

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 586**

21 Número de solicitud: 201730152

51 Int. Cl.:

**A61K 9/50** (2006.01)

**A61K 36/18** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**09.02.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.05.2017**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (100.0%)  
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**CSABA, Noemi;  
PAN DELGADO, Diego;  
REIMONDEZ TROITIÑO, Sonia y  
GARCIA FUENTES, Marcos**

74 Agente/Representante:

**TORRENTE VILASANCHEZ, Susana**

54 Título: **PARTÍCULAS PURIFICADAS DE POLEN, PROCEDIMIENTO Y SU USO PARA ADMINISTRAR NANOSISTEMAS**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a una partícula purificada de polen que conserva su capa de intina y de exina, las composiciones que la incluyen, y a sus usos.

**ES 2 613 586 A1**

**PARTÍCULAS PURIFICADAS DE POLEN, PROCEDIMIENTO Y SU USO PARA ADMINISTRAR  
NANOSISTEMAS**

**DESCRIPCIÓN**

**Campo de la Invención**

- 5 La presente divulgación se dirige a partículas purificadas de polen, a sus métodos de fabricación y a sus usos en la administración de principios activos encapsulados.

**Estado de la Técnica**

La administración transmucosa de principios activos, por ejemplos fármacos, es una de las formas más aceptadas de administración por parte de los pacientes. Incluye, por ejemplo, la administración  
10 nasal, oral (por ejemplo, absorción a través del intestino delgado o grueso), u ocular.

La vía transmucosa para la administración de fármacos presenta ciertas limitaciones inherentes a sus características físico-químicas. En este sentido, la vía de administración más utilizada es la parenteral, la cual sin embargo ofrece desventajas. Por ejemplo, la preparación de inyectables requiere condiciones de producción estériles, su manejo suele implicar personal médico, es más incómodo  
15 para el paciente, e implica mayores riesgos de infección causados por el uso indebido de las agujas. Por todo ello, la administración transmucosa supone en la mayoría de las ocasiones una alternativa atractiva.

Una de las vías de administración farmacéuticas más frecuentes es la administración oral. Esto ocurre también en el campo de la alimentación, donde se buscan constantemente formas de administración  
20 de distintos aditivos y nutrientes que mejoren la tecnología existente. El epitelio del intestino humano es altamente absorbente, y se compone de un gran número de microvellosidades con una superficie total de absorción de hasta 350 m<sup>2</sup>, ideal para una absorción eficiente.

Dicha ruta no está exenta sin embargo de problemas. Muchos componentes macromoleculares pueden exhibir una baja permeabilidad y escasa estabilidad debido al ambiente agresivo del tracto  
25 digestivo. Además de ser estables en este medio, deben superar la barrera de la mucosa para alcanzar su destino y, antes de su eliminación, ser absorbidos.

La mucosa intestinal es un hidrogel complejo que comprende proteínas, carbohidratos, lípidos, sales, y otros componentes. Es secretada y renovada continuamente para evitar la entrada de agentes patógenos, lubricar y proteger el tracto digestivo, pero al mismo tiempo permite el paso de  
30 nutrientes. Debido a la presencia de esta barrera de mucosa intestinal y de su naturaleza dinámica, las partículas administradas por vía oral pueden no llegar a tener un tiempo de residencia adecuado para su absorción, y ser eliminadas sin cumplir su objetivo. Polímeros mucoadhesivos como algunos

derivados de celulosa, poliacrilato, almidón o quitosano, se han utilizado para mejorar el tiempo de residencia de las partículas en el tracto intestinal. Sin embargo, hasta ahora la mayoría de los nanosistemas desarrollados a base de polímeros mucoadhesivos son propensos a permanecer anclados en la capa de moco menos adherente sin llegar a penetrar en la barrera de mucosa intestinal, quedando así expuestos a una rápida eliminación.

Cuando se utilizan nanopartículas, la administración oral puede considerarse un complejo proceso por etapas. Las nanopartículas deben primero llegar a la mucosa intestinal sin degradarse, y sin liberar el principio activo de forma prematura. A continuación, debe adherirse a la mucosa más externa. Esta adhesión debe ser lo suficientemente fuerte como para evitar su rápida eliminación, pero al mismo tiempo permitir la penetración en las capas más profundas de la mucosa. Una vez alcanzadas las capas más profundas de la mucosa, más cercanas al epitelio, las nanopartículas deben ceder el principio activo con el perfil de liberación requerido.

Para conseguir una administración adecuada, se ha evaluado la administración de fármacos terapéuticos a través del tracto digestivo mediante plataformas que utilizan también métodos físicos (Traverso G, Schoellhammer CM, Schroeder A, Maa R, Lauwers GY, Polat BE, Anderson DG, Blankschtein D, Langer R *J Pharm Sci* **2015**, *104*, 362–367). Por ejemplo, la píldora robótica es una de las plataformas más recientes para el suministro oral de moléculas grandes. Aunque esta estrategia es prometedora, no deja de suponer una perforación y alteración de la mucosa, con los riesgos que esto conlleva, especialmente en el caso enfermedades crónicas, donde es necesaria la administración repetida, a veces durante años.

Por otro lado, se han realizado varios esfuerzos en el uso de esporas o de polen como vehículos de transporte de moléculas. Las esporas son producidas por plantas inferiores o criptógamas, también conocidas como esporafitas. El polen es producido por las plantas con semilla (espermatófitos), y contiene un microgametófito (gametófito masculino). Al igual que su biología, la estructura y composición de las esporas y el polen varían. Una partícula de polen o una espora se compone esencialmente de material genético contenido en un citoplasma, el cual está recubierto por una primera capa interior denominada intina en el caso del polen, y endospora en el caso de las esporas. Éstas a su vez se recubren de una segunda capa denominada exina y exospora, respectivamente. La composición del citoplasma, la intina y la endospora varían.

En la literatura se pueden encontrar numerosos trabajos basados en el uso de esporas como vehículos de administración de moléculas.

Varios documentos de la UNIVERSITY OF HULL describen el uso de esporas de *Lycopodium clavatum* (pteridofitas) para la encapsulación de aceites y fármacos de bajo peso molecular. Por ejemplo,

WO2005000280 describe esporas huecas, es decir, vaciadas de su citoplasma y de su intina, y libres de la capa lipídica, preparadas a partir de *Lycopodium clavatum*, las cuales se cargan con ingredientes dietéticos o farmacéuticos y que tienen un contenido en proteínas inferior al 0,5%. Estas esporas huecas se preparan por un complejo proceso de lavados agresivos con medios ácidos, básicos y orgánicos. No se indica en este documento la posibilidad de utilizar las esporas huecas como vehículo de nanosistemas. En WO2006064227 se describe el uso de esta misma tecnología basada en las esporas de *Lycopodium clavatum* para la creación de formulaciones magnéticas. En otras solicitudes a nombre de los mismos autores se describen composiciones de esporas huecas de *Lycopodium clavatum* siguiendo los mismos principios: WO2007012856 (actividad antioxidante), WO2007012857 (composiciones tópicas), WO2009077749 (composiciones que comprenden aditivos protectores), y WO2010004334 (blancura mejorada). En ninguno de los casos se menciona la posibilidad de incorporar nanosistemas a las esporas huecas, y siempre se trata de una exina hueca de esporas de *Lycopodium clavatum*, libre de la capa exterior lipídica, y preparada a partir de una compleja secuencia de lavados ácidos y básicos, entre otros. Estas esporas huecas tienen una capacidad limitada para controlar el perfil de administración, mostrando tiempos de liberación muy variables. Además, Lorch, M., et al. Chem. Comm., 2009, 6442-6444 han descrito el comportamiento de estas esporas en plasma sanguíneo, y en dicho medio biológico se observa que no son estables y colapsan.

Siguiendo esencialmente los mismos procedimientos, otros grupos de investigación han desarrollado tecnologías alrededor de las esporas huecas de *Lycopodium clavatum*, por ejemplo, como vehículo de antígenos para vacunas orales (Shashwti U. Atwe, Yunzhe Ma, Harvinder Singh Gill, *Journal of Controlled Release*, **2014**, *194*, 45-52).

En Shwan A. Hamad, Amro F. K. Dyab, Simeon D. Stoyanovb, Vesselin N. Paunov *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 18018-18023 se describe un procedimiento para la encapsulación de una combinación de células y nanopartículas magnéticas dentro de esporas huecas de *Lycopodium clavatum*. Dicho procedimiento comprende fracturar las esporas mediante compresión y la posterior incubación en presencia de una mezcla de células y nanopartículas magnéticas. Pese a contemplar la posibilidad de incorporar nanopartículas inorgánicas, el procedimiento descrito en este documento obliga a fracturar la espora, comprometiendo sus propiedades físico-químicas y por tanto su utilidad en sistemas biológicos como vehículo de administración.

La exina de las partículas de polen presenta en su superficie una capa lipídica adicional compleja mezcla de proteínas, lípidos y otras moléculas (conocida como "pollenkitt"). La intina está generalmente formada por celulosa, mientras que la exina se compone de un material proteico denominado esporopolenina, y cuya composición exacta no se conoce. La exina es una capa

extremadamente resistente, estable a condiciones ácidas y básicas, y presenta una porosidad elevada. Dada estas propiedades, se han ensayado diversas tecnologías que permitan aislar la exina, es decir, vaciar el interior de la exina de su intina y del material genético, así como limpiar la superficie exterior de la capa lipídica o *pollenkitt*. Una vez aislada, se ensaya su uso como vehículo de administración de moléculas de interés.

En Raghavendra C. Mundargi, Michael G. Potroz, Soohyun Park, Hitomi Shirahama, Jae Ho Lee, Jeongeun Seo, Nam-Joon Cho, *small* **2016**, *12*, No. 9, 1167–1173 se describe el uso de partículas de polen de *Helianthus annuus* (girasol) lavadas previamente con etil éter para encapsular BSA, y se sugiere la posibilidad de usar distintas esporas de polen para el encapsulamiento de moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, factores de crecimiento o biosimilares. La carga del BSA comprende la incubación o la incubación a vacío. El procedimiento de preparación descrito en este documento no incluye lavados con disoluciones acuosas.

Un ejemplo singular puede encontrarse en W. Brandon Goodwin, Ismael J. Gomez, Yunnan Fang, J. Carson Meredith, Kenneth H. Sandhage, *Chem. Mater.* 2013, *25*, 4529–4536, en donde se lavan partículas de polen de *Helianthus annuus* (girasol) con una mezcla de cloroformo y metanol para su posterior uso como plantillas en la preparación de réplicas a base de óxido de hierro. El producto resultante se somete a pirólisis, quedando únicamente la “cáscara” de óxido de hierro con la forma de la partícula de polen original.

También se pueden encontrar en la literatura estudios que se centran en el estudio de la composición de las partículas de polen, aunque no describen posibles usos de las mismas. Algunos de estos estudios pueden encontrarse en, por ejemplo, Doughty, J.; Hedderson, F.; McCubbin, A.; Dickinson, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1993**, *90*, 467-471, en donde se lavan esporas de *Brassica oleracea* con ciclohexano para estudiar las proteínas de recubrimiento así extraídas. En Mohamed Elfatih H. Bashir, Jason M. Ward, Matthew Cummings, Eltayeb E. Karrar, Michael Root, Abu Bekr A. Mohamed, Robert M. Naclerio, Daphne Preuss, *PLoS ONE* **8**(1): e53337 se estudian las proteínas de la corteza del polen de las hierbas de la familia de *Poaceae*, incluyendo, *Cynodon dactylon* (Bermuda), *Phleum pratense* (Timothy), *Poa pratensis*, o *Dactylis glomerata*. En este documento se lava el polen con ciclohexano para extraer las proteínas lipofílicas de su superficie. Se reporta que, como resultado del tratamiento, los microcanales de la exina colapsan, perdiendo así la partícula de polen su estructura.

El uso de polen no está exento de problemas. Aunque el polen puede tener tamaños similares, su morfología y su biocompatibilidad una vez tratado no está garantizado, especialmente a la vista de la agresividad de algunos de los tratamientos a los que se somete. También hay que considerar si este

tratamiento va a mantener intacta su morfología, y será capaz de incorporar y luego proteger, y liberar los productos que se puedan incorporar, por ejemplo, nanosistemas.

La administración nasal y ocular se enfrentan a problemas similares a los expuestos arriba para el caso de la administración oral, y todavía resulta un reto el administrar principios activos por estas  
5 vías de forma que tengan una estabilidad y un tiempo de residencia adecuados.

Así pues, sería deseable encontrar métodos alternativos para la administración de nanosistemas que puedan superar las limitaciones arriba indicadas, y puedan obtenerse por métodos sencillos.

### **Breve Descripción de la invención**

Los autores de la presente divulgación aportan ahora una plataforma de administración que resuelve  
10 los problemas planteados en el estado de la técnica. Dicha plataforma se basa en partículas purificadas de polen. Se obtienen mediante un método de purificación de polen que mejora su biocompatibilidad y permite la incorporación de nanosistemas de una forma reproducible.

Así, un primer aspecto de la invención es un procedimiento para preparar las partículas purificadas de polen que comprende las etapas de

15 (a) lavar una partícula de polen en un medio acuoso tamponado a un pH comprendido entre 4,5 y 9; y

(b) lavar con un disolvente orgánico;

para obtener la partícula purificada de polen que conserva la capa de intina y la capa de exina, pero cuya capa lipídica (*pollenkitt*) se han eliminado total o parcialmente.

20 Este sencillo proceso evita poner las partículas de polen en contacto con medios básicos o ácidos fuertes, contrariamente a los procesos que se divulgan en estado de la técnica, y que comprenden múltiples lavados agresivos con diferentes ácidos y bases (ver por ejemplo, WO2005000280). Con el método de la invención se consigue conservar parcial o totalmente la intina, y la partícula de polen purificada resultante es más estable en fluidos biológicos (ver ejemplos más abajo) que las esporas  
25 huecas que sólo conservan la capa de exina.

Un aspecto adicional de la invención es por tanto, las partículas purificadas de polen obtenibles por este procedimiento, las cuales, como se evidencia de los ejemplos, muestran unas propiedades diferenciadas de estabilidad en fluido biológicos y de capacidad de transporte a, y dentro de, las mucosas.

30 Aunque en otros estudios se han utilizado esporas huecas como contenedores de moléculas, no se ha reportado la posibilidad de conservar la exina y la intina conjuntamente, ni su posible utilización

como plataforma de administración para nanosistemas, y en particular para nanosistemas por vías mucosas. Además, los investigadores han comprobado, tanto en experimentos *ex vivo*, como *in vivo*, que el método de purificación sencillo utilizado resulta en partículas purificadas de polen con una sorprendente capacidad de adhesión y, lo que es fundamental, de penetración dentro de la mucosa intestinal, incluso después de la incorporación a su superficie y/o la absorción en su interior de nanosistemas, lo que mejora significativamente el conocimiento actual.

Las partículas purificadas de polen de la invención pueden incorporarse a diferentes composiciones, lo cual constituye un aspecto adicional de la invención. Un aspecto adicional también es la posibilidad de su uso como medicamento. Esto abre la posibilidad de una nueva plataforma para su uso en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades o condiciones médicas como, por ejemplo, enfermedades metabólicas, inmunes, gastrointestinales, cardiovasculares, articulares, raras, tropicales, oncológicas, entre otras, y además para prevenir enfermedades infecciosas, como vacunas. Preferiblemente, en el caso de enfermedades crónicas y/o metabólicas que requieren administraciones repetidas, en particular por vías mucosas. Aspectos adicionales también son su uso en la fabricación de un medicamento para la liberación controlada de un principio activo farmacéuticamente aceptable. Dada la excelente adhesión a la mucosa intestinal y su estabilidad *in vivo*, las cápsulas de la invención también tienen un excelente uso como complemento alimenticio en la administración de un principio dietéticamente aceptable, y para su uso en la fabricación de un medicamento de administración oral, nasal u ocular. Incluso, la posibilidad de diseñar tratamientos por estas vías que antes no eran posibles.

Las partículas purificadas de polen que se obtiene por este procedimiento de lavado pueden incorporar nanosistemas mediante un sencillo proceso de incubación. Por tanto, un aspecto adicional de la invención es una partícula purificada de polen, preferiblemente equinado, que comprende una capa de intina y una capa de exina, pero cuya capa lipídica (pollenkitt) se han eliminado. Un aspecto adicional de la invención es una composición que comprende un nanosistema y una partícula purificada de polen, preferiblemente equinado, que comprende una capa de intina y una capa de exina, pero cuya capa lipídica (pollenkitt) se han eliminado.

Las partículas purificadas de polen que se describen aquí proporcionan una nueva estrategia para la administración de nanosistemas, especialmente para su administración transmucosa. Permiten administrar de forma simultánea un elevado número de nanosistemas, y mejora sus posibilidades de adhesión y penetración en la mucosa.

#### **Breve Descripción de las Figuras**

**Figuras 1A, 1B, 1C y 1D:** Fotografías que muestran el tamaño y forma del polen purificado de la invención en diferentes medios biológicos simulados: A) antes de la incubación; B) después de la incubación a 37°C en fluido intestinal simulado; C) después de la incubación a 37°C en fluido gástrico simulado; y D) después de la incubación a 37°C en sangre.

5 **Figura 2:** Medición de la autofluorescencia en partículas de polen lavadas con agua (a), y en cápsulas que se han sometido a un lavado adicional con cloroformo/metanol (b) o con ciclohexano (c). Ver ejemplo 1. El eje de las abscisas muestra la longitud de onda en nm, el eje de ordenadas las unidades de absorción.

**Figura 3:** Fotografías SEM de las partículas de polen que asocian A) nanopartículas de quitosano; B) 10 nanocápsulas de protamina y C) nanocápsulas de protamina tras liofilización.

**Figura 4:** Fotografías de confocal *ex vivo* a los 120 minutos. En el canal rojo (Figura 4A) se ven los nanosistemas y en el canal verde (Figura 4B) las partículas de polen. Se aprecia cómo los nanosistemas se han depositado sobre las partículas de polen purificadas de la invención.

**Figura 5:** Fotografía de microscopía en la que se observa que los granos de polen guardan su 15 integridad y morfología *in vivo*.

### **Descripción Detallada de la Invención**

#### **Partículas purificadas de polen de la Invención**

En la presente divulgación se entiende por “partícula purificada de polen” aquellas partículas de 20 polen que han sido tratadas para retirar la capa lipídica que recubre su exterior (“*pollenkitt*”). Preferiblemente, el tratamiento también vacía total o parcialmente el citoplasma del interior de la partícula. Así pues, el tratamiento deja preferiblemente la intina y la exina sustancialmente libres del citoplasma y de la capa lipídica. Dicha purificación puede no ser total, y todavía retener parcialmente la capa lipídica.

25 Se entiende en la presente invención que las partículas purificadas de polen no retienen más del 50%, preferiblemente no más del 40%, por ejemplo, no más del 20%, no más del 10%, más preferiblemente no más del 5% en peso de la capa lipídica, con respecto al peso original de la capa lipídica. Preferiblemente también se ha eliminado de la partícula purificada de polen al menos el 10 30 %, por ejemplo al menos el 20%, por ejemplo al menos el 30%, por ejemplo al menos el 40%, por ejemplo al menos el 50%, por ejemplo al menos el 60%, por ejemplo al menos el 70%, por ejemplo al

menos el 80%, por ejemplo al menos el 90% en peso del citoplasma, con respecto al peso original del citoplasma.

Se trata de partículas purificadas de polen que comprenden la capa de intina y la capa de exina, pero no comprenden su capa lipídica (pollenkitt), y preferiblemente tampoco el citoplasma. Las partículas purificadas de polen se obtienen a través del sencillo método de purificación del polen que se ha descrito arriba y que comprende, primero lavar las partículas de polen con medios acuosos, y después con un disolvente orgánico, preferiblemente, sin que en ningún momento las partículas de polen entren en contacto con medios básicos o ácidos (es decir, sin pH menores de 4,5 o mayores de 9).

Por tanto, en el procedimiento de purificación de las partículas de polen el agua se encuentra a un pH esencialmente neutro, por ejemplo, a un pH de entre 5 y 9, preferiblemente entre 6 y 8, más preferiblemente entre 6,5 y 7,5. Tampoco es necesario que el proceso de purificación implique el lavado a elevadas temperaturas. El experto medio puede ajustar las condiciones, y se prefiere que el agua en la primera etapa se encuentre a una temperatura comprendida entre 15°C y 60°C, preferiblemente, entre 20°C y 45°C. En función del tipo de polen, también es posible realizar un segundo lavado con agua.

Para efectuar el segundo lavado existen a disposición del experto en la materia diversos disolventes orgánicos disponibles. Pueden ser hidrocarburos cíclicos o lineales como, por ejemplo, de fórmula  $C_nH_{2n+2}$  (no-cíclico, lineal o ramificado) o  $C_nH_{2n}$  (cíclico), de 5 a 20 átomos de carbono ( $n=5-20$ ).

Ejemplos que pueden ser utilizados en la presente invención son el pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, ciclopentano, o ciclohexano, o mezclas de los mismos, por ejemplo, el ciclohexano. El disolvente utilizado en la segunda etapa también puede ser un alcohol, por ejemplo, de 1 a 12 átomos de carbono, por ejemplo, de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos que el experto medio en la materia puede utilizar en la presente invención son el metanol, el etanol, el propanol, el *tert*-butanol, o mezclas de los mismos. También son ejemplos no limitantes los hidrocarburos halogenados, es decir, hidrocarburos como los definidos al principio de este párrafo, pero en los que al menos uno de los átomos de hidrógeno se ha sustituido por un halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente cloro). El hidrocarburo halogenado utilizado en la presente invención puede tener la fórmula  $C_nH_{(2n+2-z)}X_z$  (no-cíclico, lineal o ramificado) o  $C_nH_{2n-z}X_z$  (cíclico) en donde  $z$  es un número entero (igual o inferior a  $2n+2$  o a  $2n$ , según sea el caso) y  $X$  es flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente cloro. Ejemplos de este tipo de disolventes son el diclorometano y el cloroformo. También es posible realizar el lavado utilizando mezclas de disolventes orgánicos en diferentes proporciones. Por ejemplo, utilizando una mezcla de hidrocarburo halogenado:alcohol en

proporciones comprendidas entre 1:20 y 20:1. Un ejemplo puede ser la mezcla de cloroformo y metanol.

Otros disolventes que se pueden utilizar en la presente invención son aquellos que incluyen un grupo carbonilo o éster, y que tienen un bajo peso molecular, por ejemplo, por debajo de 250 Da. Ejemplos  
5 extendidos de estos disolventes son la acetona o el acetato de etilo.

Al igual que en el caso del lavado con agua, se puede realizar más de un lavado con disolventes orgánicos. Se prefiere también que el lavado con disolvente orgánico se haga a temperaturas bajas o moderadas, por ejemplo, a una temperatura comprendida entre 15°C y 60°C, preferiblemente, entre 20°C y 45°C.

10 El método de la invención también incluye pues la posibilidad de repetir una o más veces el lavado acuoso de la etapa (a) y/o el lavado con disolvente orgánico de la etapa (b). Por ejemplo, puede ser conveniente realizar más de un lavado acuoso para facilitar la eliminación del citoplasma. El método de la invención opcionalmente incluye uno o más tratamientos con enzimas (por ejemplo, celulasas y/o amilasas). Estos métodos consiguen perforar la intina y mejorar así su porosidad.

15 Por tanto, las condiciones bajo las cuales es posible preparar las partículas purificadas de polen de la invención son poco agresivas y resultan fáciles de implementar a nivel industrial. No comprenden preferiblemente altas presiones de forma que el proceso no incluye ninguna etapa en la que se sometan las partículas a presiones mayores de 10 bares ( $10^6$  Pa). Por ejemplo, todas las etapas del proceso se realizan a presiones por debajo de los 5 bares ( $0,5 \times 10^6$  Pa), preferiblemente a presiones  
20 inferiores a 2 bares ( $0,2 \times 10^6$  Pa), normalmente a presión atmosférica (sustancialmente 1 bar ( $10^5$  Pa)). Esto hace el proceso más atractivo a nivel industrial y evita que se produzcan fracturas en las partículas de polen. También se prefiere que el método de obtención no implique ningún lavado en medio acuoso cuyo pH sea inferior a 4,5, preferiblemente que no sea inferior a 5, o superior a 9, preferiblemente mayor de 8.

25 Dado que las partículas purificadas de polen de la invención pueden tener aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria, se prefiere que los disolventes sean farmacéuticamente aceptables. Esto no es crítico para obtener las propiedades deseadas, y además hay que tener en cuenta que estas partículas purificadas de polen se van a someter a subsiguientes etapas de incubación y/o purificación antes de ser administradas.

30 Cada uno de los lavados se realiza de acuerdo con las técnicas habituales en este campo y comprenden la formación de una suspensión de los granos de polen en agua o en disolvente orgánico, seguido normalmente de agitación. La suspensión se suele incubar y centrifugar para después eliminar el sobrenadante. Las partículas resultantes se suelen secar, normalmente en

condiciones de temperatura moderada, por ejemplo, entre 4°C y 60°C, por ejemplo, entre 20°C y 40°C.

El método de purificación de la invención admite a priori la incorporación a la partícula de polen purificada cualquier nanosistema. Dicha incorporación puede producirse como consecuencia de la adsorción del nanosistema en la superficie de la partícula purificada de polen, o bien como consecuencia de la absorción del nanosistema en el interior de la partícula purificada de polen. Además, bien como componente del propio nanosistema, o bien como componente adicional, la partícula purificada de polen también puede incorporar un principio activo farmacéuticamente aceptable, un principio dietéticamente aceptable o mezclas de ambos. Las partículas purificadas de la invención pueden pues incorporar los nanosistemas, los cuales a su vez pueden comprender un principio activo farmacéuticamente aceptable, un principio dietéticamente aceptable o mezclas de ambos.

La incorporación del nanosistema requiere sencillamente ponerlo en contacto con la partícula purificada de polen obtenida tras la etapa (b). El procedimiento para incorporar nanosistemas puede comprender por tanto incubar el nanosistema en presencia de la partícula purificada de polen. Dicha incubación puede hacerse en seco o en presencia de un líquido.

Por tanto, el procedimiento de preparación puede incluir las etapas de

- (a) lavar una partícula de polen en un medio acuoso tamponado a un pH comprendido entre 4,5 y 9;
- (b) lavar con un disolvente orgánico para obtener la partícula purificada de polen que conserva la capa de intina y la capa de exina, pero cuya capa lipídica (*pollenkitt*) se han eliminado total o parcialmente, preferiblemente incluyendo también la eliminación total o parcial del citoplasma; y
- (c) incubar la partícula purificada de polen en presencia de un nanosistema, por ejemplo, en presencia de un disolvente.

Alternativamente, el procedimiento de preparación puede incluir las etapas de

- (a) lavar una partícula de polen en un medio acuoso tamponado a un pH comprendido entre 4,5 y 9;
- (b) lavar con un disolvente orgánico para obtener la partícula purificada de polen que conserva la capa de intina y la capa de exina, pero cuya capa lipídica (*pollenkitt*) se han eliminado total o parcialmente;
- (c) secar la partícula purificada de polen de la etapa (b); y

(d) impregnar la partícula purificada de polen con los nanosistemas, opcionalmente, aplicando un vacío.

Adicionalmente, las partículas purificadas de polen así obtenidas pueden liofilizarse. En caso necesario, se puede añadir un crioprotector, por ejemplo, glucosa o trehalosa, antes de proceder a dicha liofilización.

Este método de purificación permite pues que las partículas purificadas de polen posteriormente incorporen nanosistemas orgánicos, y sean capaces de transportarlos a, y a través de, las mucosas, por ejemplo, en el intestino, la mucosa bucal, nasal u ocular.

Las partículas de polen que se utilizan como materia prima para ser purificadas pueden provenir de diferentes especies. Aunque las partículas de polen tienen diversos tamaños y morfologías, dependiendo de la especie originaria, el método de purificación de la presente invención puede aplicarse a cualquiera. Preferiblemente, las partículas de polen son equinadas, es decir, comprenden agujas con una longitud de al menos una micra, por ejemplo, de entre 1 micra y 10 micras, o entre 1 micras y 7 micras, generalmente, entre 1 micra y 5 micras o entre 1,5 micras y 2,5 micras, o entre 1,5 micras y 2 micras. Por ejemplo, pueden ser partículas de la familia de las *Helianthus*, por ejemplo, *Helianthus annuus* (Girasol).

Por su tamaño, disponibilidad y morfología, la partícula de polen puede provenir de, por ejemplo, las Angiospermas o Magnoliophytas, es decir, plantas con flores. Dentro de las Angiospermas o Magnoliophytas las partículas de polen pueden pertenecer a los clados Monocotiledóneas, Chloranthaceae, Ceratophyllaceae, Magnoliidae o Eudicotiledóneas, especialmente Eudicotiledoneas, prefiriéndose las especies equinadas. Las familias de Eudicotiledoneas que son más apropiadas son Annonaceae, Malvaceae, Meliaceae, Tamaricaceae, Asteraceae, Oleaceae o Caprifoliaceae.

Por ejemplo, especies equinadas especialmente útiles para los propósitos de la invención son una o más seleccionadas del grupo que consiste en

- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Ambrosia sp.

## ES 2 613 586 A1

- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Helianthus sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Pectis sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Tagetes sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Stevia sp.
- 5 – Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Calendula sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Parthenium sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Balsamorhiza sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Cirsium sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Balsamorhiza sp.
- 10 – Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Arnica sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Ambrosia sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Aster sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Bidens sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Clibadium sp.
- 15 – Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Cosmos sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Doronicum sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Echinacea sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Erechites sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Erigeron sp.
- 20 – Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Gaillardia sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Inula sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Leucanthemopsis sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Liatris sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Pulicaria sp.
- 25 – Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Scorzonera sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Asterales Asteraceae Tetragonotheca sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Alismatales Araceae Ulearum sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Alismatales Araceae Zomicarpa
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Alismatales Araceae Pinellia sp.
- 30 – Magnoliophyta Eudicotiledóneas Magnoliales Annonaceae Annonaceae sp.

- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Sapindales Meliaceae Melia sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Caryophyllales Tamaricaceae Tamarix sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Lamiales Oleaceae Olea sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Dipsacales Caprifoliaceae Lonicera sp.
- 5 – Magnoliophyta Eudicotiledóneas Malvales Malvaceae Malope sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Malvales Malvaceae Abutilon sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Malvales Malvaceae Hibiscus sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Malvales Malvaceae Lavatera sp.
- Magnoliophyta Eudicotiledóneas Malvales Malvaceae Sphaeralcea sp.
- 10 – Magnoliophyta Eudicotiledóneas Malvales Malvaceae Malva sp.
- y mezclas de las mismas.

Las partículas de polen utilizadas como materia prima en la invención pueden tener diferentes tamaños, por ejemplo, puede tener un diámetro medio comprendido entre 1 micra y 400 micras, 1 micra y 300 micras, o entre 1 micra y 200 micras, o entre 1 micra y 100 micras, por ejemplo, entre 10 micras y 50 micras, por ejemplo, entre 15 micras y 40 micras, o entre 20 micras y 30 micras, o entre 25 micras y 30 micras.

Tanto las partículas purificadas de polen, como los nanosistemas, el principio activo farmacéuticamente aceptable, o el principio dietéticamente aceptable, pueden estar asociados a un marcador, por ejemplo, un marcador fluorescente. Ejemplos no limitativos de este tipo de marcadores fluorescentes son tintes reactivos a aminas (por ejemplo, Alexa Fluor®), TAMRA o Tintes Cy (Cy-dyes). Esto permite hacer un seguimiento de cada uno de ellos de forma conjunta o de forma separada.

### Nanosistemas

Las partículas purificadas de polen de la invención tienen la capacidad de incorporar nanosistemas, preferiblemente nanosistemas orgánicos. En la presente divulgación el término “nanosistema” en el

término que lo usamos aquí es un coloide, es decir una partícula en la cual al menos una de sus dimensiones está en el rango entre 1 y 1000 nm, preferiblemente, tiene un diámetro medio entre 1 nm y 500 nm, más preferiblemente, entre 40 nm y 400 nm, medido por espectroscopía de correlación fotónica en un Nanosizer de Malvern Instruments, y que tiene carácter liofóbico, es decir, que no está disuelto en su fase externa (Paul Hiemenz, Raj Rajagopalan, Principles of colloid and Surface chemistry, 3rd Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1997). En el contexto de esta invención el sistema coloidal está destinado a tener en su composición al menos un marcador fluorescence o una molécula farmacológicamente activa. Dicho término se considera en la presente invención que incluye, por ejemplo, “nanocápsula”, “nanopartícula”, “vesícula”, “micela”, “nanoemulsión”, “liposoma” o “partícula ultra-fina”. También entiende el experto medio en la materia que los nanosistemas orgánicos, son aquellos nanosistemas cuyos componentes son al menos en parte orgánicos, es decir, basados en moléculas que comprenden carbono e hidrógeno, por ejemplo, proteínas, carbohidratos o lípidos. Ver por ejemplo, Kumar R, Lal S *J Nanomater Mol Nanotechnol* **2014**, 3, 4. Los nanosistemas de la invención pueden ser por ejemplo nanosistemas poliméricos. Los nanosistemas poliméricos están ampliamente descritos en la literatura y son conocidos por el experto en la materia, como describen por ejemplo Pinto Reis *et al.*, en *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2(2006) 8-21. Pinto Reis, et al. 2006.

El índice de la polidispersidad del diámetro medio de los nanosistemas poliméricos que pueden utilizarse en la presente invención está comprendido entre 0,1 y 0,5, en donde el índice de polidispersidad se mide mediante la técnica de espectroscopía de correlación fotónica medida en un Nanosizer de Malvern Instruments. Por las mismas razones, es preferible que el nanosistema sea sustancialmente biodegradable y de baja o nula toxicidad. Así pues, se considera que el nanosistema es biodegradable cuando al menos uno de sus componentes cumple con los estándares comúnmente aceptados, por ejemplo, las normas de biodegradabilidad redactadas por distintos organismos de normalización (ISO, CEN, ASTM, DIN, etc.), por ejemplo, es biodegradable en un 90% después de 6 meses según la norma UNE-EN-ISO 14852:2005 (determinación de la biodegradabilidad aeróbica final de materiales plásticos en medio acuoso), es decir un 90% de los átomos de carbono (C) presentes en el componente se convirtieron a dióxido de carbono después de seis meses en las condiciones definidas en la norma.

El experto en la materia puede reconocer que existen diversas clases de nanosistemas que puede utilizar en la presente invención, muchos de ellos disponibles comercialmente, o que se pueden preparar por métodos descritos en el estado de la técnica. Pueden ser de tipo matricial, es decir, redes poliméricas que contienen entrecruzamientos iónicos, por ejemplo, que contienen polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitativos de este tipo de nanosistemas son aquellos basados en

polisacáridos, por ejemplo, quitosano (nanopartículas de quitosano) o en poliaminoácidos, por ejemplo, protamina (nanocápsulas de protamina). Ver por ejemplo el método descrito en Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, lonso MJ *J Appl Polym Sci* **1997**, *63*, 125–132 o en Thwala L (**2016**) *Protamine nanocapsules as carriers for oral peptide delivery*.

- 5 También se pueden utilizar en la presente invención nanosistemas que comprenden un núcleo líquido rodeado de una capa de recubrimiento. El núcleo puede incorporar distintos aceites, material lipídico (por ejemplo, ácidos grasos o fosfolípidos o mono-, di- o tri-glicéridos), en combinación con surfactantes no-iónicos. La capa de recubrimiento puede ser un polímero, por ejemplo, protamina. Ver por ejemplo los métodos descritos en la solicitud de patente PCT/ES2013/070885.
- 10 Otros nanosistemas adecuados para su uso en la presente invención son nanopartículas sólidas, como por ejemplo, nanopartículas de quitosano, en particular las que se describen en ES2481940B1, ES2093562, Csaba *et al*, *Journal of Controlled Release*, **2017**, *245*, 62–69; Marcos García-Fuentes, M.J.A, *Journal of Controlled Release*, **2012**, *161* (2), 496–504. Un experto en la materia puede conocer cómo preparar estos y otros nanosistemas poliméricos según Nanomedicine:   
15 Nanotechnology, Biology, and Medicine 2(2006) 8-21. Pinto Reis, et al. 2006.

Se prefiere que los nanosistemas sean farmacéuticamente aceptables para las aplicaciones que se proponen en la presente invención.

#### Aplicaciones

- 20 Los investigadores han comprobado que las partículas purificadas de polen de la invención son estables *in vivo*, y tienen una sorprendente capacidad de penetración en las mucosa del intestino, haciendo de ellas una excelente plataforma de administración transmucosa de nanosistemas, en especial, para la administración oral. Así pues, la presente invención incluye el uso de las partículas purificadas de polen de la invención, especialmente aquellas que incorporan nanosistemas, para la   
25 fabricación de un medicamento. Es decir, una partícula purificada de polen de la invención, especialmente aquellas que incorporan nanosistemas, para su uso como medicamento. Las partículas purificadas de polen de la invención son por tanto especialmente adecuadas para su uso en la fabricación de un medicamento de administración transmucosa, tal como administración oral, administración ocular o administración nasal.

Por ejemplo, las partículas purificadas de polen de la invención pueden usarse para la administración ocular, incluyendo su uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades oculares, por ejemplo, para la cura de heridas oculares o la enfermedad macular.

5 Las partículas purificadas de polen de la presente invención también pueden utilizarse para la administración de antígenos por vía nasal, especialmente interesante para la administración de vacunas, lo cual aliviaría la carga que la administración parenteral supone para los servicios sanitarios, especialmente en países en desarrollo.

Dada su buena absorción y penetración en la mucosa intestinal, un uso especialmente adecuado para las partículas purificadas de polen de la invención es la fabricación de un medicamento de administración oral y/o para la fabricación de un medicamento para la liberación controlada de un principio activo, preferiblemente de liberación en el tracto digestivo. Por el término “tracto digestivo” se entiende en la presente invención el sistema por el que transcurre cualquier principio activo administrado oralmente desde su toma hasta la excreción. Incluye por tanto la boca, garganta, esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso, entre otros. Por ejemplo, las partículas purificadas de la invención pueden ser útiles para la administración de moléculas para las que sólo se conocen medios de administración parenteral, por ejemplo para la administración de péptidos antidiabéticos. La incorporación de estos principios activos en nanosistemas, y la de estas a su vez en las partículas purificadas de polen, permite el transporte hasta el epitelio y su liberación controlada.

Una situación en la que la administración transmucosa puede ofrecer ventajas únicas es la administración de antígenos. Las superficies mucosas como el tracto respiratorio o gastrointestinal representan la principal vía de entrada de muchos patógenos y desempeñan un papel integral en el desarrollo de mecanismos de defensa eficaces contra estos. De hecho, una respuesta inmune combinada que implica inmunidad sistémica y mucosa se logra mejor mediante la administración transmucosa de antígenos.

25 El término “principio activo” se refiere a una sustancia utilizada para tratar, curar o prevenir una condición médica o una enfermedad. También abarca en el contexto de la presente invención aquellas sustancias que se utilizan en pruebas diagnósticas. Dicho principio activo forma parte del nanosistema, y puede ser, por ejemplo, un agente de contraste o una vacuna. En una realización de

la invención, el principio activo es un compuesto de alto peso molecular, por ejemplo, una proteína, un péptido, un lípido, un anticuerpo o un ácido nucleico.

Por tanto, la presente invención también se refiere a una composición que comprende la partícula purificada de polen de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la  
5 invención se refiere a una composición que comprende la partícula purificada de polen de la invención y un excipiente dietéticamente aceptable.

El término "excipiente" se refiere a un diluyente o adyuvante con el que se administra el principio activo. Tales excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua o aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete  
10 aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se describen excipientes farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Dichos excipientes también se pueden considerar como las sustancias auxiliares necesarias para fabricar la forma farmacéutica deseada. Su naturaleza y cantidades dependen, entre otros factores, de la forma farmacéutica de administración elegida. Dichas formas farmacéuticas de administración de la composición  
15 farmacéutica se fabricarán según métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. Puede encontrarse una revisión de diferentes métodos de administración de principios activos, excipientes a utilizar y procedimientos para producirlos en "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que  
20 son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente una reacción no deseada alérgica o similar, tal como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administra a un ser humano. Preferiblemente, tal como se utiliza en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado o enumerado en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso  
25 en animales y más particularmente en seres humanos.

De forma análoga, el término "dietéticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables, preferiblemente, aprobadas para consumo humano por una agencia reguladora para su uso con propósitos alimentarios en animales y más particularmente en seres humanos. Es decir, el uso de las partículas purificadas de polen de la

presente invención para la administración de un principio dietéticamente aceptable excluye usos terapéuticos, y pueden servir, por ejemplo, para la administración de un enmascarador del sabor.

La presente divulgación incluye pues métodos para el tratamiento de un sujeto en necesidad de tratamiento mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las partículas purificadas de polen de la invención. El término “tratamiento” o “tratar” se refiere en el contexto de la presente invención a la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención para prevenir, reducir o eliminar uno o más síntomas asociados con una condición médica o una enfermedad. El término “tratar” también abarca la eliminación, reducción o prevención de las secuelas de dicha enfermedad o condición médica. El término “reducir” se entiende en el contexto de la presente invención como la mejora en la situación del paciente, bien evaluada por medios subjetivos (percepción del paciente en cuanto a algún aspecto particular o en cuanto a su estado general) o por medios objetivos, por ejemplo, parámetros biológicos, por ejemplo, niveles de un analito en determinados fluidos.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de principio activo calculada para producir el efecto deseado y estará determinada generalmente, entre otros motivos, por las propias características del principio activo utilizado y el efecto terapéutico que va a obtenerse. En una realización particular, la dosis de principio activo administrada a un sujeto que necesita tratamiento para el tratamiento está en el intervalo de  $10^{-10}$  a  $10^{10}$  mg/kg de peso corporal, normalmente entre  $10^{-3}$  y  $10^3$  mg/kg de peso corporal.

El medicamento que comprende las partículas purificadas de polen de la invención puede hallarse en cualquier forma adecuada para su administración a humanos y/o animales, preferentemente humanos, incluyendo bebés, niños y adultos y puede prepararse por procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, “Pharmaceutics: The Science of Dosage Forms, segunda edición, Aulton, M.E. (ed.) Churchill Livingstone, Edinburgo (2002); “Encyclopedia of Pharmaceutical Technology”, segunda edición, Swarbrick, J. y Boylan J.C. (eds.), Marcel Dekker, Inc. Nueva York (2002); “Modern Pharmaceutics”, cuarta edición, Banker G.S. y Rhodes C.T. (eds.) Marcel Dekker, Inc. Nueva York 2002 y “The Theory and Practice of Industrial Pharmacy”, Lachman L., Lieberman H. y Kanig J. (eds.), Lea & Febiger, Filadelfia (1986). La composición del medicamento puede variar dependiendo de la vía de administración.

La composición farmacéutica de la invención, puede administrarse en una pluralidad de formas farmacéuticas de administración, por ejemplo, sólidas, líquidas, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica de la invención incluyen gotas orales (suspensión, emulsión, etc.); formulaciones orales (líquidas, suspensión, emulsión, gel, pasta, polvo, etc.); liofilizado oral; goma oral; polvo para suspensión oral; gránulos; gránulos gastrorresistentes; gránulos de liberación prolongada; gránulos de liberación modificada; gránulos para suspensión oral; polvo y disolvente para disolución o suspensión oral; jarabe; polvo para jarabe; gránulos para jarabe; comprimidos (por ejemplo, comprimido soluble, comprimido dispersable, comprimido recubierto, comprimido recubierto de película, comprimido efervescente, comprimido bucodispersable, comprimido gastrorresistente, comprimido de liberación prolongada, comprimido de liberación modificada, comprimido bucal, comprimido masticable, etc.); polvo o gránulos efervescentes; sobre, cápsula; píldoras; dispositivo intrarruminal de liberación continua; dispositivo intrarruminal de liberación pulsátil; bloque para chupar; premezcla para personal de alimentación medicada; grageas; suspensión, gotas, aerosol, gel, pasta, cápsula bucomucosas etc.; aerosol, comprimido sublinguales, etc.; enjuague bucal; gel, pasta gingivales, etc.; comprimido para chupar; pastilla; gel, bastoncillo, inserto, polvo, suspensión, emulsión dentales, etc.; pasta de dientes; crema; gel; pomada; crema ocular; gel ocular; pomada ocular; colirios (polvo y disolvente para suspensión, loción, disolvente para reconstituir una loción, etc.); inserto oftálmico; crema para los oídos; gel para los oídos; pomada para los oídos; gotas para los oídos (suspensión, emulsión, polvo, etc.); aerosol para los oídos (suspensión, etc.); irrigación para los oídos (emulsión, etc.); tampón para los oídos; bastoncillo para los oídos; crema nasal; gel nasal; pomada nasal; gotas nasales (suspensión, emulsión, etc.); polvo nasal; aerosol nasal (suspensión, emulsión, etc.); irrigación nasal, bastoncillo nasal; crema vaginal; gel vaginal; pomada vaginal; espuma vaginal; suspensión vaginal; emulsión vaginal; cápsula dura o blanda vaginal; comprimido vaginal; comprimido efervescente vaginal; sistema de administración vaginal; crema rectal; gel rectal; pomada rectal; espuma rectal; suspensión rectal; emulsión rectal; polvo para disolución rectal; polvo para suspensión rectal; comprimido para suspensión rectal; supositorio; cápsula rectal; suspensión nebulizadora; polvo para suspensión nebulizadora; emulsión nebulizadora; inhalación presurizada (suspensión, emulsión, etc.); polvo para inhalación; polvo para inhalación (cápsula dura); polvo para inhalación, predispensado; gel para inyección; suspensión para inyección; emulsión para inyección; polvo para suspensión para inyección; polvo y disolvente para suspensión para inyección; disolución para infusión; emulsión para infusión; comprimido de implantación; irrigación vesical; polvo para

irrigación vesical; gel uretral; bastoncillo uretral; instilación endotraqueopulmonar (disolución); instilación endotraqueopulmonar; instilación endotraqueopulmonar (suspensión); gel endocervical; polvo y disolvente para gel endocervical; suspensión intramaria; emulsión intramaria; pomada intramamaria; bastoncillo para los pezones; sistema de administración intrauterina; etc.

5 **Ejemplos**

A continuación se describen ejemplos específicos de purificación de polen (ejemplo 1), de preparación de nanosistemas adecuados para la presente invención (ejemplo 2) y su incorporación en las partículas purificadas de polen para formar vehículos de administración (ejemplo 3). También se muestran los resultados obtenidos en un ejemplo *ex vivo* (ejemplo 4) diseñado para evaluar las  
10 partículas purificadas de polen de la invención, así como experimentos *in vitro* e *in vivo* que muestran la estabilidad de las partículas purificadas de polen de la invención (ejemplos 5 y 6, respectivamente). Estos ejemplos sirven para ilustrar realizaciones de la invención, pero que en ningún caso se deben considerar limitativos.

**Ejemplo 1: purificación de partículas purificadas de polen**

15 **Purificación**

Para la purificación de las partículas de polen se partió de partículas de polen de girasol, *Helianthus annuus*.

*Etapas 1*

Se suspendieron 10 mg de partículas de polen en 20 ml de agua miliQ previamente calentada a 37°C  
20 durante 30 segundos con agitación. Se mantuvo la suspensión en agitación horizontal durante la noche anterior a temperatura ambiente, y se centrifugó al día siguiente a 2500 rpm a 15°C durante 10 minutos (Hettich Zentrifugen con rotor 1689). Se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso, lavando con 10 ml de agua miliQ a 37°C. La suspensión se volvió a centrifugar a 2500 rpm, a 15°C durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las partículas resultantes se secaron a 37°C una  
25 noche.

*Etapas 2*

A continuación se re-suspendió el material de la Etapa 1 en agua miliQ para evitar la formación de agregados, y se procedió al lavado con disolvente orgánico. Aquí se presentan dos ejemplos, el primero utilizando ciclohexano, y el segundo una mezcla de cloroformo/metanol.

En el primer caso se añadieron 800 microlitros de ciclohexano a 75 mg del material de la Etapa 1. La suspensión resultante se agitó 30 segundos, se centrifugó a 14000 rpm a 15°C durante 1 minuto (Hettich Zentrifugen con rotor 1689), para después descartar el sobrenadante. Las partículas resultantes se secaron a 37°C durante una noche.

- 5 En el segundo caso sobre 50 mg del material de la Etapa 1 se añadieron 10 ml de una mezcla cloroformo/metanol (3:1; v/v). La suspensión se agitó 30 segundos y se filtró en una membrana de tamaño de poro de 0,22 micras, que se lavó con 5 ml de la mezcla cloroformo/metanol. Después de 2 horas el material filtrado se recuperó del filtro.

#### Caracterización

- 10 Se evaluó la estabilidad del material así obtenido frente a condiciones *in vivo*. Concretamente, se incubó durante 2 horas a 37°C en los siguientes medios: fluido intestinal simulado a pH 6,8, fluido gástrico simulado a pH 1,2, y sangre y condiciones postpandriales en el intestino delgado superior, es decir, simulación de situación de alimentación en el fluido intestinal (pH de 5,8). Tras las diversas pruebas se evaluó por SEM el material, sin observarse variaciones significativas, confirmando así que
- 15 las partículas purificadas de polen preparadas por el sencillo método de purificación de la invención son estables en condiciones *in vivo*, en medios tan agresivos como el gástrico y el intestinal. Sólo en el caso de la incubación en fluido gástrico se observó la formación de materiales de sal y otros productos sobre la superficie de las partículas purificadas de polen. Las fotos de las partículas obtenidas tras la incubación en el fluido intestinal simulado a pH 6,8, el fluido gástrico simulado a pH
- 20 1,2, y la sangre, se muestran en las figuras 1B, 1C y 1D, respectivamente, y pueden compararse con la foto obtenida antes de la incubación (Figura 1A).

Para evaluar los resultados de este procedimiento se comparó la morfología del material obtenido de la Etapa 1, lavado solo con agua, con el material resultante de la Etapa 2, según la invención, lavado con agua y disolvente orgánico. Las fotografías SEM mostraron poros poco definidos en el primer

25 caso, muestra de que la capa que recubre la exina no se elimina completamente sólo con agua, y es necesario realizar un lavado adicional con un disolvente orgánico.

Para esta comparación también se midió la autofluorescencia del material obtenido de la Etapa 1, lavado solo con agua, y la del material resultante de la Etapa 2, según la invención, lavado en medio acuoso en pH aproximadamente neutro y disolvente orgánico. En todos los casos la emisión se

30 produce alrededor de 500 nm, pero en el caso del material preparado por el procedimiento de la invención, el nivel de autofluorescencia fue significativamente inferior, aproximadamente 8000 unidades en el caso del lavado adicional con la mezcla de cloroformo/metanol, y de

aproximadamente 4000 unidades en el caso del lavado adicional con ciclohexano. Ver la Figura 2. Esto muestra la distinta modificación que se hace sobre el sistema.

**Ejemplo 2: Algunos ejemplos de nanosistemas orgánicos que pueden ser encapsulados**

- 5 Se ofrecen a continuación dos ejemplos de preparación no-limitativos de nanosistemas orgánicos que pueden ser encapsulados

Ejemplo 2.1: formulación de nanopartículas de quitosano / trifosfato de sodio (CS/TPP)

Las nanopartículas de quitosano/trifosfato de sodio fueron obtenidas usando una ratio de CS/TPP (5:1) (w/w), mediante la técnica de gelificación iónica, según la solicitud de patente WO9804244). Se preparó una solución de 2 mg/ml de CS y 1.2 mg/ml de TPP en agua milliQ. Para obtener las nanopartículas 0.5 ml de TPP se vertieron sobre 1.5 ml de CS bajo agitación magnética y se dejaron bajo agitación durante 10 min a 25°C. Las nanopartículas se forman espontáneamente.

Ejemplo 2.2: nanocápsulas de protamina

Las nanocápsulas de protamina se prepararon mediante la técnica de difusión del solvente, según la patente ES2481940, de acuerdo a las siguientes etapas:

1. Se preparó una fase acuosa (10 ml) de protamina con una concentración final de 1,5 mg/ml. Esta solución se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente.
2. Se preparó una fase orgánica de 3 ml de PEG-estearato 40 (5.333 mg/ml), 20 uL glicocolato sódico (250 mg/ml), se mezclaron con vortex (5 segundos) y después se añadieron 62.5 µL del aceite Miglyol® y la mezcla se agitó otra vez por vortex y finalmente se añaden 1.98 ml de acetona. Opcionalmente, para la preparación de nanocápsulas fluorescentes, en esta etapa se añaden 20 microlitros del marcador 1,1'-Dioctadecil-3,3',3'-Tetrametilindodicarbocianine perclorato (DiD; 2.5 mg/ml) a la fase orgánica.
3. La fase orgánica se transfirió rápidamente a la fase acuosa previamente preparada. Las nanocápsulas se forman espontáneamente.
4. Tras mantener la suspensión durante 10 minutos, los solventes orgánicos se eliminaron por rotaevaporación. Tras este paso, opcionalmente se pueden aislar (e.j. por ultracentrifugación: 30.000 rpm, 1h, 15 °C)

30 Caracterización

Las propiedades de las nanopartículas y nanocápsulas se resumen en la Tabla 1 a continuación

Ejemplo	Tamaño (nm)	Índice de Polidispersión - Pdl	Potencial Z (mV)	Agente fluorescente DiD (%)
Ejemplo 2.1	187	0,3	0	-
Ejemplo 2.2	191	0,1	+3	-
	285	0,2	+3	96

Tabla 1

### **Ejemplo 3: Asociación entre las partículas purificadas de polen y los nanosistemas orgánicos**

Sobre 5 mg de las partículas purificadas de polen del ejemplo 1 se añadieron (i) 0,1 ml de las nanopartículas CS/TPP (0,4 mg/ml); o (ii) 0,1 ml de nanocápsulas de protamina (10 mg/ml). Las suspensiones en cada caso se mantuvieron bajo agitación horizontal 30 minutos a 37°C para así obtener vehículos de administración según la invención.

Como etapa adicional opcional se evaluó la liofilización de las cápsulas durante 50 horas a -40°C (Labconco Corp.), las cuales después se re-dispersaron en un medio de interés, por ejemplo, agua o agua tamponada.

Tanto en el caso de utilizar liofilización, como en el caso de aplicar únicamente una incubación, se pudo comprobar (fotografía SEM y microscopio confocal SP5 Leica AOB5- SP5) una asociación efectiva entre los nanosistemas orgánicos del ejemplo 2 y la cápsula de esporopolenina purificada obtenida en ejemplo 1. Todo ello sin la necesidad de aplicar medios agresivos como son medios ácidos o básicos, a la necesidad de aplicar altas presiones que podrían comprometer la integridad y propiedades de la cápsula. En la figura 3 se muestra las fotografías SEM de las partículas de polen que asocian A) nanopartículas de quitosano; B) nanocápsulas de protamina y C) nanocápsulas de protamina tras liofilización.

### **Ejemplo 4: Evaluación ex vivo de las partículas purificadas de polen de la invención**

#### **Preparación del modelo**

Se usaron ratas machos Sprague-Dawley con un peso aproximado de 250 g. Se pusieron en ayunas 18 horas antes del experimento, dejándolas únicamente con acceso a agua. Las ratas fueron sacrificadas utilizando CO<sub>2</sub> utilizando las condiciones adecuadas en la cámara de hipoxia. Los intestinos fueron extraídos inmediatamente mediante una incisión abdominal y lavados con solución de Krebs (pH 6.5) antes de la preparación de los sacos. Este paso se realiza para la eliminación de residuos de comida

que puedan quedar en el intestino. El intestino fue dividido en diferentes partes. Para la administración, las muestras fueron suspendidas en 1 ml de solución de Krebs e introducidos en los sacos con la ayuda de una jeringuilla. Una muestra fue utilizada para la evaluación de la anatomía y la fisiología del intestino tras el tratamiento con hematoxilina-eosina y las demás fueron utilizadas para el análisis de la capacidad de mucointeracción del complejo nanosistema y el biomaterial con el intestino mediante microscopía confocal.

### Resultados

Destaca el hecho de que la integridad del intestino se mantuvo durante las pruebas realizadas, indicando que los vehículos de administración de la invención son seguros y no provocan efectos secundarios sobre la morfología de los tejidos.

Tras periodos de incubación de las partículas purificadas de polen asociadas a nanosistemas orgánicos se observaron las muestras de tejido intestinal mediante microscopía confocal. En todos los casos se ha podido comprobar que incubaciones de 30 o de 120 minutos conducen a una mejora en la interacción y la retención de los nanosistemas sobre la mucosa intestinal. En las Figuras 4A, 4B y 4C se aprecia en las fotografías de confocal a los 120 minutos cómo las nanopartículas se mantienen sobre las partículas de polen purificadas de la invención. Se ve cómo el canal rojo (Figura 4A), que destaca las nanopartículas, coincide con el canal verde (Figura 4B), que destaca las partículas de polen. Se aprecia pues como los nanosistemas se mantienen depositados sobre las partículas de polen purificadas de la invención.

Por el contrario, la administración de los nanosistemas libres no condujo a la retención de cantidades apreciables sobre la mucosa intestinal, y no se observó una fluorescencia significativa por parte de las nanopartículas en el tejido (como se puede observar en la figura 4 en las fotografías que se refieren a NCs alta concentración y NCs baja concentración), quedando comprobado el efecto de promoción a la adhesión que se obtiene cuando se combinan las partículas purificadas de polen con los nanosistemas.

### **Ejemplo 5: evaluación *in vivo* de las partículas purificadas de polen de la invención**

El experimento se realizó con ratas Sprague Dawley, las cuales fueron sometidas a ayuno 12 horas antes de llevar a cabo el experimento.

Las muestras utilizadas fueron de 75 miligramos de polen por 1 mililitro de agua, se administraron mediante oral gavage a cada una de las ratas de estudio.

La observación se llevó a cabo tras periodos de 1 hora y 3 horas respectivamente.

Para la extracción de los tejidos se sacrificó a la rata mediante el uso de una cámara de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se llevó a cabo una incisión en el abdomen del animal a través cual se extrajeron diferentes partes del tracto digestivo. En concreto en estos estudios nos centramos en diferentes partes del intestino delgado (duodeno y yeyuno).

- 5 Tras la extracción de los tejidos y sin ningún tipo de tratamiento se realizó la observación directa mediante un microscopio óptico a diferentes aumentos.

Las conclusiones extraídas de estos experimentos fueron que los granos de polen son estables en condiciones *in vivo* ya que podemos observar su morfología característica mediante microscopia y por otro lado vemos que la administración oral del polen *in vivo* puede ser efectiva ya que los granos

- 10 de polen llegan sin dificultad a diferentes regiones del intestino delgado. Ver Figura 5.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la preparación de una partícula purificada de polen, que comprende las etapas de
  - 5 (a) lavar una partícula de polen en un medio acuoso tamponado a un pH comprendido entre 4,5 y 9; y
  - (b) lavar con un disolvente orgánicopara obtener la partícula purificada de polen que conserva la capa de intina y la capa de exina, pero cuya capa lipídica (*pollenkitt*) se ha eliminado total o parcialmente.
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde la partícula no se pone en contacto con un medio de pH menor de 4,5 ni de pH mayor de 9.
3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde no se fractura la exina de la partícula purificada de polen.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde no se somete la  
15 partícula purificada de polen a presiones superiores a 5 atmósferas.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende poner en contacto un nanosistema con la partícula purificada de polen obtenida tras la etapa (b).
6. El procedimiento según la reivindicación 5, que comprende las etapas de
  - 20 (a) lavar una partícula de polen en un medio acuoso tamponado a un pH comprendido entre 4,5 y 9y;
  - (b) lavar con un disolvente orgánico para obtener la partícula purificada de polen que conserva la capa de intina y la capa de exina, pero cuya capa lipídica (*pollenkitt*) se han eliminado total o parcialmente; y
  - (c) incubar la partícula purificada de polen en presencia de un nanosistema.
- 25 7. El procedimiento según la reivindicación 6, en donde la incubación se lleva a cabo en un disolvente.
8. El procedimiento según la reivindicación 5, que comprende las etapas de
  - (a) lavar una partícula de polen en un medio acuoso tamponado a un pH comprendido entre 4,5 y 9;

(b) lavar con un disolvente orgánico para obtener la partícula purificada de polen que conserva la capa de intina y la capa de exina, pero cuya capa lipídica (*pollenkitt*) se ha eliminado total o parcialmente;

(c) secar la partícula purificada de polen de la etapa (b); y

5 (d) impregnar la partícula purificada de polen con los nanosistemas, opcionalmente, aplicando un vacío.

9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una etapa adicional de liofilización.

10. Partícula purificada de polen obtenible por el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

11. La partícula purificada de polen según la reivindicación 10, en la que dicho polen es equinado.

12. La partícula purificada de polen según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en la que dicho polen es una Magnoliophyta Eudicotiledóneas.

15 13. La partícula purificada de polen según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que dicho polen es de la familia de las *Helianthus*.

14. La partícula purificada de polen según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que tiene un diámetro medio comprendido entre 1 y 400 micras.

20 15. La partícula purificada de polen según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, que comprende un nanosistema.

16. La partícula purificada de polen según la reivindicación 15, en donde dicho nanosistema es un nanosistema orgánico.

25 17. La partícula purificada de polen según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, en donde el nanosistema tiene un diámetro de partícula medio comprendido entre 1 nm y 500 nm, en donde el diámetro medio se mide mediante espectroscopia de correlación fotónica.

18. La partícula purificada de polen según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde el índice de la polidispersidad del diámetro medio del nanosistema orgánico está comprendido entre 0,1 y 0,5, en donde la polidispersidad por espectroscopía de correlación fotónica.

30 19. La partícula purificada de polen según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en donde el nanosistema es biodegradable.

## ES 2 613 586 A1

20. La partícula purificada de polen según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 20, en donde el nanosistema comprende un principio activo farmacéuticamente aceptable, un principio dietéticamente aceptable o mezclas de ambos.
- 5 21. Composición que comprende la partícula purificada de polen definida en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 20.
22. La composición según la reivindicación 21, que comprende un nanosistema, en donde dicho nanosistema comprende un principio activo farmacéuticamente aceptable.
23. La composición según la reivindicación 22, que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 24. La composición según la reivindicación 21, que comprende un nanosistema, en donde dicho nanosistema comprende un principio dietéticamente aceptable.
25. La composición según la reivindicación 24, que comprende un excipiente dietéticamente aceptable.
- 15 26. La partícula purificada de polen definida en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 20 para su uso como medicamento.
27. Uso de la partícula purificada de polen definida en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 20 para la fabricación de un medicamento de administración transmucosa.
28. El uso según la reivindicación 27 para la fabricación de un medicamento de administración oral, de administración ocular o de administración nasal.
- 20 29. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 27 o 28 para la fabricación de un medicamento para la liberación controlada un principio activo farmacéuticamente aceptable.
30. El uso según la reivindicación 29 en donde dicho principio activo es una proteína, un péptido, un lípido, un anticuerpo, o un ácido nucleico.
- 25 31. Uso de la partícula purificada de polen definida en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 20 para administrar un principio dietéticamente aceptable.
32. Uso según la reivindicación 31, como enmascarador del sabor.

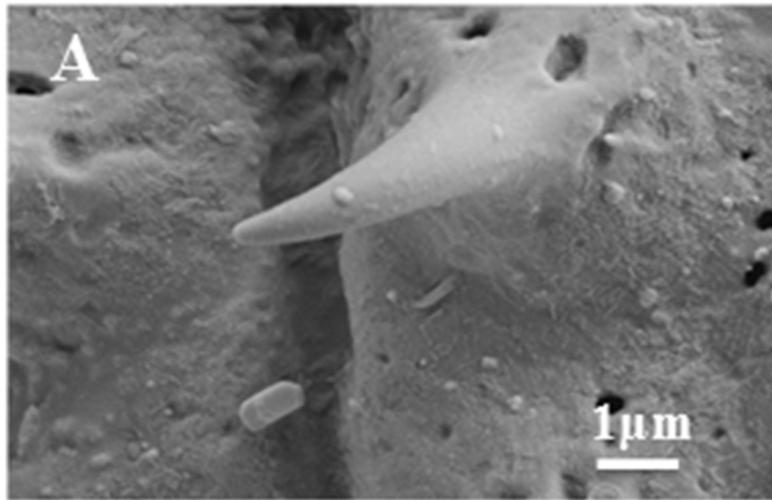


Figura 1A

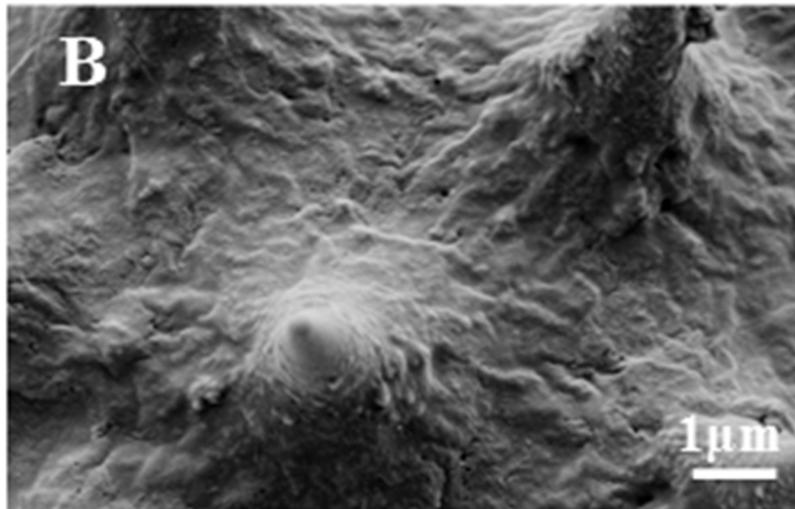


Figura 1B

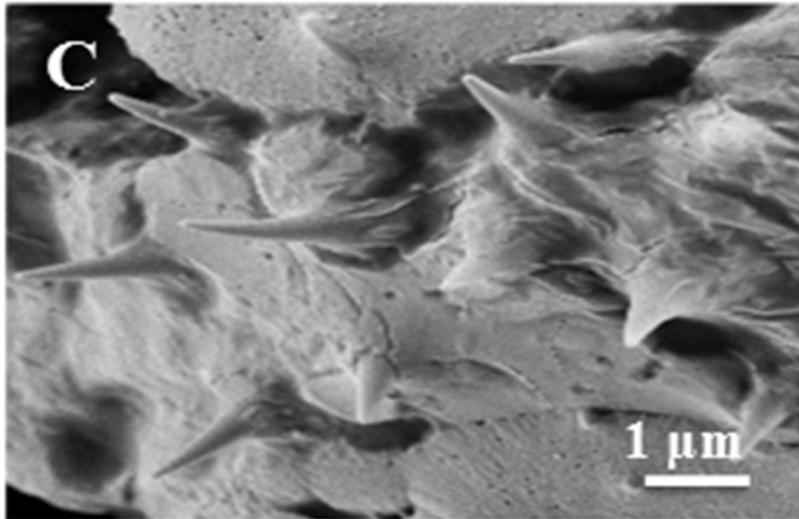


Figura 1C

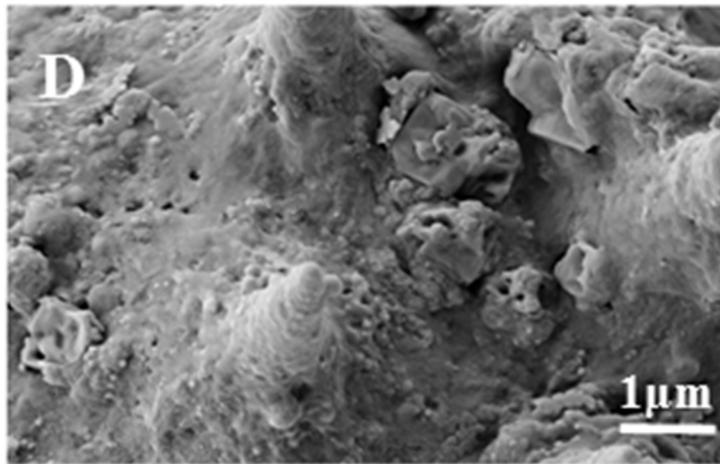


Figura 1D

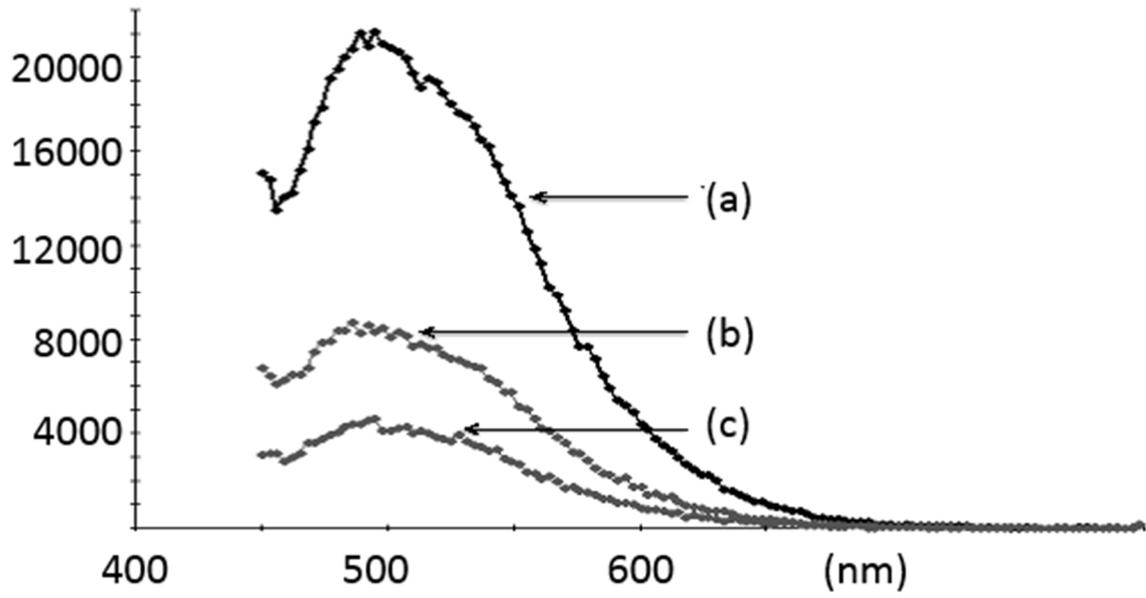


Figura 2

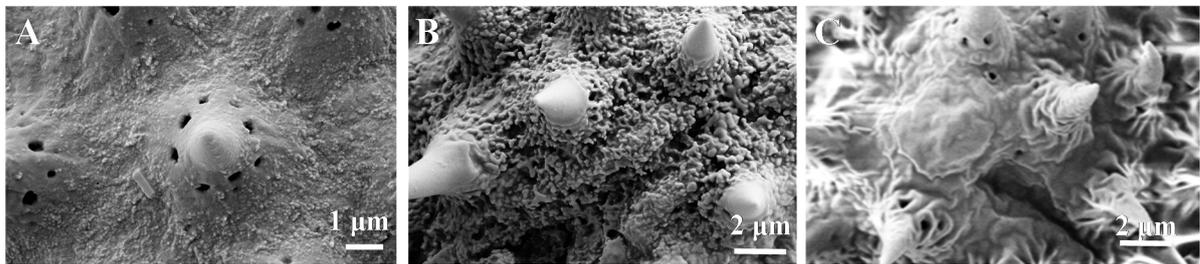


Figura 3

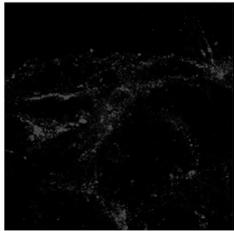
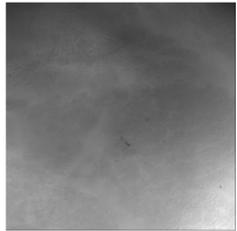
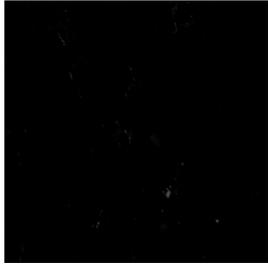
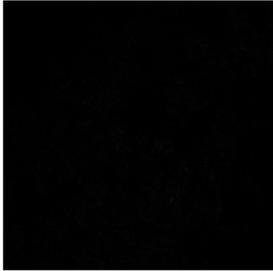
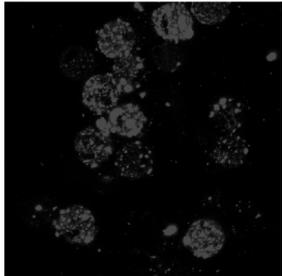
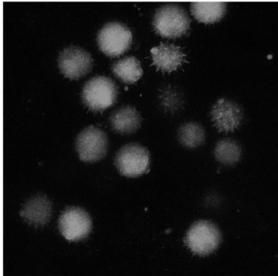
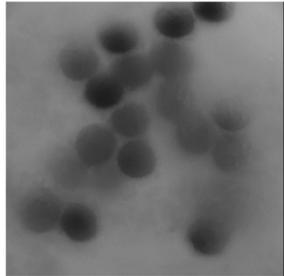
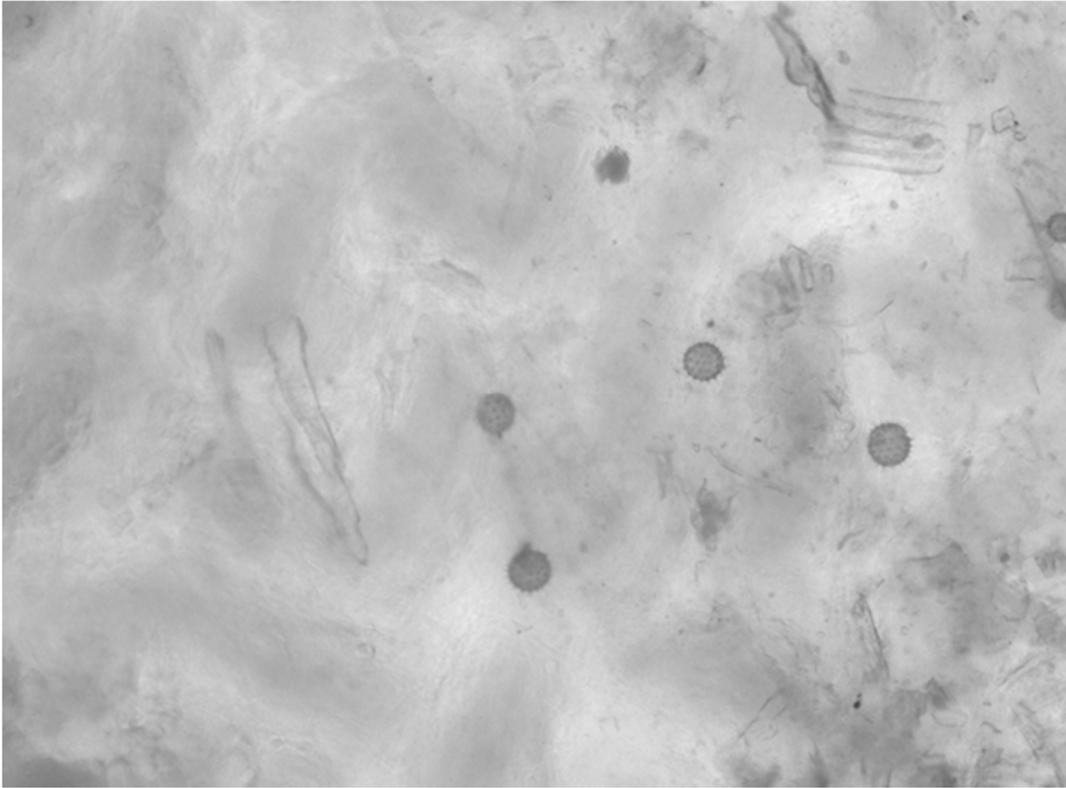
Ex vivo 120 minutos			
	Rojo	Verde	Transmitida
NCs alta concentración (900µL)			
NCs baja concentración			
NCs + Polen	 4A	 4B	 4C

Figura 4



**Figura 5**



- ②① N.º solicitud: 201730152  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.02.2017  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K9/50** (2006.01)  
**A61K36/18** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2017/010945 A1 (NENYANG TECHNOLOGICAL UNIVERSITY) 19/01/2017, Párrafos 2, 21-23, 28-29, 82, 99-100, 104, 105, 110-112, 118, 171, 185, 188 y reivindicaciones 1, 4-10, 17, 22, 32, 33, 36, 37.	1-4
A	WO 2009/077749 A1 (UNIVERSITY OF HULL ) 25/06/2009, Página 1, líneas 10-25, página 2, líneas 9-13 y 24-31, página 3, líneas 15-22, página 4, líneas 16-19 y 30-32, y reivindicaciones 1-4, 8-9, 23 y 33-35.	1-32
A	LIN, Haisheng; GOMEZ, Ismael; MEREDITH, J. Carson. POLLENKITT WETTING MECHANISM ENABLES SPECIES-SPECIFIC TUNABLE POLLEN ADHESION. 2013, Vol. 29, Páginas 3012-3023. Todo el documento. Todo el documento.	1-32
A	MUNDARGI, Raghavendra C., et al. SUNFLOWER POLLEN AS A DRUG DELIVERY VEHICLE. . 2015. Todo el documento. Todo el documento.	1-32

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
12.05.2017

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, USPTO PATENT DATABASE, JPO PATENT DATABASE, NPL, XPESP, MEDLINE, EMBASE, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE PATENT.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.05.2017

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 5-32	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 5-32	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2017/010945 A1 (NENYANG TECHNOLOGICAL UNIVERSITY)	19.01.2017

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de invención consiste en un procedimiento para la preparación de una partícula purificada de polen (reivindicaciones 1-9), la partícula de polen obtenida mediante dicho procedimiento (reivindicaciones 10-20 y 26), una composición que comprende la partícula de polen purificada (reivindicaciones 21-25), y sus usos (reivindicaciones 27-32).

**1.- NOVEDAD (Art. 6.1 LP) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP)****1.1.- Reivindicaciones 1-4**

El documento D01 se considera el más representativo del estado de la técnica y consiste en los métodos de microencapsulación en esporas y granos de polen. El documento D01 divulga un procedimiento de preparación de la partícula de polen que comprende las etapas de lavar la partícula de polen en un medio acuoso tamponado a un pH comprendido entre 4,5 y 9, y posteriormente, lavar con un disolvente orgánico, de forma que se obtiene la partícula de polen con la intina y la exina conservada, pero cuya capa lipídica (pollenkitt) se ha eliminado (ver párrafos 2, 21-23, 28-29, 82, 99-100, 104, 105, 110-112, 118, 171, 185, 188 y reivindicaciones 1, 4-10, 17, 22, 32, 33, 36, 37).

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-4 se consideran que no tienen novedad ni actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 LP.

**1.2.- Reivindicaciones 5-32.**

El documento D01 difiere de la presente solicitud de invención en que no divulga el nanosistema que se pone en contacto con la partícula de polen.

Por lo tanto, las reivindicaciones 5-32 se consideran que tienen novedad y actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 LP.

**2.- PATENTABILIDAD (Art. 4.1 LP).**

Las reivindicaciones 1-4 no cumplen con el requisito de patentabilidad según el artículo 4.1 LP, mientras que las reivindicaciones 5-32 cumplen con el requisito de patentabilidad según el artículo 4.1 LP.