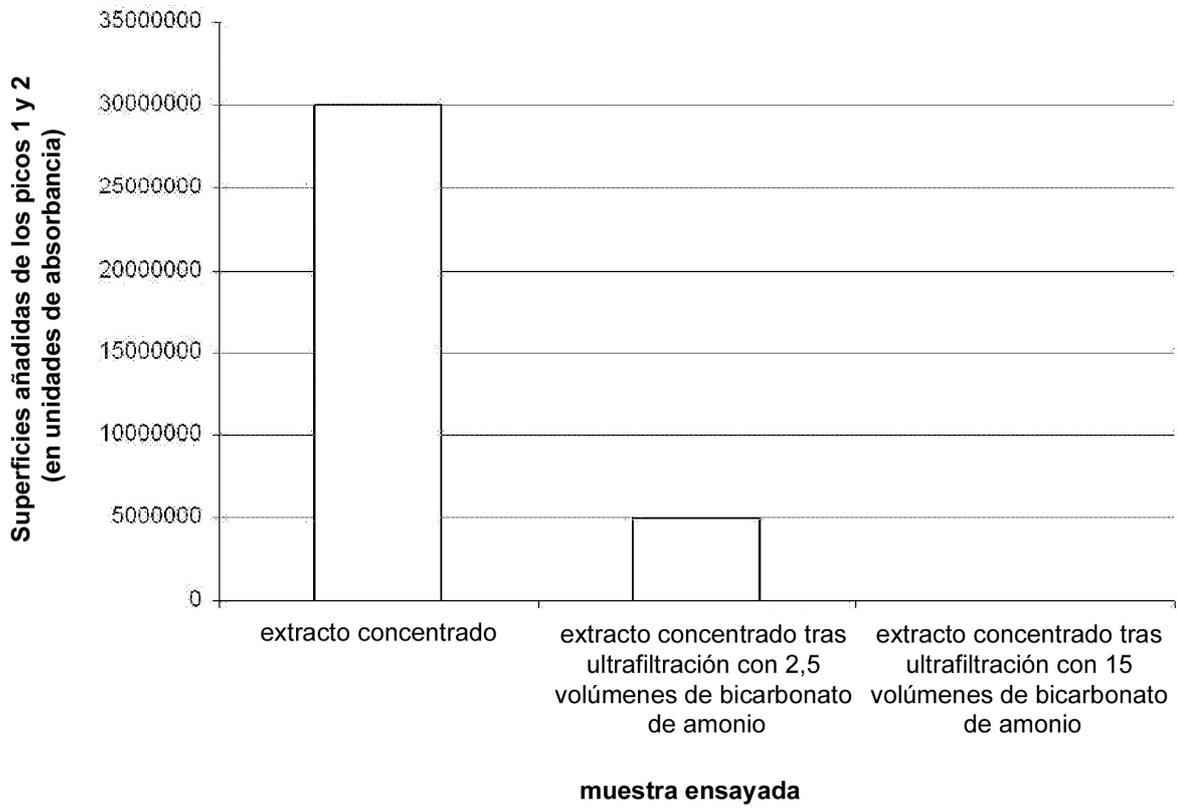


FIG.2