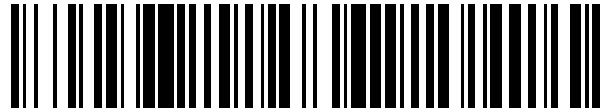


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 668**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12730779 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2563478**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de un extracto farmacéuticamente activo de Arthrospira sp.**

30 Prioridad:

06.07.2011 DE 102011107307

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

12.02.2014

73 Titular/es:

**OCEAN RESEARCH & DEVELOPMENT GMBH
(100.0%)**

**Dieselstr. 6
21465 Reinbek, DE**

72 Inventor/es:

**KEIMES, JÖRG y
GÜNTHER, PATRICK**

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 442 668 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

Procedimiento de fabricación de un extracto farmacéuticamente activo de *Arthrospira* sp.

5 **[0001]** La invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un extracto farmacéuticamente activo de la cianobacteria *Arthrospira* sp.

10 **[0002]** Hace ya tiempo que se sabe que los organismos acuáticos han desarrollado una pluralidad de mecanismos moleculares de defensa contra el ataque microbiano, y en particular contra el ataque bacteriano y fúngal. Con el creciente perfeccionamiento de las técnicas biomoleculares, estas moléculas han pasado recientemente a estar también en el foco de investigaciones para su aplicación médica en enfermedades de los humanos y los animales.

15 **[0003]** Son aquí en particular dignas de mención diversas algas y cianobacterias que no tan sólo son simple objeto de investigación de mecanismos moleculares de defensa, sino que debido a su producción de sustancias farmacéuticamente activas son un importante factor económico entre otras cosas como suplementes nutricionales.

20 **[0004]** Por ejemplo se sabe de la cianobacteria *Arthrospira* sp. que bajo estrés fisiológico produce sustancias con actividad antimicrobiana que pueden ser concentradas mediante adecuados pasos de extracción y pueden ser usadas para el tratamiento de distintos trastornos. Un procedimiento de este tipo es por ejemplo conocido por la WO 2006/047830 A1.

25 **[0005]** Ciertamente son difíciles de determinar y de ajustar las condiciones de estrés bajo las cuales los organismos usados para la producción de determinadas sustancias producen un máximo de las sustancias deseadas, por lo cual a menudo se produce tan sólo una pequeña cantidad de las sustancias deseadas, o bien se ajustan unas condiciones demasiado duras, debido a lo cual mueren los organismos.

30 **[0006]** La finalidad de la invención es por consiguiente la de crear un procedimiento de fabricación de un extracto farmacéuticamente activo de *Arthrospira* sp. con el que el contenido de sustancias farmacéuticamente activas que se da de manera natural pueda ser extraído en gran medida de los organismos. El extracto obtenido debe además presentar una buena acción antimicrobiana, y en particular bactericida y fungicida.

[0007] Esta finalidad es alcanzada mediante el procedimiento con las características de la reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes describen configuraciones ventajosas de la invención.

35 **[0008]** La idea básica de la invención es la de usar para la desintegración celular una extrusionadora de las que están habitualmente a la venta en el mercado, que así y todo ya existe en la industria elaboradora de *Arthrospira* sp. para la fabricación de productos en forma de tabletas.

40 **[0009]** En especial está previsto extrusionar un polvo que está habitualmente a la venta en el mercado como polvo de espirulina y consta de individuos de la especie *Arthrospira* sp., y preferiblemente de la cianobacteria *Arthrospira maxima*, *Arthrospira fusiformis* o *Arthrospira platensis*, con adición de agua a una temperatura de entre 130°C y 160°C, ambas inclusive, y a una presión de entre 8 MPa y 13 MPa, ambas inclusive, (que corresponde a una presión de 80 a 130 bares), con lo cual en la cabeza de la matriz de la extrusionadora se dan tan sólo por breve espacio de tiempo temperaturas de 160°C como máximo. Así pues, la selección de una extrusionadora adecuada para el procedimiento según la invención se rige por la posibilidad de usar agua como solvente, así como por los parámetros anteriormente mencionados, que en esencia no deberían ser sobrepasados, pero sí deberían ser alcanzados.

50 **[0010]** En un paso que se realiza a continuación se extraen los componentes de la *Arthrospira* con un solvente orgánico, y preferiblemente con éster etílico de ácido acético. Con particular preferencia se usan para ello 10 ml de éster etílico de ácido acético por 1 g de extrusionado, efectuándose con la máxima preferencia la extracción a lo largo de un espacio de tiempo de 24 h a 28°C.

55 **[0011]** Para llegar finalmente a la obtención de un producto listo para la venta en el mercado, el solvente usado en la extracción puede eliminarse, siendo por ejemplo evaporado en un evaporador rotativo. Con particular preferencia, para la decoloración y/o para la eliminación del olor del extracto el extracto que queda tras la eliminación del solvente se filtra, p. ej. con carbón activo, para a continuación obtener un extracto acuoso que es aplicable con finalidades terapéuticas o profilácticas en el campo de la medicina humana o veterinaria. Es además también pensable que el extracto encuentre aplicación en el sector cosmético.

60 **[0012]** Se aclara a continuación más detalladamente la invención a base de un ejemplo de realización configurado de manera particularmente preferida.

[0013] Polvo de espirulina no tratado con tecnología genética (*Spirulina platensis* o *Arthrospira platensis*) fue procesado en una extrusionadora de un solo husillo de la firma Kahl del tipo OEE8, siendo así convertido en pellets.

[0014] El polvo de *Arthrospira* usado tenía las propiedades que se indican en la Tabla 1:

Tabla 1

Parámetro	Método/Aparato	Valores de medición
Color	visual	verde oscuro
Olor	DAB 10 (V.3.1.6)	sui géneris
Consistencia	visual	en forma de polvo
Humedad	DAB 10 (V.6.22.N2) determinador absoluto a 105°C	3,92 g / 100g
Proteína	§ 35 LMBG L 17.00-15 determinador de Kjeldahl	54,75 g / 100 g
Sustancias minerales	DAB 10 (V.3.2.16) reducción a cenizas	5,65 g / 100 g
Grasa/Lípidos	Mod. según § 35 LMBG L 17.00-4; extracción según Weibull / Stoldt	5,6 g / 100 g
Toxinas de algas	HPLC, detección UV, espectrómetro de masas	no detectables
Clorofila	Jeffrey, SW y Humphrey, GF (1975) Biochem. Physiol. Pflanzen 167, 191-194, fotómetro espectral	1,019 mg / 100 g

5 [0015] El número total de gérmenes era de 7×10^4 gérmenes / g de polvo, siendo la proporción de levaduras, mohos y gérmenes coliformes respectivamente inferior a las 100 células / g de polvo (no era detectable la propia *Escherichia coli*).

10 [0016] La extrusionadora usada para este ejemplo se distingue por poseer una alta capacidad de carga, por ofrecer la posibilidad de trabajar con alta presión (de hasta 150 bares), por su alto nivel de potencia (hasta 11 kW), por poseer una matriz controlada hidráulicamente y por la aportación de líquidos al proceso en curso. En particular pueden controlarse por medio de un panel táctil la presión, el número de revoluciones del husillo de la extrusionadora, la alimentación con producto y la aportación de líquidos, que son aquí agua. Dos sensores de temperatura permiten la observación y la posible contrarregulación de la temperatura mediante refrigeración. La extrusionadora hace uso de roscas cónicas de profundidad de penetración ajustable que sustituyen al segundo husillo.

15 [0017] La particular ventaja de la extrusión es la muy breve sollicitación con temperatura del polvo de microalgas, de 2 minutos como máximo, en dependencia del tiempo de permanencia ajustable. Como se ha constatado, a pesar de la muy breve sollicitación térmica la acción conjunta de la presión y las fuerzas de cizallamiento permite obtener una alta tasa de desintegración. Especialmente en la extrusionadora que se usa es posible refrigerar la extrusionadora con líquido refrigerante, con lo cual pueden mantenerse a lo largo de todo el desarrollo del proceso unas temperaturas relativamente bajas.

20 [0018] En un primer paso se introduce en la extrusionadora el polvo de *Arthrospira* por medio de un tornillo sin fin de dosificación. Después de un corto recorrido de amasado se humedece el polvo mediante la aportación de agua a razón de una gama de valores que va desde los 2 l/h hasta los 4 l/h, ambos inclusive. Tan sólo entonces empieza a tener lugar la mezcla con agua y el cizallamiento de la mezcla de polvo de *Arthrospira* y agua.

25 [0019] El caudal de polvo durante el proceso en curso es preferiblemente de poco más o menos 40 kg/h, haciéndose preferiblemente que el husillo estándar que se usa (Nº 3195-4456) funcione a 300 rpm.

30 [0020] Al final del husillo, la extrusionadora queda cerrada por una matriz que le permite a la mezcla de algas y agua salir de la extrusionadora tan sólo a través de orificios y/o rendijas de forma predeterminada y previstos en una cantidad predeterminada. Preferiblemente se usa una matriz con 14 orificios con un diámetro de orificio de 3,0 mm para cada uno. Se produce de manera forzada una acción conjunta de la presión y del cizallamiento, hasta que el extrusionado pasa a presión a través de los orificios o de las rendijas. Al salir el extrusionado de la extrusionadora a través de la matriz se produce una expansión del extrusionado debido a la evaporación del solvente y al repentino descenso de la temperatura.

35 [0021] Un cabezal de cuchillas rotativo dispuesto detrás de la matriz preferiblemente corta el extrusionado en forma de pellets que al caer al interior de un recipiente de recogida se secan y enfrían rápidamente debido a su superficie incrementada. En la matriz pueden darse por breve espacio de tiempo temperaturas de hasta 160°C.

40 [0022] Para la extracción de los componentes de *Arthrospira* farmacéuticamente activos se añaden respectivamente 10 ml de acetato de etilo por 1 g del polvo de *Arthrospira* extrusionado, y ello se tiene en incubación por espacio de 24 h a 28°C. Tras la incubación, la solución es preferiblemente filtrada por medio de un filtro plegado, y se evapora el solvente en un evaporador rotativo. El filtrado es a continuación de ello preferiblemente recogido en 1 ml de etanol y filtrado por medio de un filtro estéril.

45 [0023] Con particular preferencia, el extracto puede ser filtrado adicionalmente para su decoloración y/o reducción de olor, pudiendo por ejemplo pasársele por una columna de carbón activo. Como resultado de ello se obtiene una solución diáfana con un olor sui géneris.

[0024] El extracto fabricado según el procedimiento preferiblemente descrito presenta una alta actividad antimicrobiana, y en particular antibacteriana y antifungal. Como medida de la bioactividad se midió la actividad de quitinasa del extracto.

5 [0025] Así, en un extracto de Polvo de Spirulina High Performance que no fue extrusionado, pero que por lo demás fue tratado como se ha descrito anteriormente, pudo determinarse una actividad de quitinasa de 5,5 U/g.

10 [0026] Frente a ello, una medición de la actividad de quitinasa del Polvo de Spirulina High Performance tratado con extrusión según el procedimiento inventivo mostró una actividad multiplicada aproximadamente por 3,5 en comparación con el polvo no tratado, siendo dicha actividad multiplicada de 19,1 U/g.

15 [0027] Las acciones del extracto de algas contra hongos, bacterias y virus se realizaron en el primer paso *in-vitro*, es decir que se hizo el clásico ensayo de zona de inhibición contra hongos y bacterias. En particular se realizaron ensayos de bioactividad (entre otros, ensayos de zona de inhibición) con *Propionibacterium acnes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Trichophitum rubrum*, *Trichophitum mentagrophites* y Herpes. La actividad protectora antiviral contra herpesvirus (HHV-1) se verificó a base de verocélulas. Tras ensayos *in-vitro* exitosamente positivos se procedió además al abandono de la terapia y a realizar seguimientos de los casos de pacientes, para comprobar el efecto clínico.

20 [0028] El resultado muestra un incrementado efecto de la actividad antimicrobiana del extracto fabricado según la invención (extracto 2), en comparación con la actividad antimicrobiana de un extracto de *Arthrospira* fabricado sin extrusión del material de partida (extracto 1). Adicionalmente, los valores de medición obtenidos para *Arthrospira platensis* (extracto 1 y extracto 2) fueron comparados con la actividad antimicrobiana de un extracto de *Arthrospira maxima* (extracto 3) fabricado según el procedimiento de la invención.

25 [0029] Los resultados de ensayo que se reproducen en la Tabla 2 indican para *Propionibacterium acnes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Trichophitum rubrum* y *Trichophitum mentagrophites* la bioactividad del respectivo extracto sobre la base del efecto inhibitorio del extracto en %. Se designaron como de un 0% todas las actividades con un efecto inhibitorio de un 30% y/o menos. Para herpesvirus pudo determinarse un efecto inhibitorio para soluciones de extracto > 2%.

Tabla 2

	<i>P. acnes</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophites</i>
Extracto 1 - 0,1%	0	0	0	0	0
Extracto 1 - 1%	98	33	0	43	40
Extracto 1 - 5%	100	54	0	52	51
Extracto 2 - 0,1%	0	0	0	0	0
Extracto 2 - 1%	81	37	0	59	54
Extracto 2 - 5%	100	56	45	73	65
Extracto 3 - 0,1%	0	0	0	0	0
Extracto 3 - 1%	87	35	0	51	45
Extracto 3 - 5%	93	75	55	63	57

30

[0030] En otro ensayo se investigó la inhibición de otros gérmenes usando un 0,5% del extracto fabricado según la invención y disuelto (Tabla 3):

Tabla 3

Germen	Inhibición porcentual
<i>Propionibacterium acnes</i>	100%
<i>Staphilococcus epidermis</i>	100%
<i>Staphilococcus aureus</i>	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90%
<i>Aspergillus niger</i>	80%
<i>Dermabacter</i>	90%
<i>Brevibacter</i>	97%
<i>Trichoderma sp.</i>	100%

35 [0031] El procedimiento inventivo permite una desintegración de polvo de *Arthrospira* para la fabricación de un extracto de *Arthrospira* farmacéuticamente activo con actividad antimicrobiana incrementada. El procedimiento evita los métodos complicados y costosos para la incrementada producción de sustancias farmacéuticamente activas por parte del propio organismo, y en lugar de ello incrementa la producción de estas sustancias en un extracto de cianobacterias *Arthrospira* cultivadas convencionalmente o bien también bajo estrés fisiológico en comparación con extractos fabricados según procedimientos convencionales.

40

[0032] El extracto inventivo es especialmente adecuado para ser usado contra enfermedades que son en particular ocasionadas por las especies *Propionibacterium acnes*, *Staphilococcus epidermis*, *Staphilococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa, *Aspergillus niger*, *Dermabacter*, *Brevibacter* y *Trichoderma*, ya sea en solitario o bien en combinación. Estas enfermedades son en particular enfermedades de la piel, tales como por ejemplo acné, herpes (en particular del tipo I), la blefaritis y la endoftalmitis.

- 5 **[0033]** Además, en estudios de casos pudo también constatarse un efecto del extracto fabricado según la invención contra virus del grupo de los papilomavirus humanos (HPV).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fabricación de un extracto farmacéuticamente activo de la cianobacteria *Arthrospira sp.* con los pasos siguientes:
5 - extrusión de un polvo con contenido de *Arthrospira sp.* bajo adición de agua;
- extracción del extrusionado con un solvente orgánico; y
- preparación del extracto como composición farmacéuticamente activa.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** la extrusión se realiza a una temperatura de entre 150°C y 160°C, ambas inclusive, y a una presión de entre 8 MPa y 13 MPa, ambas inclusive.
- 15 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por el hecho de que** el solvente orgánico es éster etílico de ácido acético.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por el hecho de que** la extracción se efectúa a 28°C por espacio de 24 h.
- 20 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por** los siguientes pasos a continuación de la extracción:
- eliminación del solvente;
- filtración del extracto para la decoloración y/o la eliminación de olor del extracto; y
- preparación del extracto filtrado como composición farmacéuticamente activa.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado por el hecho de que** el extracto filtrado es recogido en etanol y/o filtrado a través de un filtro estéril.
- 30 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por el hecho de que** se extrusiona una solución acuosa de polvo con contenido de *Arthrospira sp.*
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por el hecho de que** en la extrusión con un caudal de 40 kg de polvo por hora se le aportan al polvo hasta 4 l de agua por hora.
- 35 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por el hecho de que** la extracción se hace con 10 ml de éster etílico de ácido acético por 1 g de extrusionado.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por el hecho de que** la cianobacteria es *Arthrospira maxima*, *Arthrospira fusiformis* o *Arthrospira platensis*.