

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 969**

51 Int. Cl.:

A61K 31/737	(2006.01)
A61K 36/05	(2006.01)
A61K 8/73	(2006.01)
C08B 37/00	(2006.01)
C12P 19/04	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2013 PCT/GB2013/051223**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13167911**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2013 E 13730626 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2846813**

54 Título: **Polisacáridos a partir de Prasinococcales**

30 Prioridad:

11.05.2012 GB 201208325

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2017

73 Titular/es:

**GLYCOMAR LIMITED (100.0%)
European Centre for Marine Biotechnology,
Dunstaffnage Marine Lab Dunbeg
Oban, Argyll PA37 1QA, GB**

72 Inventor/es:

**BAVINGTON, CHARLES DANIEL y
MOSS, CLAIRE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 610 969 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

Polisacáridos a partir de Prasinococcales

Campo Técnico

5 La invención se refiere a una composición que comprende un polisacárido obtenible a partir de la microalga, *Prasinococcus capsulatus* y cepas relacionadas con *P. capsulatus* para uso profilácticamente y/o terapéuticamente en el tratamiento de los trastornos del sistema inmunitario, tales como trastornos inflamatorios, por ejemplo en psoriasis y afecciones dermatológicas. Además, se proporcionan derivados de un polisacárido obtenible a partir de las microalgas, *Prasinococcus capsulatus* y cepas de algas relacionadas con *P. capsulatus* y el uso de tales derivados profilácticamente y terapéuticamente en el tratamiento de los trastornos del sistema inmune, tales como trastornos inflamatorios, por ejemplo en psoriasis y afecciones dermatológicas.

10 También se proporciona el uso del polisacárido y derivados del mismo obtenibles a partir de las microalgas, *Prasinococcus capsulatus* o una cepa de algas relacionadas con *P. capsulatus* en la preparación de composiciones cosméticas y nutricionales.

Antecedentes de la invención

15 Las macroalgas (algas marinas) se han explotado para proporcionar productos establecidos desde hace mucho tiempo tales como alginato y carragenano y productos más nuevos tales como fucoídano; sin embargo, las microalgas todavía no se han usado significativamente de este modo y hay relativamente poca caracterización de esos productos derivados de las microalgas.

Breve exposición de la invención

20 De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un polisacárido que forma un gel obtenible a partir de *Prasinococcus capsulatus* o una cepa de algas relacionadas con *P. capsulatus* donde el polisacárido que forma gel es un heteropolímero sulfatado de peso molecular mayor de 670kDa que comprende unidades de glucosa, galactosa, arabinosa y ácido urónico para uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune, en particular trastornos del sistema inmune que son afecciones inflamatorias.

25 Los inventores han acometido una serie de métodos para determinar la composición del polisacárido de la invención y los derivados del mismo. Utilizando los métodos detallados aquí, sin pretender estar limitado en teoría en lo que se refiere a la configuración del polisacárido, los inventores han caracterizado el polisacárido y los derivados tal como se describe. Por lo tanto, en realizaciones cuando un polisacárido o derivados se caracterizan usando los métodos descritos aquí proporcionan las composiciones de monosacárido y sulfato tal como se describen en la presente memoria.

30 Se ha demostrado que *Prasinococcus capsulatus*, una especie descubierta recientemente, produce polisacáridos (Miyashita y colaboradores, *Prasinococcus capsulatus* Gen. Et Sp. Nov., A New Marine Coccolid Prasinophyte. J. Gen. Appl. Microbiol., 39, 571-582 (1993) y Miyashita y colaboradores, Composition and nature of extracellular polysaccharide produced by newly isolated coccolid prasinophyte, *Prasinococcus capsulatus*. J. Marine Biotechnol., 3, 136-139 (1995).).

35 Adecuadamente una cepa relacionada con *Prasinococcus capsulatus* puede incluir una cepa del orden *Prasinococcales*. En realizaciones una cepa relacionada con *Prasinococcus capsulatus* puede incluir *Prasinoderma singularis*. En realizaciones el polisacárido puede ser un polisacárido asociado con la pared celular de la microalga, y/o estar presente en un homénaje de la microalga, y/o un polisacárido secretado o un exopolisacárido. El polisacárido se puede proporcionar en una forma aislada, purificada o semi-purificada. En realizaciones los polisacáridos pueden ser un material purificado que se ha separado de la biomasa celular, de tal forma que el polisacárido sea al menos un 50% del polisacárido en peso, y más preferiblemente superior al 75% del polisacárido en peso, más preferiblemente superior al 85% en peso, más preferiblemente aproximadamente 95% en peso.

45 En realizaciones, los trastornos del sistema inmune son aquellos en los que la respuesta de las células y tejidos vasculares a estímulos internos o externos es insuficiente, excesiva o crónica. En afecciones inflamatorias esta respuesta es normalmente excesiva y/o crónica dando como resultado un aumento y mantenimiento de la activación de las células inmunes (tales como neutrófilos y células T), que pueden infiltrarse en los tejidos y aumentar la producción de mediadores pro-inflamatorios, dando como resultado una inflamación sostenida. Se ha determinado que los polisacáridos se pueden utilizar para moderar los efectos de esta activación, por ejemplo, para reducir la actividad de las proteasas de neutrófilos, tal como elastasa; para reducir la secreción de proteínas pro-inflamatorias (citoquinas) y especies reactivas de oxígeno de la sangre y células endoteliales; y para reducir la infiltración de células sanguíneas en los tejidos afectados.

50 En realizaciones de la invención, un polisacárido como el que se describe aquí puede ser para uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias de la piel, incluyendo eczema, psoriasis y dermatitis atópica.

En realizaciones de la invención un polisacárido como el que se describe aquí puede ser para uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias del intestino, en particular para uso en el tratamiento de trastornos intestinales, incluyendo el síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

5 En realizaciones de la invención un polisacárido como el que se describe aquí puede ser para uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias respiratorias incluyendo asma, fibrosis quística, enfisema, trastorno pulmonar obstructivo crónico, síndrome de dificultad respiratoria aguda, o rinitis alérgica.

El polisacárido para uso en la invención se puede caracterizar por al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o al menos cinco de las características (i), (ii), (iii), (iv), y (v).

- (i) Intervalo de peso molecular
- 10 (ii) Composición del monosacárido
- (iii) Actividad inmunomoduladora
- (iv) Contenido de sulfato (como un porcentaje del peso molecular de la molécula)
- (v) Viscosidad / propiedades de formación del gel

Intervalo de peso molecular

15 Un polisacárido para uso en la presente invención tiene típicamente un peso molecular que 670kDa o mayor que 670kDa.

El polisacárido descrito aquí puede tener un peso molecular en el intervalo de 670kDa a 40MegaDa. El polisacárido descrito aquí puede tener un peso molecular mayor que o igual a 1 MegaDa, mayor que o igual a 5 MegaDa, mayor que o igual a 10 MegaDa, mayor que o igual a 15 MegaDa, mayor que o igual a 20 MegaDa, mayor que o igual a 25 MegaDa, mayor que o igual a 30 MegaDa, mayor que o igual a 35 MegaDa, o 40 MegaDa.

20 Un polisacárido de la presente invención puede comprender aproximadamente

20 a 30% de glucosa

30 a 60% de galactosa

4 a 19% de arabinosa

25 2 a 6% de ácidos urónicos

y un pequeño porcentaje (1 a 10%) de otros azúcares, más particularmente

1 – 4% de ramnosa

1 – 3% de xilosa

1 – 10% de manosa

30 (% en peso).

Alternativamente un polisacárido de la presente invención puede comprender aproximadamente

25 a 29% de glucosa

35 a 47% de galactosa

14 a 15% de arabinosa

35 4 a 6% de ácidos urónicos

y un pequeño porcentaje (1 a 4%) de otros azúcares, más particularmente

2,4% de ramnosa

1,8% de xilosa

3,3% de manosa

40 (% en peso).

Un polisacárido para uso en la presente invención tiene preferiblemente un contenido de sulfato de aproximadamente 17 a 35% en peso, pero también se describe un contenido de sulfato de 17 a 30% en peso, adecuadamente, 25 a 30% en peso, adecuadamente 17 a 25% en peso, adecuadamente el polisacárido puede tener un contenido de sulfato de aproximadamente 20% en peso, adecuadamente de aproximadamente 19% en peso.

- 5 Un polisacárido para uso en la presente invención puede mostrar actividad inmunomoduladora *in Vitro*, en donde por ejemplo el polisacárido puede inhibir la actividad de la elastasa de los neutrófilos en aproximadamente un 60 a 90%, en particular 60 a 80% con respecto a los neutrófilos a los que no se les proporciona el polisacárido.

Además de ser útil terapéuticamente para el tratamiento de afecciones inflamatorias de la piel, se considera que realizaciones de los polisacáridos descritos aquí se pueden usar para el tratamiento de trastornos del sistema inmune interno, en particular afecciones inflamatorias del intestino y afecciones respiratorias, por ejemplo afecciones inflamatorias intestinales incluyendo trastornos intestinales, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, y colitis ulcerosa y afecciones respiratorias incluyendo asma, fibrosis cística, enfisema, trastorno pulmonar obstructivo crónico, síndrome de dificultad respiratoria aguda, o rinitis alérgica. El tratamiento de tales afecciones puede ser vía ingestión de un polisacárido o por inhalación del polisacárido. Se considera además que cuando un paciente tiene un trastorno del sistema inmune subyacente, pero no hay síntomas presentes, entonces un polisacárido como se describe aquí se puede proporcionar para minimizar el riesgo de síntomas.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un suplemento nutricional que comprende un polisacárido obtenible a partir de *P. capsulatus* o una cepa relacionada con *P. capsulatus* donde el polisacárido que forma gel es un heteropolímero sulfatado, de peso molecular mayor que 670kDa, que comprende principalmente unidades de glucosa, galactosa, arabinosa y ácido urónico.

Además, cuando no se requiere un beneficio terapéutico, los inventores consideran que el polisacárido puede proporcionar ventajas cosméticas útiles para los usuarios.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención es una preparación cosmética que comprende un polisacárido obtenible a partir de *Prasinococcus capsulatus* o una cepa relacionada con *P. capsulatus* donde el polisacárido que forma gel es un heteropolímero sulfatado de peso molecular mayor que 670kDa que comprende principalmente unidades de glucosa, galactosa, arabinosa y ácido urónico.

Como se apreciará, las realizaciones del polisacárido del primer aspecto de la invención se pueden usar en los aspectos segundo y tercero de la invención.

Derivados de polisacárido y su uso

30 Los inventores han determinado que los derivados del polisacárido que forma gel obtenible a partir de *Prasinococcus capsulatus* o una cepa relacionada con *P. capsulatus* donde el polisacárido que forma gel es un heteropolímero sulfatado de peso molecular mayor que 670kDa que comprende unidades de glucosa, galactosa, arabinosa y ácido urónico se pueden usar también en el tratamiento de los trastornos del sistema inmune, en particular trastornos del sistema inmune que promueven una respuesta inflamatoria.

35 De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención se proporciona un derivado (oligosacárido) de un polisacárido que forma un gel a partir de *Prasinococcus capsulatus* o una cepa relacionada con *P. capsulatus* donde el polisacárido que forma gel es un heteropolímero sulfatado de peso molecular mayor que 670kDa que comprende principalmente unidades de glucosa, galactosa, arabinosa y ácido urónico donde dicho derivado tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 2kDa a 10kda, o en el intervalo de aproximadamente 2 a 20kDa, o en el intervalo de aproximadamente 20 a 60kDa.

Como se apreciará, realizaciones del polisacárido del primer aspecto de la invención se pueden usar para formar derivados del cuarto aspecto de la invención.

45 En realizaciones un derivado puede ser un fragmento de bajo peso molecular con un peso molecular en el intervalo de 2 a 10kDa. En realizaciones un derivado puede comprender un fragmento mayor de un polisacárido con un peso molecular en el intervalo de 20 a 60kDa.

En realizaciones los fragmentos del polisacárido de bajo peso molecular de aproximadamente 2 a 10kDa pueden comprender aproximadamente

30 a 40% de glucosa

30 a 40% de galactosa

50 8 a 14% de arabinosa

7 a 11% de ácidos urónicos

y un pequeño porcentaje (1 a 10%), adecuadamente un pequeño porcentaje (1 a 4%) de otras unidades de azúcar (% en peso).

También se describen fragmentos del polisacárido de bajo peso molecular de aproximadamente 2 a 10kDa que pueden comprender aproximadamente

- 5 35% de glucosa
- 35% de galactosa
- 11% de arabinosa
- 9% de ácido urónico

10 y un pequeño porcentaje (1 a 10%), adecuadamente un pequeño porcentaje (1 a 4%) de otras unidades de azúcar (% en peso).

En realizaciones un fragmento grande del polisacárido (alrededor de 20 a 60kDa) puede comprender

- 25 a 28% de glucosa
- 35 a 55%, adecuadamente 35 a 45% de galactosa
- 8 a 17% de arabinosa, adecuadamente 15% de arabinosa

15 4 a 6% de ácido urónico

y un pequeño porcentaje (1 a 4%) de otras unidades de azúcar (% en peso).

También se describe un fragmento grande del polisacárido (alrededor de 20 a 60kDa) que puede comprender

- 25% de glucosa
- 50% de galactosa

20 15% de arabinosa

5% de ácido urónico

y un pequeño porcentaje (1 a 5%) de otras unidades de azúcar (% en peso).

También se describe un derivado de un polisacárido que puede comprender aproximadamente

8,4% de arabinosa

25 0,7% de Ramnosa

2,0% de Xilosa

2,2% de galA (ácido galacturónico)

57,9% de galactosa

24,6% de glucosa

30 3,8% de ALCA (ácido glucurónico)

en peso.

Adecuadamente, un derivado de un polisacárido como se describe aquí puede tener un contenido de sulfato de aproximadamente 20 a 30% en peso, adecuadamente de 25 a 30% en peso.

35 En realizaciones un oligosacárido derivado del polisacárido puede inhibir la liberación de elastasa de neutrófilos en aproximadamente 70 a 90%, adecuadamente en 80 a 90% con respecto a los neutrófilos a los que no se les ha proporcionado el derivado.

40 En realizaciones un derivado del polisacárido puede inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en aproximadamente un 30-40% con respecto a los neutrófilos a los que no se les ha proporcionado el derivado. En realizaciones un derivado de oligosacárido puede inhibir la expresión genética y liberación de IL-8 de queratinocitos humanos en aproximadamente un 70 a 100% con respecto a los queratinocitos a los que no se les ha proporcionado el derivado. Esta actividad es comparable a la del fármaco anticoagulante polisacárido bien caracterizado heparina,

que inhibe la liberación de la elastasa en aproximadamente un 60-75% pero que no tiene un efecto significativo sobre la producción de ROS. La actividad también es comparable con la del polisacárido de algas marinas fucoidan, que inhibe la liberación de la elastasa en aproximadamente un 70 a 90%, y la liberación de IL-8 del queratinocito en aproximadamente un 80 a 90%.

- 5 También se describe aquí un derivado de oligosacárido del polisacárido que puede inhibir la liberación de IL6 y IL17C del queratinocito humano en aproximadamente un 50-70% con respecto a los queratinocitos humanos a los que no se les ha proporcionado el derivado. También se describe aquí un derivado de oligosacárido del polisacárido que puede inhibir la liberación de interferón gamma de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) en aproximadamente un 50-70% con respecto a las PBMCs humanas a las que no se les ha proporcionado el derivado.
- 10 derivado. En realizaciones un oligosacárido puede inhibir la quimiotaxis de neutrófilos humanos en aproximadamente un 50-70% y de células (monocitos) THP-1 en aproximadamente 30-50% con respecto a los neutrófilos y monocitos a los que no se les ha proporcionado el derivado. También se describe aquí un derivado de oligosacárido del polisacárido que puede inhibir la inflamación de la piel de ratón inducida por imiquimod de una manera dependiente de la dosis con respecto a los controles en los que no se proporciona el derivado.
- 15 Por aproximadamente se entiende dentro del 1 y 20%, más particularmente dentro del 10%, todavía más particularmente dentro del 5%, incluso todavía más particularmente dentro del 2% del valor indicado.

Realizaciones de derivados de la invención pueden ser para uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune, en particular trastornos del sistema inmune que promueven una respuesta inflamatoria, más específicamente afecciones de la piel, incluyendo eczema, psoriasis y dermatitis atópica.

- 20 Realizaciones de derivados de la invención pueden ser para uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune interno, en particular afecciones inflamatorias del intestino y afecciones respiratorias, por ejemplo afecciones inflamatorias del intestino incluyendo trastornos del intestino, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, y colitis ulcerosa y afecciones respiratorias incluyendo asma, fibrosis quística, enfisema, trastorno pulmonar obstructivo crónico, síndrome de la dificultad respiratoria aguda, o rinitis alérgica.
- 25 El uso de tales derivados en tales tratamientos proporciona un aspecto adicional de la invención.

Adecuadamente los derivados pueden prepararse por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, incluyendo hidrólisis o hidrólisis enzimática de polisacáridos o por métodos de radicales libres o fotoquímicos, tales como aquellos descritos por Higashi y colaboradores (Controlled photochemical depolymerization of K5 heparosan, a bioengineered heparin precursor, Carbohydrate Polymers 86 (2011)1365-1370).

- 30 Los derivados descritos aquí pueden ser polisacáridos despolimerizados preparados por un método de radicales libres o fotoquímico.
- Los derivados descritos aquí pueden ser oligosacáridos con un contenido de sulfato de aproximadamente 25-30% en peso.
- 35 Preferiblemente un derivado de oligosacárido de la invención puede tener propiedades inmunomoduladoras equivalentes o mayores que el material polisacárido nativo de la invención.

De acuerdo con un quinto aspecto de la invención se proporciona una preparación cosmética que comprende al menos un derivado de un polisacárido a partir de *Prasinococcus capsulatus* o una cepa relacionada con *P. capsulatus* donde el polisacárido que forma gel es un heteropolímero sulfatado de peso molecular mayor que 670kDa que comprende principalmente unidades de glucosa, galactosa, arabinosa y ácido urónico donde dicho derivado tiene un peso molecular en el intervalo de 2kDa a 10kDa o en un intervalo de aproximadamente 20 a 60kDa.

- 40 En realizaciones un derivado puede ser un fragmento de bajo peso molecular con un peso molecular en el intervalo de 2 a 10kDa. En realizaciones un derivado puede comprender un fragmento grande de polisacárido con un peso molecular en el intervalo de 20 a 60kDa.
- 45 En realizaciones, se puede proporcionar una combinación de un fragmento grande de un derivado y un fragmento de peso molecular bajo.

Composiciones

- Adecuadamente un polisacárido o un derivado como se discute aquí se pueden proporcionar como parte de una composición. Tal composición puede ser adecuada para administración oral, tópica, rectal o parenteral, nasal o pulmonar (por inhalación). La composición puede ser o para aplicación tópica en la piel o para ingestión de acuerdo con el uso.

Una composición lista para usar puede estar en forma de tableta, cápsula, píldora, o como un gránulo dispersable, que puede ser, por ejemplo, suspendido en agua antes de la administración o esparcido sobre los alimentos. Una composición se puede presentar convenientemente en forma de dosis única y se puede preparar por cualquiera de

los métodos bien conocidos en la industria de la alimentación para la preparación de alimentos y suplementos alimenticios, o por métodos conocidos en la industria farmacéutica para su uso como producto farmacéutico, por ejemplo como un medicamento tópico.

5 Las composiciones para administración tópica se pueden proporcionar, por ejemplo, como un gel, crema o ungüento. Tales composiciones se pueden aplicar directamente en la piel o llevarse sobre un soporte adecuado, tal como una venda, gasa, malla o similar que se pueda aplicar en el área que se va a tratar.

10 Métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica de la fabricación de alimentos incluyen, pero no se limitan a; mezcla en seco de agentes activos y otros ingredientes en forma de polvo, secado por pulverización de emulsiones que contienen todos los componentes o uso de tecnologías de extrusión para formar sedimentos o gránulos. Alternativamente, la composición puede estar en forma de un líquido tónico.

15 Un polisacárido o derivado se puede proporcionar como una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato farmacéuticamente aceptable. El polisacárido o derivado se puede administrar solo, o en una mezcla con un portador, excipiente o diluyente farmacéutico seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y a la práctica farmacéutica estándar. Un portador farmacéutico puede ser un portador fisiológicamente aceptable, o orgánico o inorgánico, natural o sintético con el que se puede combinar el polisacárido o derivado del mismo de la presente invención para facilitar la aplicación.

Un polisacárido o derivado como se describe aquí se puede mezclar con cualquier aglutinante (s), lubricante (s), agente (s) de suspensión, agente (s) de recubrimiento, agente (s) solubilizante, portador (es), o tampón (es) estabilizante adecuado.

20 Una composición de la invención puede contener también uno o más compuestos activos adicionales seleccionados como necesarios para la condición que se está tratando. Por ejemplo una composición puede comprender un compuesto activo adicional que se dirige a vías y mecanismos distintos de los dirigidos para el producto de la invención. Esto puede proporcionar una eficacia mejorada, por ejemplo un efecto sinérgico. En realizaciones el polisacárido o derivado se puede proporcionar en combinación con la Vitamina D.

25 Preparación cosmeceútica o cosmética

Un polisacárido o derivado de la presente invención puede proporcionarse como un cosmeceútico, es decir, un producto cosmético con ingredientes biológicamente activos que pretende tener beneficios médicos o similares a los fármacos.

30 Alternativamente, un polisacárido o derivado de la presente invención se puede proporcionar como un cosmético que mejora la apariencia y la función de la piel, pero no tiene efecto clínico.

Adecuadamente, composiciones para uso como cosmeceútico o preparación cosmética se pueden proporcionar como se conoce en la técnica, incluyendo, pero no limitado a cremas para la piel, geles, sueros, lavados, enjuagues, champús, acondicionadores, mousses y similares.

35 Una preparación cosmética de la invención puede proporcionarse por ejemplo como una crema, suero, gel o ungüento para administración tópica en la piel. En realizaciones la preparación cosmética puede ser para uso en una preparación antienvjecimiento de la piel, para uso en tonificación / alisado de la piel o para alterar el color de la piel. Tales preparaciones pueden minimizar adecuadamente los efectos que se consideran relacionados con el envejecimiento tales como la apariencia visual de las arrugas, los daños solares y pueden incrementar la elasticidad de la piel. En tales composiciones cosméticas el polisacárido o derivado del mismo se puede proporcionar típicamente en combinación con un portador base o una sustancia hidratante para la piel. Adecuadamente un portador base es compatible con los otros ingredientes de la composición y no es perjudicial para el usuario del cosmético. Típicamente tales preparaciones pueden incluir además preservativos, fragancias o anti-oxidantes. Además, tales preparaciones pueden incluir agua, agentes humectantes, alcoholes, aceites, colorantes y similares.

40 En realizaciones se puede proporcionar una preparación cosmética que comprenda un polisacárido para uso en la invención. En realizaciones preferidas se puede proporcionar una preparación cosmética con un derivado como se discute aquí.

Suplemento nutricional

50 En realizaciones un suplemento nutricional de la invención puede promover un intestino sano en el sujeto que recibe el suplemento nutricional. Adecuadamente realizaciones de un suplemento nutricional pueden disminuir los cólicos o malestar en el intestino. En realizaciones se puede proporcionar un suplemento nutricional que comprenda un polisacárido para uso en la invención. En realizaciones preferidas se puede proporcionar un suplemento nutricional con un derivado como se discute aquí.

En realizaciones se puede formular un suplemento nutricional de la invención en forma de cápsulas para tomarse por vía oral. El suplemento nutricional se puede proporcionar como parte de una composición neutraceutica.

Preparación de un polisacárido

5 En realizaciones, un polisacárido para uso en la invención o derivados de tal polisacárido puede ser un polisacárido aislado a partir de una fracción celular o secretada de un cultivo de *Prasinococcus capsulatus* o una cepa relacionada con *P. capsulatus*. En realizaciones el polisacárido para uso en la invención o al menos un derivado de tal polisacárido se puede aislar a partir de la fracción celular de un cultivo de *Prasinococcus capsulatus* o una cepa relacionada con *P. capsulatus*.

En realizaciones el polisacárido para uso en la invención o al menos un derivado de tal polisacárido se puede aislar a partir de la fracción secretada de un cultivo de *Prasinococcus capsulatus* o una cepa relacionada con *P. capsulatus*.

10 En realizaciones, un cultivo de *Prasinococcus capsulatus* puede ser la cepa de algas de *Prasinococcus capsulatus* CCMP1194. Esta cepa de algas está disponible públicamente. El cultivo se puede crecer adecuadamente en un medio de cultivo de algas como se conocería en la técnica donde las modificaciones del nitrógeno, vitamina, sílice o trazas de metales proporcionados en el medio de algas pueden hacerse como sería conocido por un experto en la técnica. El medio de cultivo de algas se puede usar con una base de agua de mar o usando un agua de mar
15 sintética.

En realizaciones un medio de crecimiento f/2 se puede usar con la siguiente composición:

Soluciones madre:

Elementos de rastreo:	g/Litro	Mezcla de vitaminas	g/Litro
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4,16	Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)	0,0005
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15	Tiamina HCl (Vitamina B ₁)	0,1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01	Biotina	0,0005
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,022		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01		
25 MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,18		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,006		

30 Tal medio de cultivo es discutido por Sieburth y colaboradores, Widespread occurrence of the oceanic ultraplankter, *Prasinococcus capsulatus* (prasinophyceae), the diagnostic "golgi-deccapore complex" and the Nelsy described polysaccharide "capsulan". J. Phycol. 35, 1032-1043 (1999) y Guillard R. y Ryther J. 1962 Studies of marine planktonic diatoms. Can. J. Microbiol. 8: 229-239.

El medio adecuado puede hacerse añadiendo lo siguiente a 950 mls de agua de mar filtrada (salinidad 29-32 ppt).

Medio:	g/Litro
NaNO ₃	0,075
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,00565
35 Solución madre de los elementos de rastreo	1 mL
Solución madre de la mezcla de vitaminas	1 mL

Típicamente el pH puede ajustarse a 8,0 (2 ml de Tris-HCl 1M a pH 8 por litro de medio) y el medio se lleva a 1 litro con agua de mar. El medio puede esterilizarse en un autoclave (p.ej., 121°C, 15 mins) y almacenarse a 2-8°C.

40 Se pueden usar variaciones para el cultivo de *P. capsulatus* donde se usa el 80% de NaH₂PO₄·2H₂O indicado anteriormente, más 100 mg de glicerofosfato de sodio / litro y donde se incluye dos veces la concentración de NaNO₃ para aumentar la biomasa.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para producir el polisacárido para uso en la invención o un derivado del polisacárido donde el método comprende las etapas:

45 cultivo de microalgas, adecuadamente un cultivo de *Prasinococcus capsulatus*, en particular la cepa de algas de *Prasinococcus capsulatus* CCMP1194,

separación de la biomasa de microalgas del medio de cultivo,
 concentración y desalación del medio de cultivo y
 secado del medio de cultivo.

5 Adecuadamente, la separación de la biomasa de las microalgas del medio puede ser por centrifugación. En realizaciones alternativas la separación puede ser realizada adecuadamente por filtración, floculación, o filtración de flujo tangencial. Adecuadamente la concentración puede ser por filtración de flujo tangencial. Esto puede ser usando una membrana de 100kDa. Esto puede permitir la desalación del medio si también se lleva a cabo la diafiltración.

Adecuadamente, la separación del polisacárido del medio se puede proporcionar por precipitación, diálisis,

10 filtración de flujo tangencial y/o
 cromatografía de intercambio iónico.

En realizaciones, la separación se proporciona por cromatografía de intercambio iónico y concentración por filtración de flujo tangencial.

15 Después de la separación la fracción del medio puede secarse. El secado se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, liofilización y secado por calor, secado en estantes usando presión atmosférica reducida o vacío para secar a temperatura ambiente (20 grados centígrados), secado por pulverización, secado rotativo, o secado por centrifugación.

Adecuadamente el secado puede ser secado por pulverización de un medio concentrado y desalado.

20 Las células (sedimentos celulares) se pueden procesar también para extraer el polisacárido diana, por ejemplo el paso de extracción puede ser un paso de extracción con agua caliente o un paso de digestión enzimática u otro protocolo de extracción adecuado.

La extracción se puede llevar a cabo usando por ejemplo, interrupción a presión, molienda en un molino de bolas, sonicación, o mezclado (alta velocidad o Waring).

25 Un método preferido puede proporcionar un derivado (s) del polisacárido donde los derivados se preparan por despolimerización del polisacárido nativo por un método de radicales libres o fotoquímico, seguido de fraccionamiento usando cromatografía de exclusión de tamaño o cromatografía de flujo tangencial para producir fracciones de oligosacáridos de peso molecular definido.

Tratamiento

30 Un polisacárido, un derivado del mismo o una composición que contiene el polisacárido o un derivado del mismo pueden usarse para el tratamiento de un número de afecciones médicas. El tratamiento incluye cualquier régimen que pueda beneficiar a un animal humano o no humano. El tratamiento puede ser con respecto a una afección existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede incluir efectos curativos, de alivio o profilácticos.

35 Adecuadamente un polisacárido, un derivado del mismo o una composición que contiene el polisacárido o un derivado del mismo pueden proporcionarse como una tableta o cápsula. Adecuadamente, un polisacárido, un derivado del mismo o una composición que contiene el polisacárido o un derivado del mismo pueden administrarse en una formulación de liberación sostenida. Adecuadamente el polisacárido, un derivado del mismo o una composición que contiene el polisacárido o un derivado del mismo pueden proporcionarse como un suplemento dietético a un animal, incluyendo seres humanos, que proporcionará un beneficio protector al animal y/o se usará terapéuticamente para modular la respuesta inmune, en particular para modular la respuesta inflamatoria, del animal en particular un ser humano.

Administración

45 La invención proporciona un polisacárido para uso o un derivado de la presente invención, o una composición que contiene el mismo, para uso como un medicamento. El medicamento puede ser para uso humano o uso veterinario. Adecuadamente en uso veterinario el paciente animal puede ser un animal terrestre, más adecuadamente animales de compañía o de rendimiento. Adecuadamente un paciente puede ser un ser humano. Adecuadamente, un derivado del polisacárido o una composición que contiene el polisacárido o un derivado del mismo pueden aplicarse tópicamente al paciente, p.ej., aplicarse en la piel.

50 El producto de la presente invención se puede administrar por vía oral, tópica, rectal o parenteral, nasal o pulmonar (por inhalación). Típicamente, el médico determinará la dosis real que será la más adecuada para un paciente

individual y que variará con la edad, peso y respuesta del paciente en particular. En general, una dosis oral diaria terapéuticamente eficaz del producto de la invención es probable que oscile entre 1 y 50 mg/Kg de peso corporal del sujeto que se va a tratar, preferiblemente entre 10 y 20 mg/Kg. Las dosis anteriores son ejemplos del caso medio. Por supuesto, puede haber ejemplos individuales donde se requieran intervalos de dosis más altas o más bajas, y éstos están dentro del alcance de esta invención.

Por tanto, se describe también un método de administración del polisacárido del primer aspecto de la invención o un derivado del cuarto aspecto de la invención para el tratamiento de trastornos del sistema inmune, en particular afecciones inflamatorias, más particularmente afecciones inflamatorias de la piel, incluyendo eczema, psoriasis y dermatitis atópica y/o trastornos del sistema inmune interno, en particular afecciones inflamatorias del intestino y afecciones respiratorias, por ejemplo afecciones inflamatorias del intestino incluyendo trastornos del intestino, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, y colitis ulcerosa y afecciones respiratorias incluyendo asma, fibrosis quística, enfisema, trastorno pulmonar obstructivo crónico, síndrome de la dificultad respiratoria aguda, o rinitis alérgica donde el método comprende el proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz del polisacárido y/o derivado a un sujeto que lo necesite.

Características y realizaciones preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos mutatis mutandis, a menos que el contexto lo exija de otra manera.

Cada documento, referencia, solicitud de patente o patente citada en este texto se incorpora expresamente aquí en su totalidad por referencia, lo que significa que debe ser leído y considerado por el lector como parte de este texto. Que el documento, referencia, solicitud de patente o patente citada en el texto no se repita en este texto es simplemente por razones de concisión. La referencia al material o información citados contenidos en el texto no debería entenderse como una concesión de que el material o la información formaban parte del conocimiento general común o eran conocidos en cualquier país.

A lo largo de la memoria descriptiva, a menos que el contexto lo exija de otro modo, los términos 'comprender' o 'incluir', o variaciones como 'comprende' o 'comprendiendo', 'incluye' o 'incluyendo' se entenderá que implica la inclusión de enteros declarados o un grupo de enteros, pero no la exclusión de cualquier otro entero o grupo de enteros.

Realizaciones de la presente invención se discutirán ahora a modo de ejemplo solo con referencia a las figuras en las que:

Las figuras 1a y b ilustran cromatogramas de ejemplo de HPLC-exclusión de tamaño del polisacárido de *P. capsulatus* mostrando la pureza y el peso molecular, donde (a) es un cromatograma de un ejemplo del análisis de HPLC-exclusión de tamaño del polisacárido usando detección de índice de refracción y la muestra está por encima de la resolución de la columna Biosep 4000 (estándar superior 670kDa) y (b) es un ejemplo de los cromatogramas y gráfico del contorno del análisis de exclusión de tamaño del polisacárido usando detección de fotiodo de matriz donde la muestra está por encima de la resolución de la columna Biosep 4000 usada. La absorbancia es mínima solo a baja longitud de onda.

Las figuras 2a y b ilustran dos cromatogramas de ejemplo de HPLC-exclusión de tamaño de derivados del polisacárido *P. capsulatus* mostrando la pureza y el peso molecular basado en el uso de detección de índice de refracción, columna Diol YMC120 y los picos después de 6,5 minutos se asocian con el tampón de la fase móvil. Los lotes de ejemplo indican buena reproducibilidad del proceso y un intervalo de 1 a 8 kDa de material LMW.

Las figuras 3a, 3b, 3c y 3d ilustran cromatogramas de un ejemplo del análisis del monosacárido de los polisacáridos o derivados de polisacárido de *P. capsulatus* usando el método de metanolisis-derivatización con TMS para GC-FID, donde (a) es un cromatograma de ejemplo de los estándares de monosacáridos mezclados usados en el método de metanolisis-TMS para GC-FID con los datos tabulados a continuación; (b) es un cromatograma de ejemplo del análisis del monosacárido del polisacárido *P. capsulatus* mostrando los picos clave del monosacárido, basado en la comparación con estándares mixtos y estándar interno en relación con los datos tabulados a continuación; (c) es un cromatograma de ejemplo del análisis de monosacárido de derivados del polisacárido (fragmento grande del polisacárido 20 - 60kDa), mostrando los picos clave del monosacárido, basado en la comparación con estándares mixtos y estándar interno en relación con los datos tabulados a continuación; (d) es un cromatograma de ejemplo del análisis del monosacárido de derivados de polisacárido (fragmento pequeño de polisacárido 2 - 10kDa), mostrando los picos clave del monosacárido, basado en la comparación con estándares mixtos y estándar interno en relación con los datos tabulados a continuación.

La figura 3e ilustra una tabla de datos del ejemplo de análisis del monosacárido del polisacárido y derivados del polisacárido de *P. capsulatus* comparando el método de metanolisis para GC-FID con el método TFA-hidrólisis-HPAEC-PAD en donde las muestras repetidas de derivados polisacáridos pequeños (2 - 10kDa) y el polisacárido nativo HMW representan preparaciones diferentes. Los datos se muestran como % de composición de monosacárido. Ambos métodos muestran la presencia de monosacáridos similares aunque varían los porcentajes. Los datos del ejemplo del método TFA/HPAEC-PAD muestran la presencia de galactosa en todas las muestras,

aunque en porcentaje más bajo que en el método de metanolisis TMS GC-FID. Esto se puede deber a las condiciones ácidas más fuertes (TFA) usadas para la hidrólisis.

Las figuras 3f y g ilustran cromatogramas en papel de un ejemplo de polisacárido o derivados de polisacárido de *P. capsulatus* hidrolizados tratados con TFA para determinar la composición del monosacárido en donde (f) ilustra los resultados de un ejemplo de la cromatografía en papel del polisacárido hidrolizado de *P. capsulatus* procedentes del método de análisis del monosacárido TFA-HPAEC (datos mostrados en la figura 3e) ilustrando la composición del monosacárido. Cada marcador es 25 µg. Disolvente acetato de etilo:piridina:agua 8:2:1. Tinte: hidrógeno-ftalato de anilina (donde Xil=xilosa, Fuc=mucosa, Ara=arabinosa, Man=manosa, Glc=glucosa, Gal=galactosa, GalA=ácido galacturónico, Rib=ribosa, Ram=ramnosa, Samp=muestra de polisacárido de *P. capsulatus*). Los principales monosacáridos identificados en el polisacárido y derivados de polisacárido de *P. capsulatus*, apoyan los datos mostrados en las Figuras 3b-e. La figura 3g ilustra los resultados de un ejemplo de la cromatografía en papel del polisacárido hidrolizado de *P. capsulatus* procedentes del método de análisis del monosacárido TFA-HPAEC (figura 3e) ilustrando la composición del monosacárido. Cada marcador es 25 µg. Disolvente butanol:ácido acético:agua 12:3:5. Tinte: hidrógeno-ftalato de anilina (donde Xil=xilosa, Fuc=mucosa, Ara=arabinosa, Man=manosa, Glc=glucosa, Gal=galactosa, GalA=ácido galacturónico, Rib=ribosa, Ram=ramnosa, Samp=muestra de polisacárido de *P. capsulatus*). Los principales monosacáridos identificados en el polisacárido y derivados de polisacárido de *P. capsulatus*, apoyan los datos mostrados en las Figuras 3b-f.

La figura 4 ilustra un ejemplo de la estimación de peso molecular del polisacárido de *P. capsulatus* usando equilibrio de sedimentación en donde se proporciona un ejemplo del cálculo del peso molecular aproximado del polisacárido nativo de *P. capsulatus* usando técnicas de equilibrio de sedimentación. La muestra se ejecutó a 0,5 mg/ml en NaCl 0,1M. El experimento de velocidad de sedimentación se llevó a cabo para evaluar la heterogeneidad, antes del análisis de peso molecular por equilibrio de sedimentación.

El ajuste de los datos se consiguió a una velocidad de rotor de 1.400 rpm con una columna de 1 mm. Se calculó que el polisacárido nativo de *P. capsulatus* tenía un peso molecular de 38,62 Mega Daltons.

La figura 5 ilustra un cromatograma de ejemplo de exclusión de tamaño que muestra la purificación de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* después de la despolimerización por radicales libres. Se usó la purificación por cromatografía de exclusión de tamaño (Resina Superdex 30) y se desaló los derivados de polisacárido de *P. capsulatus* después de la despolimerización. La absorbancia se monitorizó a 214 nm (azul claro) (i), A_{280} (azul oscuro (ii)) (panel superior) y conductividad (verde) (iii) (panel inferior). Fracciones de 3 ml se recogieron a partir de 30 minutos, con un retardo de 3 ml entre el monitor UV y el colector de fracciones. Se pueden observar dos intervalos de tamaño amplios en los picos principales y estos se recogieron:

43 – 61 minutos = derivados de fragmentos grandes (20 – 60kDa)

61 – 81 minutos = derivados de fragmentos pequeños (2 – 10kDa)

El material que eluye después de 100 minutos (co eluyendo con el pico de la sal – verde (iii)) son monosacáridos.

La figura 6 ilustra los efectos del polisacárido de *P. capsulatus*, y derivados del polisacárido, sobre la actividad de la elastasa de neutrófilos humanos en donde se muestra un ejemplo de datos para los efectos del polisacárido de *P. capsulatus*, y derivados del polisacárido en la actividad de la elastasa de neutrófilos humanos (todas las muestras a 0,1 mg/ml). Los datos ilustran la actividad media de la elastasa \pm SD, % con respecto al control, de varios lotes de producto. El tratamiento con polisacárido de algas y derivados da lugar a una reducción de la actividad de la elastasa.

La figura 7 ilustra los efectos del polisacárido de *P. capsulatus*, y derivados de polisacárido, en la producción de ROS de neutrófilos humanos en donde se muestra un ejemplo de datos para los efectos del polisacárido de *P. capsulatus*, y derivados del polisacárido en la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) de neutrófilos humanos (todas las muestras a 0,1 mg/ml). Los datos ilustran la señal ROS media \pm SD, % con respecto al control, de varios lotes de producto. El tratamiento con polisacárido de algas y derivados dan lugar a una reducción del ROS.

La figura 8 ilustra los efectos del polisacárido de *P. capsulatus*, y derivados del polisacárido sobre la viabilidad celular BHK en donde se proporciona un ejemplo de los datos para los efectos del polisacárido de *P. capsulatus* y derivados del polisacárido sobre la viabilidad celular BHK (todas las muestras a 0,1mg/ml). Los datos ilustran la viabilidad celular media \pm SD, % con respecto al control, de varios lotes de producto. El tratamiento con polisacárido de algas y derivados no da como resultado efectos en la viabilidad celular observada.

Las figuras 9a y 9b ilustran los efectos de derivados del polisacárido de *P. capsulatus* sobre la liberación de IL8 o la expresión del gen IL8 por los queratinocitos humanos primarios después de la estimulación con 10 ng/ml de IL1beta o 10 ng/ml de TNFalfa en donde (a) es un ejemplo de los datos para los efectos del polisacárido o derivados del polisacárido de *P. capsulatus* en la liberación de IL8 desde los queratinocitos humanos primarios después de la estimulación con 10 ng/ml de IL1beta (todas las muestras a 0,1 mg/ml). Los datos ilustran el % de liberación \pm SD, con respecto al único control IL1beta. Tratamientos con fucoidan y heparina se realizan para la comparación. El tratamiento con polisacáridos da lugar a una reducción en la secreción de IL8 desde los queratinocitos; (b) Ejemplo

de los datos para los efectos de los derivados del polisacárido *P. capsulatus* en la expresión del gen IL8 por los queratinocitos humanos primarios después de la estimulación con 10 ng/ml de TNFalfa (todas las muestras a 0,1 mg/ml). Los datos ilustran el % con respecto a la expresión del gen \pm SD, usando un único control de TNFalfa como calibrador, y GAPDH como un gen de mantenimiento. El tratamiento con fucoidan se realizó para la comparación. El tratamiento con derivados del polisacárido dieron como resultado una reducción en la expresión del gen IL8 por los queratinocitos.

La figura 10 ilustra los efectos de los derivados del polisacárido *P. capsulatus* en la liberación de IL8 de los queratinocitos humanos primarios en donde se proporciona un ejemplo de los datos para los efectos de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* (2 – 10kDa) en la liberación de IL8 de los queratinocitos humanos primarios después de la estimulación con 10 ng/ml de TNFalfa, 20 ng/ml de IL17A, o una combinación de ambos. Los datos ilustran la liberación de IL8 de los queratinocitos en pg/ml para los pocillos de control (sin estimulación o solo citoquina) y los pocillos tratados con derivados de polisacárido pequeños, fucoidan, o el inhibidor de NF-kB SC-514. El tratamiento con derivados del polisacárido dieron como resultado una reducción en la secreción de IL8 de los queratinocitos.

Las figuras 11a y 11b ilustran los efectos dependientes de la dosis de los derivados del polisacárido *P. capsulatus* en la liberación de IL8, IL17C y IL6 por los queratinocitos humanos primarios en donde (a) se proporcionan los datos de un ejemplo para los efectos de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* (2 – 10kDa) en la liberación de IL8 de los queratinocitos estimulados con 10 ng/ml de TNFa & 50 ng/ml de IL17A. Los datos indican que el polisacárido inhibe la liberación de IL8 en una manera dependiente de la dosis. Tiene mayor potencia a dosis similares que el inhibidor NF-kB (SC-514), y el inhibidor MAPK p38 (SB203580). La heparina de bajo peso molecular (LMW) se muestra para la comparación; (b) los datos de un ejemplo para los efectos de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* (2 – 10kDa) en la liberación de IL17C & IL6 de queratinocitos estimulados con 10 ng/ml de TNFa & 50 ng/ml de IL17A & histamina 10 microM. Los datos indican que el polisacárido inhibe la liberación de IL17C & IL6 en una manera dependiente de la dosis. La heparina de bajo peso molecular (LMW) se muestra para la comparación.

La figura 12 ilustra los efectos dependientes de la dosis de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* en la liberación de IFNgamma por las células mononucleares de la sangre periférica humanas primarias en donde se proporciona los datos de un ejemplo para los efectos de los derivados de polisacáridos de *P. capsulatus* (2 – 10kDa) en la liberación de interferón gamma (IFNgamma) de las células mononucleares de la sangre periférica estimuladas con 10 microg/ml de fitohemaglutinina y 10 ng/ml de IL1beta. Los datos indican que el polisacárido inhibe la liberación de IFNgamma en una manera dependiente de la dosis. Este efecto varía dependiendo de la longitud del cultivo de células sanguíneas. La heparina de bajo peso molecular (LMW) se muestra para la comparación.

La figura 13 ilustra los efectos de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* sobre la quimiotaxis de neutrófilos humanos primarios en donde se proporciona los datos de un ejemplo para los efectos de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* en la quimiotaxis de neutrófilos estimulados por IL8 (todas las muestras a 0,1 mg/ml). Las unidades luminiscentes relativas \pm SD indican el número de neutrófilos migrados (que se visualizan por la señal luminiscente) en cada tratamiento, donde IL8 solo es el control. El tratamiento con derivados del polisacárido da como resultado una reducción en la quimiotaxis de neutrófilos.

La figura 14 ilustra los efectos dependientes de la dosis de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* en la quimiotaxis de THP-1 (monocito) en donde se proporciona los datos de un ejemplo para los efectos de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* (2 – 10kDa) sobre la quimiotaxis de THP-1 (línea celular de pro monocitos) estimulada por MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos). El tratamiento con el polisacárido da como resultado la reducción dependiente de la dosis de la quimiotaxis de THP1. Hay alguna variación entre las preparaciones, con los fragmentos más grandes que muestran una mayor inhibición (60-70%) aunque esto podría ser un efecto no específico.

La figura 15 ilustra el efecto dependiente de la dosis de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* sobre la inflamación de piel de ratón en donde se proporciona los datos de un ejemplo para los efectos de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* (2 – 10kDa) en la inflamación de piel de ratón inducida por imiquimod (IMQ) después de 9 días de tratamiento y dosificación del polisacárido con IMQ. La inflamación se mide anotando los parámetros histológicos que incluyen la proliferación epidérmica y de queratinocitos, y la infiltración de leucocitos. El polisacárido muestra inhibición de la inflamación de la piel en una manera dependiente de la dosis.

* denota significación estadística por ANOVA con el análisis *post hoc* de Dunnett.

La figura 16a ilustra una tabla resumen de las características de la caracterización del polisacárido o derivados del polisacárido de *P. capsulatus* de la invención.

La figura 16b ilustra el contenido calculado de sulfato de los polisacáridos de *P. capsulatus* basado en dos métodos diferentes de análisis: un ensayo de placa bioquímica para sulfato (método Terho), comparado con ICP-OES para sulfuro (seguido por una conversión matemática a sulfato). El % de sulfato detectado está en buen acuerdo entre los dos métodos, confirmando el elevado contenido de sulfato del polisacárido.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Crecimiento de los cultivos de cepas de *Prasinococcus capsulatus*

Los cultivos de las cepas de *P. capsulatus* se mantuvieron en el laboratorio a 50 o 100 mL del medio f/2, con luz continua y a temperatura ambiente (laboratorio) (intervalo durante todo el año de 18 – 28°C). Para crear los cultivos de laboratorio más grandes, el cultivo madre se inoculó inicialmente en 250 mL o 500 mL de medio f/2 y se dejó crecer hasta la fase logarítmica. 250 mL o 500 mL de los cultivos se inocularon en bombonas de policarbonato transparente de 10 o 20 litros con un tornillo de ventilación con filtros de PTFE de entrada y salida de aire, que contiene medio f/2 esterilizado en un autoclave a 116°C durante 30 minutos. El fosfato inorgánico y las trazas de metales se esterilizaron en un autoclave individualmente y se añadieron por separado al grueso del medio después de la esterilización en el autoclave.

Pueden usarse diferentes cantidades de mezclas de CO₂/aire, con diferentes niveles de iluminación y temperatura. Específicamente cultivos de 10 y 20 L se rociaron vigorosamente con aire, con iluminación continua, usando tubos fluorescentes de luz blanca a temperatura ambiente (laboratorio): 18 – 28°C intervalo de grados durante todo el año.

Alternativamente muchos sistemas de cultivo piloto diferentes y sistemas de cultivo a gran escala se podrían usar para el crecimiento de *P. capsulatus*. Específicamente un sistema de fotobio reactor de microalgas a escala piloto de 200 litros (Documento de Patente Internacional WO2011/031161 A1; Documento de Patente Noruega 320950) se usó con el medio de crecimiento f/2, aireación con aire y 1 – 2% de CO₂, y con iluminación continua (≤350 micromol/m²/seg; 7– 10 cm de trayectoria de luz) en un intervalo de temperatura entre 18 – 28°C.

Ejemplo 2 – Recolección del polisacárido del medio de cultivo.

El polisacárido se puede obtener del medio de cultivo por varias técnicas de centrifugación y filtración. Específicamente los cultivos densos de laboratorio (10-20 litros) se recolectaron y transfirieron a un recipiente de centrifugación 4x600ml de una centrífuga Heraeus Multifuge 3L-R. La centrifugación fue a 4.500 g durante 2 horas por lote. El medio de cultivo (sobrenadante) se transfirió mientras las células de las algas se sedimentaron en el recipiente de centrifugación. El sobrenadante se clarificó además por filtración a vacío (para eliminar las células residuales), usando un filtro Whatman no. 3.

Después este sobrenadante se sometió a filtración de flujo cruzado usando un Centramate de Pall con una membrana de corte de peso molecular (MWCO) de la serie T 0,1 m² 5kDa. Otras MWCO se pueden usar, siempre que estén por debajo del peso molecular del polisacárido. La muestra se volvió a filtrar a través de un filtro Whatman No. 3 después de la descongelación, antes de que circulase a través de la membrana. El retenido se recirculó hasta que se concentró a un volumen original x10. Después este se volvió a diluir al volumen original y se repitió, para asegurar que los componentes de la sal y del medio se eliminaban del filtrado. Se monitorizó la conductividad durante el proceso. La muestra retenida se recogió y se pulverizó en seco usando un Buchi Mini Spray Dryer B-290 para proporcionar polvo del polisacárido seco. Además MWCO que usan cualquier técnica apropiada se pueden usar para aislar el polisacárido diana, pero específicamente la separación usando MWCO Vivaspin 300kDa (sartorius) para la centrifugación se usó para generar una fracción de alto peso molecular.

Alternativamente muchos sistemas piloto y de gran escala diferentes se podrían usar para recolectar el polisacárido del medio de cultivo de cultivos a gran escala. Específicamente se usó una centrífuga Westphalia de pila de discos para separar cultivos de fotobio reactores de 200 litros funcionando a 20-60 litros/hora. El cultivo se bombeó directamente a la centrífuga de pila de discos desde el fotobio reactor de microalgas, con el componente del medio recogiendo en un IBC.

Después el sobrenadante se prefiltró con un filtro de 5 micras (PURTEX PX05-97/8) y se sometió a filtración de flujo cruzado usando un sistema Combi M38-H-2.25-3 (Alfa Laval), con membranas MWCO GR60P 25kDa. La muestra se concentró x10 y después se añadieron 3 volúmenes de agua (600 litros) para filtrar mediante diálisis (eliminación de sales, componentes del medio y material de bajo peso molecular). La conductividad se monitorizó todo el tiempo y se recogió la muestra retenida. El material retenido que contiene el polisacárido puede además pulverizarse en seco usando muchos sistemas diferentes de secado a gran escala. Específicamente se usó un sistema de secado por pulverización Mobile Minor (Gea Process Engineering), con una temperatura de entrada de 200°C, y una temperatura de salida de 90-99°C, por atomización de 2,3-2,7 Kg/hora y recuperación del polisacárido seco del filtro del ciclón y la bolsa.

Ejemplo 3 – Recolección del polisacárido de los sedimentos celulares.

Los sedimentos celulares que resultan de la eliminación del medio también se pueden procesar para generar el polisacárido diana. Esto se puede llevar a cabo mediante técnicas de extracción con agua caliente, digestión enzimática u otros diversos protocolos de extracción. Específicamente se transfirieron las células a tubos estériles de 50 ml y se centrifugaron durante 2h a 10.000g. El sobrenadante restante se eliminó y las células se almacenaron congeladas para una extracción y procesamiento posterior. Para el proceso, las células se pueden lisar y el producto se separa usando técnicas de extracción estándar. Específicamente las células se congelaron-descongelaron tres veces antes de la extracción. Después se mezclaron con un volumen igual de Tris-HCl pH8, se mezclaron con la

enzima alcalasa 2,5L DX (Novozyme) a una concentración de 1 vol de enzima a 100 vols de muestra, y se incubaron durante una noche a 60°C con agitación. La muestra se separó, se centrifugó a 10.000g para sedimentar los restos celulares y el sobrenadante se eliminó. El sobrenadante se dializó frente al agua usando una membrana MWCO 8kDa usando 10 lotes de volúmenes de agua con 4 cambios durante 36 horas. El sobrenadante desalado puede congelarse o secarse por pulverización para generar la muestra de polisacárido. Además MWCO que usan cualquier técnica apropiada se pueden usar para aislar el polisacárido diana, pero específicamente la separación por centrifugación que usa MWCO Vivaspin 300kDa (Sartorius) se usó para generar una fracción de alto MW.

Ejemplo 4 – Despolimerización y purificación del oligosacáridos.

El polisacárido diana de alto peso molecular se puede despolimerizar en fragmentos más pequeños usando técnicas tales como la digestión enzimática o la hidrólisis ácida. Específicamente se puede despolimerizar por la introducción de peróxido de hidrógeno en una solución caliente del polisacárido, para generar radicales libres, que atacan los enlaces glicosídicos (Rota C y colaboradores. 2005 Free radical generation during chemical depolymerization of heparin. Anal. Biochem. 344(2): 193-203. y Peti AC y colaboradores 2006 Free-radical depolymerization with metallic catalysts of an exopolysaccharide produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. Carbohydrate Polymers 64: 597-602). Las variables clave son la relación peroxide de hidrógeno a polisacárido, temperatura y control de pH. La muestra de polisacárido sólido se añadió al agua a aproximadamente 2 mg/ml, se disolvió y se calentó a 60°C en un baño de agua con agitación. La solución de sales de cobre se añadió para dar una concentración 0,01M. La muestra se ajustó a pH 7,5 usando un controlador de pH conectado a una bomba que contiene hidróxido de sodio. En este punto la reacción empieza bombeando el peróxido de hidrógeno en el recipiente a un caudal constante, p.ej., de 0,5 ml/min, con el controlador de pH ajustado para mantener el pH a 7 girando la bomba de hidróxido de sodio cuando sea necesario. Una vez que la reacción se llevó a cabo durante el periodo deseado las bombas se pararon y el pH se bajó usando ácido acético 20% (5 microL/ml de reacción), chelex 100 (Sigma) se añadió a 60 mg/ml de reacción y la reacción se mezcla en un agitador rotatorio hasta que esté clara. La reacción entera se separó del chelex y se almacenó a -20°C. Los productos se purificaron a partir de la reacción mediante el intercambio de cualquier resto de iones de cobre con iones de sodio usando cromatografía de intercambio aniónico Q-sepharose (GE) seguido por desalación/separación por cromatografía de exclusión de tamaño por Superdex 30 (GE) usando columnas preempaquetadas y un sistema Buchi Sepacore con detectores para A214, A280 y conductividad. La columna Q-sepharose se equilibró con la fase móvil Tris-HCl 50 mM pH 7,5, cloruro de sodio 50 mM, seguido de la carga de la reacción de despolimerización, y lavado durante 20-30 minutos adicionales con fase móvil todo a 10 ml/min. Después el polisacárido unido se eluyó con una solución de cloruro de sodio 5M y se recogió. El eluido se añadió en lotes de 5ml a una columna preempaquetada de exclusión de tamaño Superdex 30 a 1 ml/min con agua como fase móvil. La separación se llevó a cabo durante 120 minutos, con fracciones recogidas de 3 ml usando un colector de fracciones Pharmacia. Se identificaron las fracciones de polisacárido de diferentes intervalos de peso molecular, se combinaron y se liofilizaron. Específicamente se recogieron normalmente dos intervalos de tamaño que representan derivados de 2-10kDa y 20-60kDa pero otros tamaños se pueden recoger. Las soluciones madre de los derivados se inyectaron en una columna de HPLC de exclusión de tamaño (Biosep4000, YMC Diol300 o YMC Diol120) para confirmar el peso molecular aproximado (véase más adelante).

Ejemplo 5 – Determinación del peso molecular aproximado

El peso molecular del polisacárido o derivado del polisacárido se estimó por cromatografía de exclusión de tamaño usando un HPLC Waters Alliance (2695) con detección del índice de refracción (Waters 2410) y del fotodiode de matriz (210-380 nm) (Waters 996). Las columnas de exclusión de tamaño YMC300-Diol o Biosep4000 se equilibraron a 30-37°C con la fase móvil Tris-HCl 50mM pH7, EDTA 1mM, y NaCl 0,9% filtrada en 0,2 micras. Las columnas se equilibraron usando estándares de dextrano (Fluka: 12, 27, 50, 80, 270, 670kDa), por inyección de 20 microL en la fase móvil, funcionando a 0,5 o 1 ml/min (YMC300 o Biosep4000) con separaciones isocráticas de 10 o 15 minutos. La curva estándar se generó usando la fórmula $K_{av} = (\text{tiempo de retención} - V_0)/(V_t - V_0)$, y representando K_{av} frente al peso molecular. Las muestras se inyectaron a 20 microL de una solución de 0,1 mg/ml en la fase móvil y funcionaron según las normas. Los datos se integraron manualmente con el software Millennium de Waters, con o sin la resta de la línea base del blanco. Los tiempos de retención de la muestra se compararon con aquellos generados por la curva estándar para calcular el peso molecular aproximado usando la fórmula anterior.

Además, el peso molecular del polisacárido nativo de *P. capsulatus* se puede estimar por técnicas de equilibrio de sedimentación. Específicamente se usó el equilibrio de sedimentación usando una centrífuga analítica Beckman XL-I (AUC) equipada con óptica de absorción de barrido. Las muestras se resuspendieron a 0,5 mg/ml en cloruro de sodio 0,1M en agua. Un experimento de velocidad de sedimentación se realizó para evaluar la confirmación de la muestra y la heterogeneidad, y evaluar los parámetros necesarios para el subsiguiente equilibrio de sedimentación. El equilibrio de sedimentación se realizó a una velocidad de rotor de 1.400rpm y una columna de 1mm.

Ejemplo 6 – Determinación del contenido aproximado de sulfato.

Diversos métodos se pueden usar para determinar el contenido de sulfato del polisacárido o derivados de polisacárido diana. Específicamente la determinación del sulfato se realizó en base al método de Terho & Hartiala K (Method for the determination of sulphate content of glycosaminoglycans. Analytical Biochemistry (1971) 41 (2):471-

476). 25 µl de muestra de 1mg/ml o control (Condroitina Sigma C4384 o heparina Sigma H3393) en agua se puso en un vial de reacción. Se añadió HCl 1M para dar una concentración final de HCl 0,5-1M y los viales se calentaron a 100°C durante 2 horas. La muestra hidrolizada se evaporó por rotación usando un Speed Vac (Jouan RC10/10 con una trampa refrigerada RCT60) bajo vacío a 60-65°C hasta sequedad (normalmente 1-2 horas). El hidrolizado seco se disolvió en 250 microL de agua (0,1mg/ml).

Los estándares se prepararon a partir de ácido sulfúrico 1mM para dar concentraciones en el ensayo de 0,048, 0,096, 0,192, 0,288, 0,384, 0,432, 0,48 µg de sulfato. Se pipetearon 100 microL de cada muestra, estándar, control o blanco (solo agua) en un eppendorf, al que se añadió 400 microL de etanol y se mezclaron exhaustivamente. 125 microL de esta mezcla se añadieron por triplicado a pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos, 50 µL de tampón de BaCl₂ (recién preparado con ácido acético 0,2M, cloruro de bario 0,1mM, hidrógeno carbonato de sodio 1,6mM todo en etanol absoluto) se añadió a cada pocillo, seguido de 75 µL de solución de rodizonato de sodio (recién preparado con 0,05mg/ml, 1 mg/ml de ácido L-ascórbico en etanol absoluto). La placa se agitó a una velocidad media durante 30 segundos, se incubó en la oscuridad durante 10 minutos y se agitó otra vez. La intensidad del color se midió en un lector de microplacas de absorbancia a 520 nm usando el software Gen5. La absorbancia se calculó restando la absorbancia media para cada muestra, estándar o control de la absorbancia media del blanco. La curva estándar se generó representando la absorbancia del blanco frente a la concentración de sulfato para cada estándar de ácido sulfúrico, y se interpoló el contenido de sulfato de las muestras y los controles. Este valor se corrige para diluciones y volúmenes para dar % de sulfato = ((MediaΔA520x40)/50)x100.

La determinación del sulfato se realizó también por espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). 10 mg de polisacárido se resuspendieron en 1 ml de agua y después se extrajeron en ácido nítrico:ácido clorhídrico (agua regia). Las muestras se nebulizaron y el aerosol producido se transportó a una antorcha de plasma donde ocurrió la excitación. Los espectros característicos de la línea atómica para el azufre se produjeron por un plasma de radio frecuencia acoplado inductivamente. Los espectros se dispersaron mediante un espectrofotómetro de rejilla y las intensidades de las líneas se monitorizaron mediante tubos fotomultiplicadores. Las fotocorrientes de los tubos fotomultiplicadores se procesaron y el contenido de azufre se calculó en base a los estándares de azufre (calibración multipunto) y se convirtió al valor del sulfato por fórmula matemática.

Ejemplo 7 – Determinación de la composición del monosacárido.

La composición del monosacárido se puede determinar usando un número de métodos diferentes. Específicamente, la composición del monosacárido se determinó por metanolisis y derivatización con trimetilsilano (TMS) seguido del análisis de la composición usando un equipo Shimadzu GC-2014 con detección de ionización de llama (GC-FID). Los viales de reacción se limpiaron con calor en un horno durante 6 horas a 450°C. 100 microg de la muestra (como unos 10 mg/ml de solución) se transfirieron a un vial y 5 nmol del estándar interno escilo-inositol se añadieron a cada muestra. Un vial que contiene 5 nmol de cada estándar de monosacárido se preparó también conteniendo escilo-inositol (I8132 Sigma), arabinosa (A3131 Sigma), xilosa (X-1500 Sigma), manosa (M6020 Sigma), fucosa (F2252 Sigma), ramnosa (R3875 Sigma), galactosa (G0750 Sigma), glucosa, glucosamina (G4875), galactosamina (G0500), ácido glucurónico (G5269), galacturónico (48280 Fluka), ácido siálico (todas preparadas como las soluciones madres 100mM). Todos los viales se secaron en un Speed-vac (Joun RC10/10 con una trampa refrigerada RCT60) bajo vacío a 60-65°C hasta sequedad (normalmente 1-2 horas). Se añadieron 40 microL de metanol puro, las muestras se secaron otra vez como se indicó anteriormente y después se resuspendieron en 100 microL de HCl metanólico 0,5M. Los viales se calentaron a 85°C en un bloque de calor durante 4 horas. Después de enfriar se añadieron 20 microL de piridina pura para neutralizar el HCl y después se añadieron 20 microL de anhídrido acético puro para re-N-acetilizar cualquier amina primaria libre (durante 30 minutos a temperatura ambiente). Después los viales se secaron otra vez (speed vac como se indicó anteriormente), se añadieron 40 microL de metanol puro para lavar, los viales se re secaron (10 minutos en el speed vac como se indicó anteriormente). Después se añadieron 40 microL del reactivo de TMS puro y se mezcló exhaustivamente para resuspender la muestra. Los viales se sellaron y se dejaron durante al menos 10 minutos antes de inyectar 1 microL en el Shimadzu GC-2014 con detección de ionización de llama (inyección sin división a 300°C). La columna fue ZB5-ms, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm de espesor de película. Se analizaron los cromatogramas generados. El área cortada se ajustó manualmente para cada muestra hasta que se identificaron 20-30 picos. Las áreas de los picos y los tiempos de retención se correlacionaron con los estándares del monosacárido.

Cada pico se calculó:

Relación = área del pico/área del pico del estándar interno;

Relación estándar = área del estándar/área del estándar interno para cada estándar;

nmoles = (5nmoles/relación estándar) x relación muestra;

% de cada monosacárido presente en la muestra original = nmoles/total nmoles x 100.

La composición del monosacárido del polisacárido de *P. capsulatus* también se determinó por hidrólisis con ácido trifluoroacético (TFA) seguido de cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Las muestras del polisacárido de *P. capsulatus* y derivados se

- resuspendieron a aproximadamente 10 mg/ml en TFA 2M. Se incubaron a 120°C durante 1 hora en un bloque de calor, con agitación vigorosa después de 30 minutos. Después se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 0,5 ml de agua, se volvió a centrifugar y el lavado se combinó con el sobrenadante original. La solución recuperada se secó a vacío para eliminar el TFA y el residuo seco se resuspendió en 1 ml de agua. Una dilución 1/10 de la muestra se inyectó en una columna Dionex PA1 junto con unas series de dilución de monosacáridos, disacáridos y ácidos urónicos estándar. (Esta mezcla contenía fucosa, ramnosa, arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa, manosa, ribosa, celobiosa, maltosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico). Las muestras se separaron por gradiente y se resolvieron con PAD. La recuperación de los monosacáridos se calculó por comparación con los estándares.
- 10 10 microL de hidrolizados con TFA (nominalmente 100-160 microg de polisacárido) se cargaron también en 2 hojas de papel Whatman número 20. También se cargó la mezcla de estándares de monosacárido –ribosa, ramnosa, xilosa, fucosa, arabinosa, manosa, glucosa, galactosa, ácido galacturónico-. La cromatografía en papel se realizó mediante la ejecución de una hoja en la fase móvil butanol/ácido acético/agua 12:3:5 durante 30 horas, y la otra en la fase móvil acetato de etilo/piridina/agua 8:2:1 durante 3 días con separación por carga. Las láminas se tiñeron con hidrógeno ftalato de anilina para visualizar los monosacáridos.

Ejemplo 8 – Determinación de la citotoxicidad.

- Se pueden usar varios ensayos de cribado basados en células diferentes para determinar la citotoxicidad del material diana. Específicamente la citotoxicidad se examina midiendo los efectos del polisacárido o derivados del polisacárido sobre la actividad metabólica de una línea celular BHK (fibroblastos de riñón de hámster ECACC 85011433). El 90% de células confluentes se recogieron y se colocaron en una microplaca blanca de 96 pocillos a 1×10^4 célula/pocillo en 100 microL de medio de cultivo recién preparado (Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM), 10% de Suero Fetal de Ternera, 5% Caldo de Fosfato de Triptosa, L-Glutamina 2mM). Se dejaron durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂ para permitir una adhesión al pocillo >80%. 1,1 µL de muestra de polisacárido 1mg/ml en una solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), solo control de HBSS, control de fucoidan (1mg/ml en HBSS), controles de doxorubicina (10 µg/ml, 1 µg/ml en HBSS) se añadieron por triplicado a los pocillos y la placa se incubó durante 16-18 horas a 37°C y 5% de CO₂. Se deja que la placa adquiera la temperatura ambiente durante 30 minutos antes de adiciones de 100 µL del reactivo CellTiter-Glo (Promega). La placa se mezcla durante 2 minutos en un agitador de placas y después se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia resultante para cada pocillo se mide en un lector de placas (BioTek, Synergy 3) usando el software Gen5. Se calcula la luminiscencia media para cada muestra o control. El pocillo del control de HBSS se designa como el 100% de la actividad metabólica y los valores de luminiscencia de la muestra se calculan frente a este % de actividad = (pocillo de ensayo)/(pocillo de control)*100. Los controles de fucoidan y doxorubicina deben estar dentro de los valores establecidos.

Ejemplo 9 – Efectos sobre la actividad de la elastasa de los neutrófilos.

- Diferentes protocolos son posibles para la medida del efecto del polisacárido sobre la actividad enzimática de la elastasa de los neutrófilos. Específicamente la actividad de la elastasa se midió por incubación del polisacárido con neutrófilos humanos estimulados recién aislados seguido por reacción de la enzima liberada con un sustrato marcado y la medición colorimétrica en un lector de placas. Los neutrófilos humanos recién aislados se resuspendieron en HBSS (sin Ca y Mg) y las células se contaron en un hemocitómetro. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en HBSS para dar una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml. 22µL de muestra, controles o HBSS se añadieron a un microtubo seguido de: 25 µL de citocalasina B (a 40 mg/ml en HBSS para dar una concentración final de 5 mg/ml); 25 µL de TNF α (a 80 ng/ml en HBSS para dar una concentración final de 10 ng/ml, con 25 µL de HBSS usados en lugar de TNF α para un control no estimulado); 150 µL de suspensión de neutrófilos (o para un grupo de control solo de medios añadir 150 µL de HBSS en lugar de células). Los contenidos se mezclaron suavemente y los tubos se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Después de la incubación se añadieron 25 µL de fMLP (a 1 µg/ml en HBSS para dar una concentración final de 100 ng/ml), o HBSS al grupo de control no estimulado. Los tubos se incubaron durante 45 minutos adicionales a 37°C. Los tubos se centrifugaron a 500rpm durante 5 minutos en un biofuge de Heraeus para sedimentar las células y se transfirieron 25 µL de sobrenadante a pocillos por triplicado en una microplaca negra de 96 pocillos. Se añadió a cada pocillo 150 µL de Tris HCl pH 7,5 y 20 µL de sustrato 1 de elastasa de neutrófilos (0,5 mg/ml en Tris HCl pH 7,5), excepto para un pocillo en blanco que no contiene sustrato. La placa se transfirió a un lector de placas precalentado (37°C) (BioTek Powerwave HT) y las lecturas se tomaron a 405 nm cada 5 minutos durante 1 hora usando el software Gen5. Vmax se calculó sobre 4 puntos de datos entre 10 minutos y 1 hora. Vmax media se calculó para cada muestra, control o blanco. El pocillo control (sustrato con células estimuladas, pero sin muestras de ensayo) Vmax se designó como el 100% y las muestras y controles se calcularon frente a éste para generar el % de actividad de la elastasa: % actividad = (Vmax del pocillo de ensayo/Vmax del pocillo control)*100.

Ejemplo 10 – Efectos sobre la liberación y expresión genética de citoquinas de queratinocitos.

- Los efectos de polisacáridos y derivados de polisacárido en las células de queratinocitos pueden evaluarse usando un intervalo de líneas celulares diferentes o células primarias, en varios medios de crecimiento diferentes con o sin estímulos pro inflamatorios. La liberación de la citoquina resultante se puede evaluar por diferentes métodos tales

como matrices multiplex o de ELISA. Específicamente queratinocitos primarios (Promocell C12003) se cultivaron en un medio de crecimiento de queratinocito completo con calcio y suplementos (Promocell C20011) a 37°C, 5% de CO₂ hasta 70-90% de confluencia. Se cosecharon por tripsinización, se lavaron y se sembraron en los pocillos de una placa de cultivo de tejido de una placa de 24 pocillos a 30.000 células por pocillo. Las células se cultivaron hasta ~ 80-90% de confluencia (~ 56 horas) y el medio se cambió después a medio basal (Promocell C20211) con calcio 0,5 mM, durante otras 16-18 horas. Las muestras (1 mg/ml en HBSS), controles (fucoidan 1mg/ml en HBSS) o blancos (solo el vehículo HBSS) se añadieron a los pocillos (x10 dilución) durante 6-8 horas antes de la adición del estímulo pro inflamatorio, o 1-2 horas en el caso de SC514 y SB203580 (inhibidor NfκB y MAPK p38 respectivamente). El estímulo pro inflamatorio fue o 10 ng/ml de TNF alfa o 10 ng/ml IL1beta o 20 ng/ml IL17A, o ambos 10 ng/ml de TNF alfa y 20 ng/ml IL17 en combinación. Otros estímulos fueron 10 ng/ml TNF alfa y 50 ng/ml IL17 en combinación, o 10 ng/ml TNF alfa, 50 ng/ml IL17 e histamina 10μM en combinación. Las células fueron incubadas durante 16-18 horas adicionales en cuyo punto se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80°C. Durante la recolección el sobrenadante se reemplazó con PBS para lavar las células y después éste se reemplazó con 350 μL con tampón de lisis RNeasy (Qiagen). El tampón, las células lisadas y el contenido celular se transfirieron a tubos para el almacenamiento a -80°C.

El sobrenadante recogido se analizó para el contenido de IL8, IL6 o IL17C humano mediante ELISA (Preprotech para IL8 y IL6; R y D Systems para IL17C). El ensayo se leyó en un lector de microplacas (BioTek Powewave HT usando software Gen5) a 450-630 nm, y la cuantificación se hizo por la lectura de la curva estándar. La concentración de citoquina en el control no estimulado se sustrajo de las concentraciones en los pocillos de ensayo y se estimuló el pocillo control. El pocillo control estimulado se designó como 100% de secreción de IL8 y las muestras se calcularon frente a este % de secreción = (pocillo de ensayo corregido pg/ml/pocillo de control corregido pg/ml)*100.

El RNA se extrajo del lisado celular usando un kit Quiagen RNeasy Plus. El RNA resultante se cuantificó en un espectrofotómetro para comprobar su intervalo de concentración. El cDNA se generó usando un kit Qiagen Quantitect Reverse Transcription (el volumen inicial de RNA es de 4 μL) con eliminación del DNA genómico por digestión enzimática, antes de la etapa RT. El cDNA se añadió a una reacción PCR (1 o 2 microl) que contiene cebadores para o IL8 (Qiagen) o GAPDH (Qiagen) como genes de limpieza, y Qiagen QuantiFast SYBR PCR como mezcla principal (25 μL de volumen de reacción). PCR se llevó a cabo en una máquina de PCR en tiempo real Mx3005P (Stratagene) usando ajustes estándar (recocido y extensión a 60°C, 40 ciclos). Se obtuvieron los valores del umbral del ciclo (Ct) para las muestras de ensayo y control usando un software MxPro. La expresión relativa de los genes diana se evaluó por comparación con el gen diana y el gen de limpieza (expresión comparativa mediante el método ΔΔCT, con la PCR del gen diana y gen de limpieza mostrando eficacias de amplificación comparables), y con el cDNA del pocillo de control estimulado designado como muestra de calibrador (100% de expresión genética).

Ejemplo 11 – Efectos sobre la liberación de citoquina desde las células mononucleares de la sangre periférica humana estimulada (PBMC's).

Los efectos de las sustancias sobre la liberación de citoquinas desde PBMC's se puede medir usando muchos formatos, estímulos y duraciones celulares diferentes. Específicamente los efectos de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* se midieron por incubación con PBMC's aisladas. PBMC's se aislaron desde la sangre fresca por centrifugación con gradiente usando histopaque (Sigma), se lavaron en medio de HBSS modificado (PAA), y se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo (PAA). Se añadieron 200.000 PBMC's a una placa de polipropileno de 96 pocillos, junto con controles solo de medios. Los polisacáridos a las concentraciones seleccionadas, junto con controles SC514 y SB203580 (inhibidores NfκB y MAPK p38 respectivamente) se añadieron a las células y se incubaron durante 1 hora a 37°C, 5% CO₂. Fitohemaglutinina (PHA) (10μg/ml) y IL1beta (10 ng/ml) se añadieron a cada pocillo excepto para los controles no estimulados y las placas se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 2 o 3 días. Para recoger el medio, las placas se centrifugaron a 1.000 rpm y el sobrenadante se transfirió a otra placa para el almacenamiento a -80°C, antes del análisis de la citoquina. El sobrenadante recogido se analizó para el contenido en interferon gamma (IFNγ) mediante ELISA (Peprotech). El ensayo se leyó en un lector de microplaca (BioTek PoweWave HT usando software Gen5) a 450-630 nm y la cuantificación se llevó a cabo por la lectura de la curva estándar. La concentración de citoquina en el control no estimulado se sustrajo de las concentraciones en los pocillos de ensayo y se estimuló el pocillo control. El pocillo control estimulado se designó como 100% de secreción de IFNγ y las muestras se calcularon frente a este control = (pocillo de ensayo corregido pg/ml/pocillo de control corregido pg/ml)*100.

Ejemplo 12 – Efectos sobre la explosión oxidativa de los neutrófilos.

Hay numerosos protocolos para medir la producción de especies reactivas de oxígeno desde células inmunes, usando diferentes células, estímulos y sustratos. Específicamente la inhibición de la explosión oxidativa por el polisacárido o derivados del polisacárido se midió usando neutrófilos humanos, que se tiñeron con el reactivo DCFH-DA. Los neutrófilos humanos recién aislados se resuspendieron en HBSS (sin Ca y Mg) y las células se contaron en un hemocitómetro. Las células se resuspendieron a 1x10⁶ en HBSS, se mezclaron con un volumen igual de DCFH-AD a 40 μM en HBSS y se incubaron durante 30 minutos a 37°C, 5% CO₂. Se añadieron 100 μL de las células teñidas a cada pocillo de una microplaca negra de 96 pocillos, aparte de los pocillos triplicados del blanco (solo HBSS) y el control de células sin teñir. 20 μL de 1 mg/ml de muestras, HBSS o controles (cloruro de difenileno (DPI) concentración 1 μM en HBSS), se añadieron a los pocillos triplicados que contienen células marcadas. Las

células se estimularon para producir ROS por adición de 50 μ L de PMA (4 nM en HBSS), excepto para los pocillos de control no estimulados. La fluorescencia generada por la oxidación de DCFH-AD por ROS se midió en un lector de placas fluorescentes (Biotek Synergy 3) a 37°C, lectura cinética 485/528 nm cada 10 minutos durante 2,5 horas. La fluorescencia media se calcula y se borra. Los datos de fluorescencia media para las células estimuladas con PMA se designaron como 100% de respuesta y las muestras y controles se evaluaron frente a estos: % de explosión oxidativa = (fluorescencia de la muestra/fluorescencia de las células estimuladas con PMA)*100.

Ejemplo 13 – Efectos sobre la quimiotaxis de las células sanguíneas.

El ensayo de quimiotaxis se puede llevar a cabo usando diferentes tipos de células inmunes, con diferentes agentes quimiotácticos. Específicamente se midió los efectos del polisacárido o derivados del polisacárido en la quimiotaxis de neutrófilos. Los neutrófilos humanos se aíslan de la sangre fresca usando Histopaque. 90 μ L de neutrófilos recién aislados a $2,5 \times 10^6$ /ml en HBSS incluyendo 0,1% de BSA, HEPES 25mM (Sigma), se mezclan con 10 μ L del compuesto de ensayo (a la concentración seleccionada p.ej., 2-50 μ M) o controles de vehículo, en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de polipropileno (Greiner) y pre incubados durante 30 minutos. Mientras las células y los compuestos de ensayo se pre incuban se prepara la cámara inferior de una placa de 96 pocillos de quimiotaxis (malla de 3 micras) (Corning). IL8 (Sigma) se compone de HBSS incluyendo 0,1% de BSA, HEPES 25 mM, a dosis las requeridas (p.ej., de 0,37 ng/ml a 10 ng/ml de concentración final). Se añaden 235 μ L por cámara de ensayo inferior. Para controles negativos se usan 235 μ L de HBSS (con Ca/Mg, 0,1% de BSA, HEPES 25 mM) en lugar de IL8. La cámara de ensayo inferior es después incubada a 37°C, 5% de CO₂ durante 30-60 minutos para pre equilibrar el medio. Los pocillos superiores se transfieren después cuidadosamente a la parte inferior 75 μ L de neutrófilos de cada pocillo de la placa de pre incubación de polipropileno se añaden a un pocillo en la cámara superior de la placa de quimiotaxis. La placa entera se incuba a 37°C 5% de CO₂ durante 30 minutos.

La placa de ensayo se separa del incubador. Los contenidos de los pocillos superiores se descartan y los pocillos superiores se transfieren a una placa blanca de 96 pocillos que contienen la enzima Accutasa (Sigma) a 180 μ L por pocillo a temperatura ambiente. La placa se coloca en un agitador de placas durante 5 minutos a temperatura ambiente. La cámara superior se descarta y el número de células presentes en la placa blanca se miden usando el reactivo CellTiter-Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (véase también ejemplo 8). 100 μ L del reactivo CellTiter-Glo se añaden por pocillo de una placa de 96 pocillos de luminiscencia que contiene células de malla y Accutasa y se mezclan en un agitador de placas durante 2 minutos a temperatura ambiente y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. La señal de luminiscencia se mide en un lector de placas Synergy 2 usando el software Gen5. Los datos se suprimen frente a más células del medio solo de control y el % de migración se calcula por comparación con el control de 100% de quimiotaxis de IL8 solo.

Además, también se evaluaron los efectos de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* sobre la quimiotaxis de los monocitos, usando la línea celular pro monocítica humana THP-1 (HPA 88081201). Los derivados de polisacárido (pocillos triplicados) a concentraciones seleccionadas se mezclaron con células THP-1 a 2×10^6 /ml en medio RPMI 1640 (PAA) con HEPES 25 mM, Glutamina 2 mM y 0,1% de BSA (Sigma) en una placa de 96 pocillos de polipropileno (PP) (Greiner). También se estableció un control solo de células por triplicado. Las células y los polisacáridos se incubaron a 37°C 5% de CO₂ durante 30 minutos. 235 μ L de 10 ng/ml de proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (Peprotech) en el mismo medio se añadió a la cámara inferior de una placa de 96 pocillos de quimiotaxis de maya de 5 micras (Corning), usando un medio de ensayo como un control negativo. La placa superior se reajustó y la placa se incubó a 37°C 5% de CO₂ durante 30 minutos para pre equilibrar el medio. El ensayo se llevó a cabo transfiriendo 75 μ L de células THP-1 (~ 150.000 células) y las muestras de ensayo de la placa PP en la cámara superior de la placa de quimiotaxis que contiene MCP-1. Se tomaron precauciones para asegurar que las células estaban completamente suspendidas y mezcladas bien antes de transferirlas. La placa se incubó a 37°C 5% de CO₂ durante 120 minutos. La quimiotaxis se midió eliminando el medio de la cámara superior, transfiriendo las membranas a la placa que contiene 180 μ L de la enzima Acculasa (Sigma), agitando durante 5 minutos y descartando las membranas. 100 μ L del reactivo CellTiter-Glo (Promega – como para la quimiotaxis de neutrófilos) se añadió a los pocillos inferiores de la placa de ensayo y a la placa que contiene la Accutasa. Se agitaron durante 2 minutos, se incubaron durante 10 minutos y después 200 μ L de los contenidos de los pocillos se transfirieron a la placa blanca de 96 pocillos y la luminiscencia se midió en un lector de placas Synergy 2 (Biotek) usando el software Gen5. Los datos se suprimieron usando el medio y las células solo de control, los valores de la cámara inferior y de las muestras de Accutasa se agruparon, y % de quimiotaxis se calculó por comparación con las células solo de los pocillos de control de MCP-1 (100% quimiotaxis).

Ejemplo 14 – Efectos sobre la inflamación de la piel en ratones BALB/c tratados con imiquimod (IMQ).

Hay numerosos protocolos para evaluar los efectos de las sustancias de ensayo sobre la inflamación de la piel en modelos de ratones, usando diferentes tipos de ratones, inductores genéticos y estímulos externos. Específicamente los efectos de los derivados del polisacárido de *P. capsulatus* sobre la inflamación de la piel se evaluaron usando un modelo de ratón BALB/c inducido por IMQ. Los grupos de ensayo incluyeron un grupo de vehículo más sencillo, un solo grupo IMQ, un grupo de vehículo más IMQ, un grupo de vehículo más un polisacárido a 3 concentraciones diferentes (1, 0,1, 0,01%) y un control de ciclofosfamida (10 mg/kg en 0,5 de CMC), con 8 ratones por grupo. Los polisacáridos se disolvieron en un gel acuoso que contiene una sal de poliácido de sodio, glicerol, paraben e imidazolidinil urea (=vehículo). 500 μ L de geles de ensayo se aplicaron diariamente a las espaldas afeitadas de

los ratones, 4 horas antes a la aplicación de 50 mg de crema de IMQ (5%). Vaselina se usó en el caso del grupo de ensayo de ratones sencillos y la ciclofosfamida se dosificó oralmente una vez al día. Se realizaron observaciones de la apariencia de la piel (escalamiento, plegado, eritema) cada día para proporcionar un índice de la actividad de la enfermedad. La dosificación se repitió durante 4 días, después de los cuales 4 ratones de cada grupo se muestrearon, y después hasta el día 9 del experimento cuando se muestrearon todos los ratones restantes. Las muestras de piel de todos los ratones se fijaron en formalina, se incrustaron, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se puntuaron las diapositivas para hiperplasia del epitelio, proliferación de queratinocitos (hiperqueratosis), infiltración de leucocitos y aumento de la vascularización. Las puntuaciones se representaron frente a los agentes de ensayo para determinar los efectos del tratamiento con polisacárido comparado con los controles del vehículo más IMQ.

Aunque la invención se ha mostrado y descrito particularmente con relación a ejemplos particulares, aquellos expertos en la técnica entenderán que pueden hacerse aquí diversos cambios en la forma y en los detalles sin apartarse del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polisacárido que forma gel obtenible a partir de células de microalgas del orden *Prasinococcales* donde el polisacárido que forma gel es un heteropolímero sulfatado de peso molecular de al menos 670kDa que comprende unidades de glucosa, galactosa, arabinosa y ácido urónico para uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune.
2. Un polisacárido que forma gel de la reivindicación 1, donde el polisacárido se produce por el proceso de:
- opcionalmente, cultivar células de microalgas del orden de la familia *Prasinococcales*, y
 - extraer del medio de cultivo celular de microalgas, un polisacárido de microalgas secretado por las células del microalga.
- 10 3. El polisacárido que forma gel como se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2 para uso en el tratamiento de los trastornos del sistema inmune seleccionados de
- afecciones inflamatorias de la piel, incluyendo eczema, psoriasis y dermatitis atópica;
- afecciones inflamatorias del intestino, incluyendo síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; o
- 15 afecciones inflamatorias del sistema respiratorio incluyendo asma, fibrosis quística, enfisema, trastorno pulmonar obstructivo crónico, síndrome de dificultad respiratoria aguda, o rinitis alérgica.
4. El polisacárido que forma gel como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el polisacárido es obtenible a partir de *Prasinoderma singularis* o *Prasinococcus capsulatus*.
- 20 5. El polisacárido que forma gel como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende en peso aproximadamente
- 20 a 30% de glucosa
 - 30 a 60% de galactosa
 - 4 a 19% de arabinosa
 - 2 a 6% de ácidos urónicos y 1 a 10% de otras unidades de azúcar.
- 25 6. El polisacárido que forma gel como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el polisacárido tiene un contenido de sulfato de aproximadamente 17 a 35% en peso.
7. El polisacárido que forma gel como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el polisacárido inhibe la actividad de la elastasa de neutrófilo en neutrófilos en aproximadamente 60 a 90% en relación a los neutrófilos a los que no se les ha proporcionado el polisacárido.
- 30 8. Un derivado de polisacárido que forma gel, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicho derivado tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 2kDa a 60kDa,
- (i) donde el derivado tiene un peso molecular en el intervalo de 2kD a 10kDa, y el derivado comprende en peso aproximadamente
- 35 30 a 40% de glucosa
- 30 a 40% de galactosa
 - 8 a 14% de arabinosa
 - 7 a 11% de ácido urónico
 - y 1 a 10% de otras unidades de azúcar, o
- (ii) donde el derivado tiene un peso molecular en el intervalo de 20 a 60kDa, y el derivado comprende en peso
- 40 aproximadamente
- 25 a 28% de glucosa
 - 35 a 55% de galactosa
 - 8 a 17% de arabinosa

4-6% de ácidos urónicos

y 1 a 5% de otras unidades de azúcar.

9. Un derivado como se reivindica en la reivindicación 8, donde el derivado inhibe la liberación de elastasa de neutrófilo en aproximadamente un 70 a 90%.

5 10. Un derivado como se reivindica en la reivindicación 8 o en la reivindicación 9, donde el derivado inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno de neutrófilo en aproximadamente 30-40% en relación a los neutrófilos a los que no se les ha proporcionado el derivado.

10 11. Un derivado como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde el derivado inhibe la expresión del gen IL-8 de queratinocito humano y la liberación de IL8 en aproximadamente 70 a 100% con relación al queratinocito al que no se le ha proporcionado el derivado.

15 12. Una preparación de cosmético que comprende un polisacárido obtenible a partir del orden *Prasinococcales*, donde el polisacárido que forma gel es un heteropolímero sulfatado de peso molecular de al menos 670kDa que comprende unidades de glucosa, galactosa, arabinosa y ácido urónico o un derivado de dicho polisacárido que forma gel, donde dicho derivado tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 2kDa a 60kDa, preferiblemente (i) donde el derivado tiene un peso molecular en el intervalo de 2 a 10kDa, y el derivado comprende en peso aproximadamente

30 a 40% de glucosa

30 a 40% de galactosa

8 a 14% de arabinosa

20 7 a 11% de ácido urónico

y 1 a 10% de otras unidades de azúcar, o

(ii) donde el derivado tiene un peso molecular en el intervalo de 20 a 60kDa, y el derivado comprende en peso aproximadamente

25 a 28% de glucosa

25 35 a 55% de galactosa

8 a 17% de arabinosa

4-6% de ácidos urónicos

y 1 a 5% de otras unidades de azúcares.

30 13. Un suplemento nutricional que comprende un polisacárido obtenible del orden de *Prasinococcales* donde el polisacárido que forma gel es un heteropolímero sulfatado de peso molecular de al menos 670kDa que comprende unidades de glucosa, galactosa, arabinosa y ácidos urónicos o un derivado de dicho polisacárido que forma gel donde dicho derivado tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 2kDa a 60kDa, preferiblemente (i) donde el derivado tiene un peso molecular en el intervalo de 2 a 10kDa, y el derivado comprende en peso aproximadamente

35 30 a 40% de glucosa

30 a 40% de galactosa

8 a 14% de arabinosa

7 a 11% de ácido urónico

y 1 a 10% de otras unidades de azúcar, o

40 (ii) donde el derivado tiene un peso molecular en el intervalo de 20 a 60kDa, y el derivado comprende en peso aproximadamente

25 a 28% de glucosa

35 a 55% de galactosa

8 a 17% de arabinosa

4-6% de ácidos urónicos

y 1 a 5% de otras unidades de azúcares.

14. Una composición que comprende un polisacárido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un derivado como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

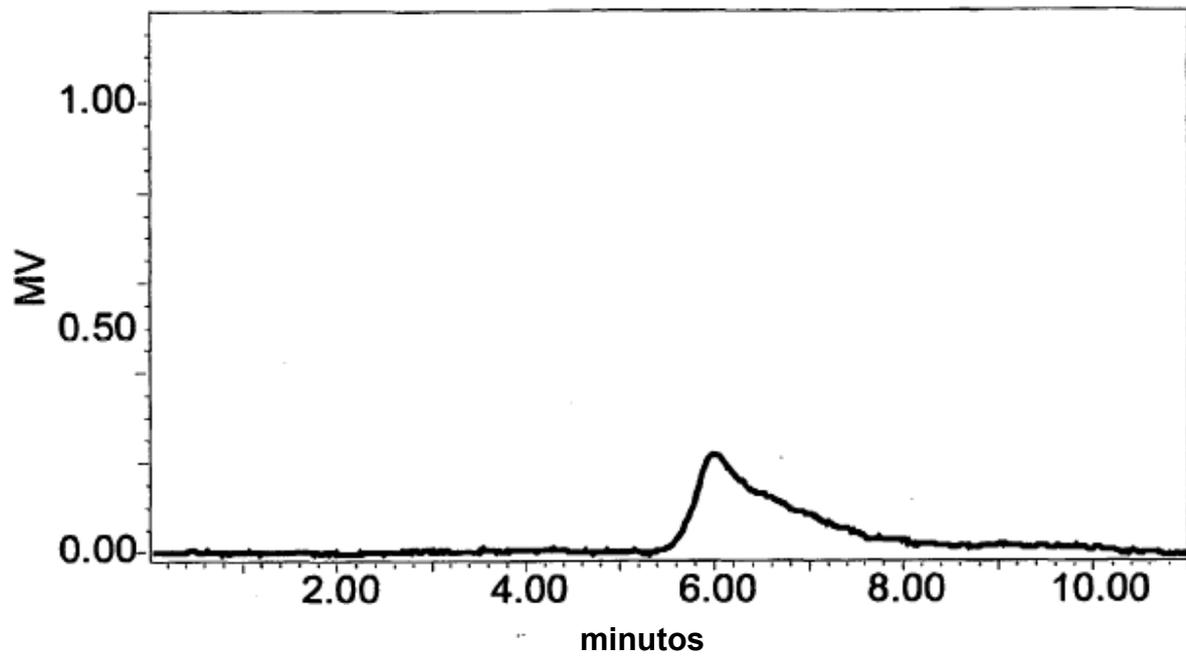
5 15. Un método para preparar un polisacárido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un derivado como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende las etapas de

- cultivar células de las microalgas del orden *Prasinococcales*, en particular *Prasinoderma singularis*, o células de *P. capsulatus*, y

- aislar el polisacárido o un derivado del mismo desde la fracción celular o secretada del cultivo.

10

Figura 1a



RT	Area	% Area	Tiempo retención	de	Tiempo inicial	Tiempo final	MW kDa	Calc./
6,0	15667	100	6,0		5,333	10,65	>670	

Figura 1b

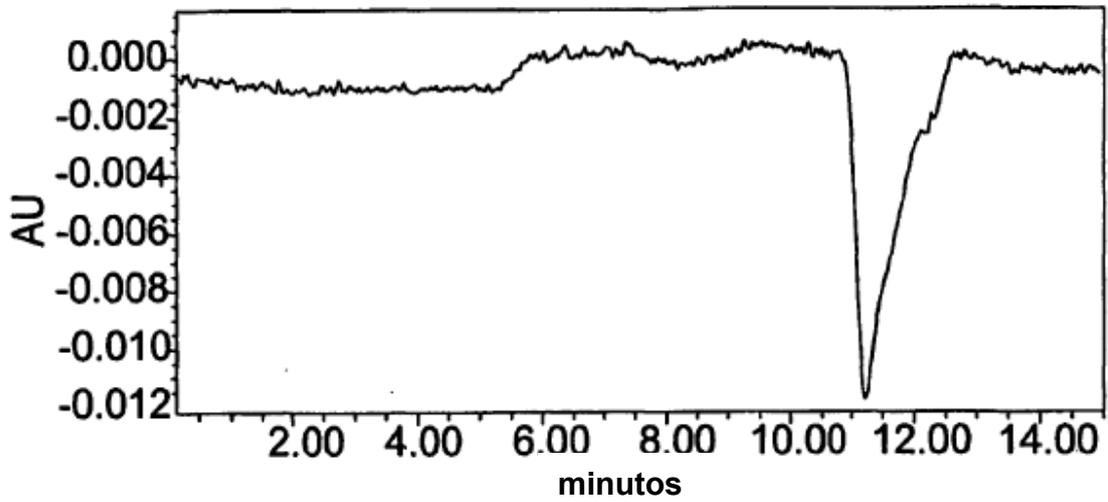
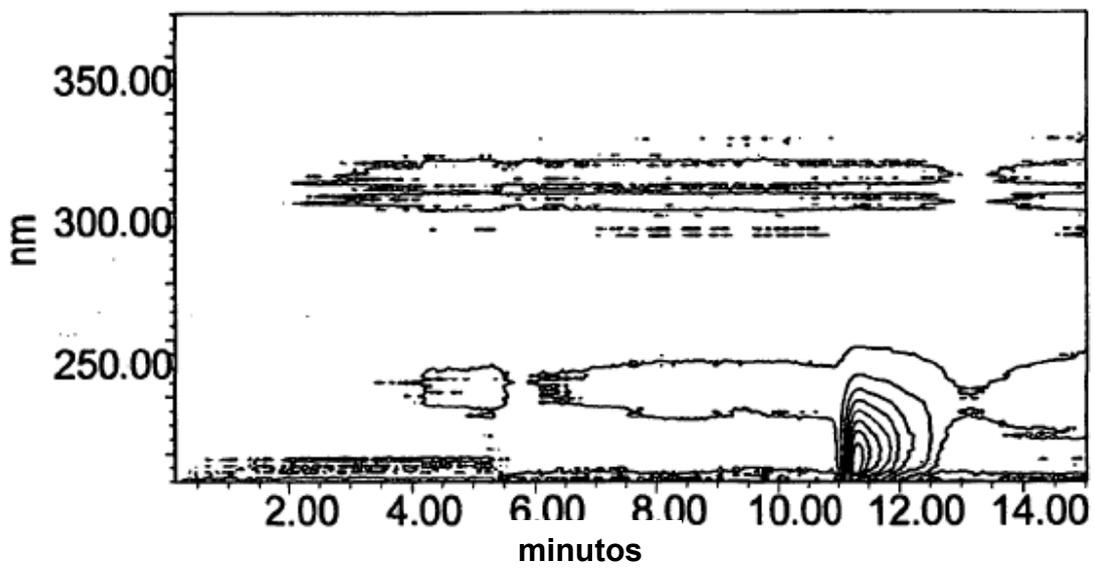


Gráfico del contorno



Cromatograma 214 nm

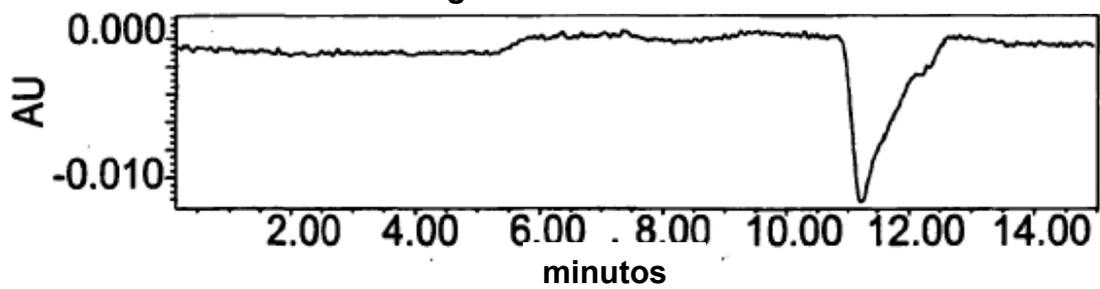


Figura 2a

Ejemplo lote 1:

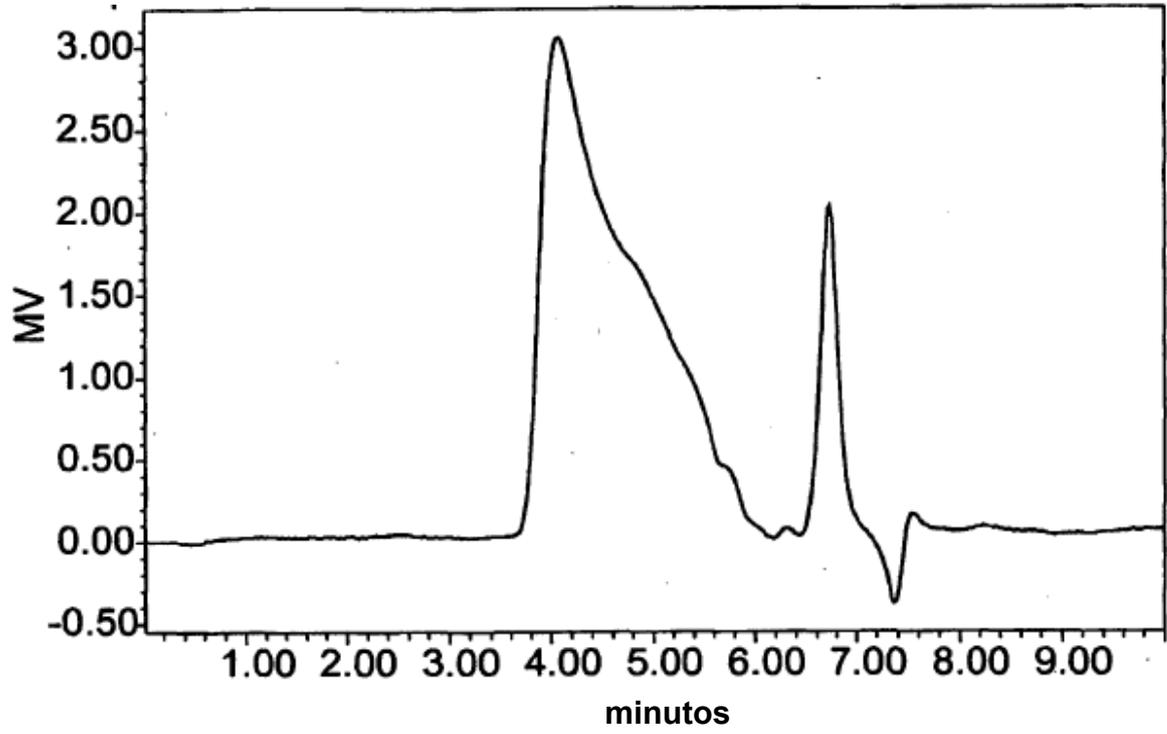


Figura 2b

Ejemplo lote 2

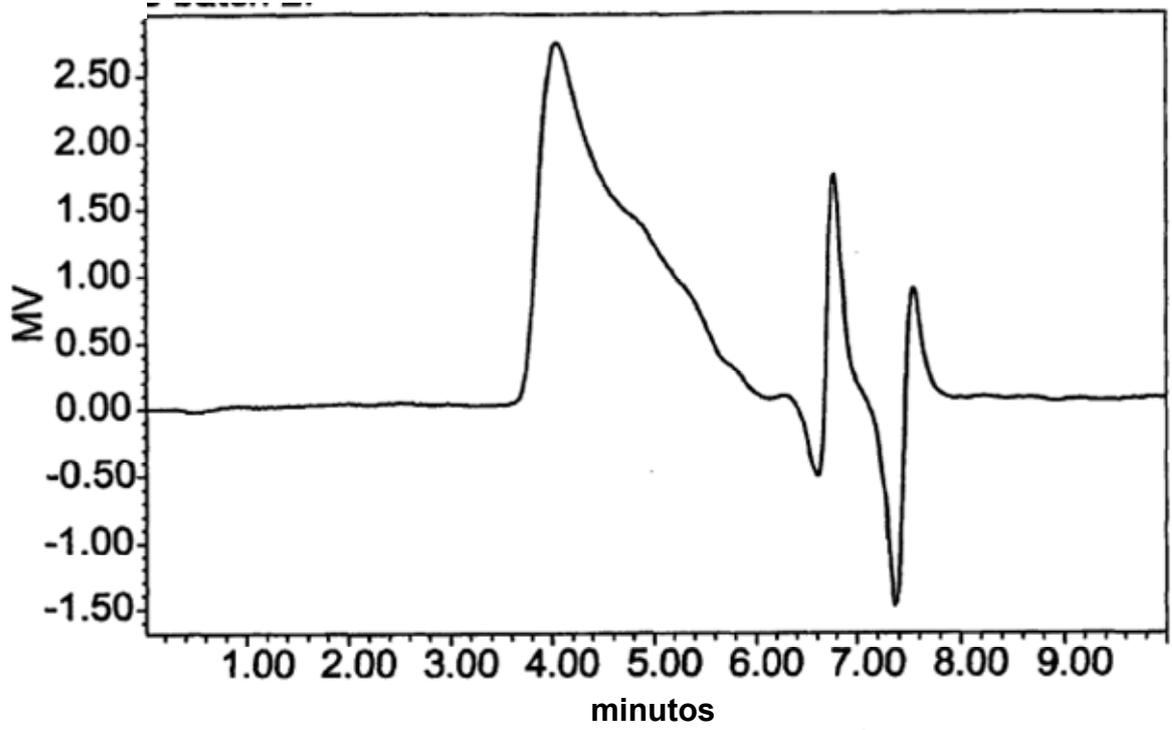
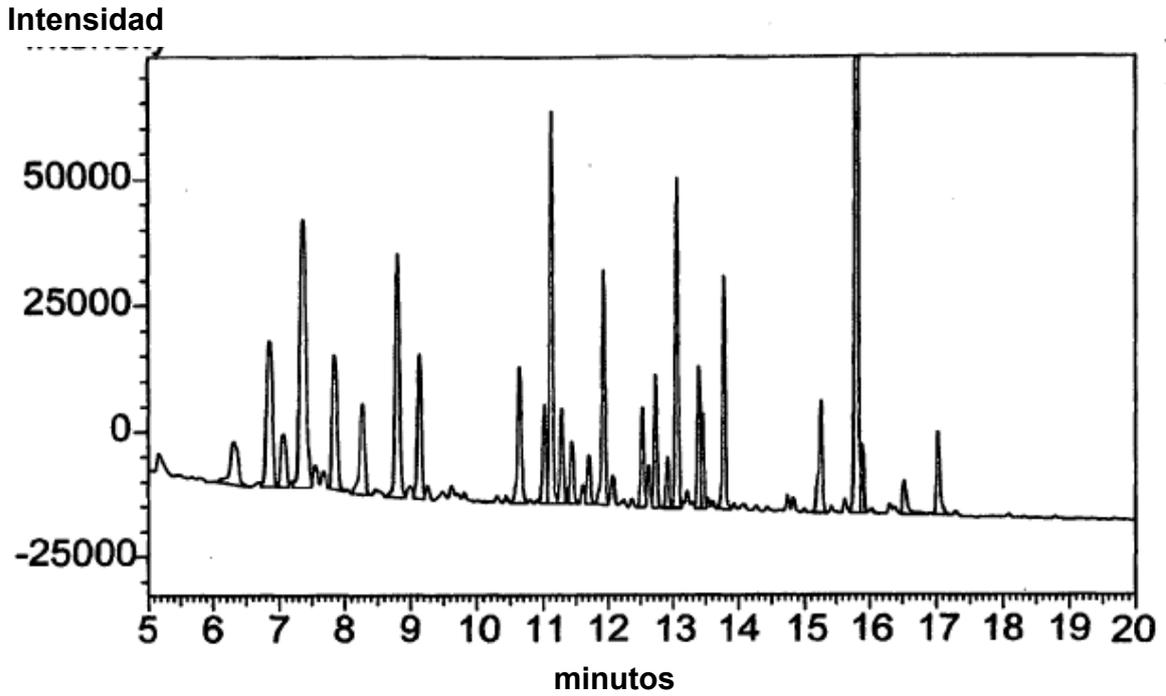
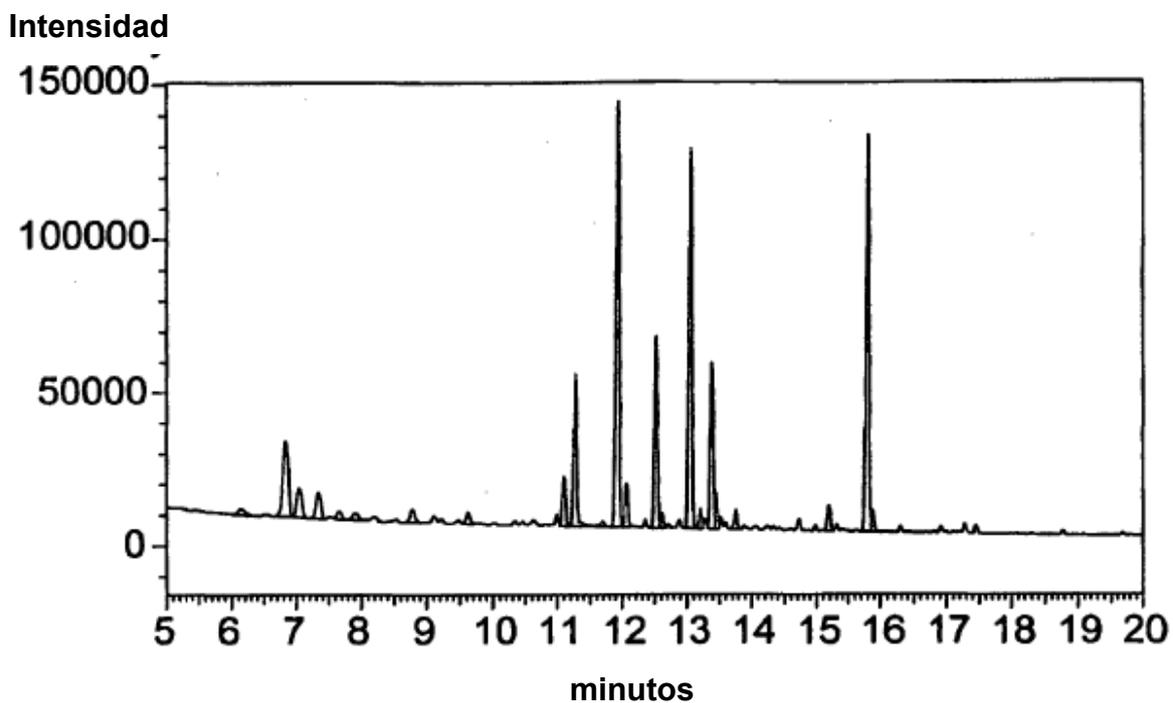


Figura 3a



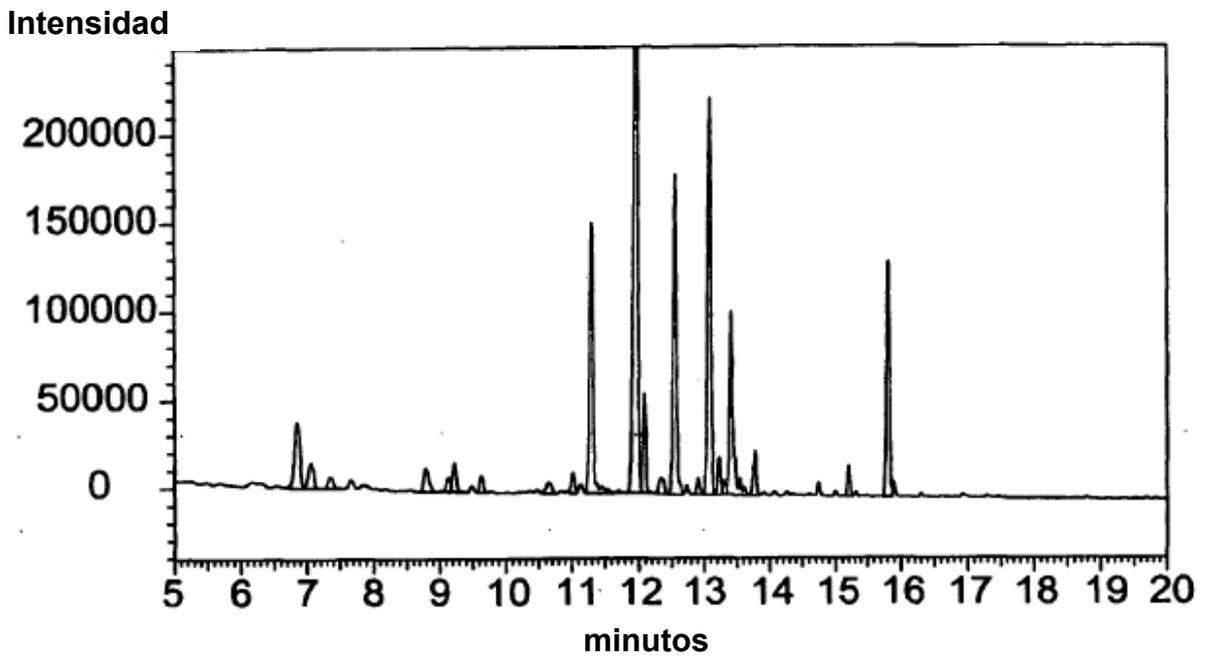
Estándares	Tiempo de retención	Área	Relación
Arabinosa	6,848	177.742,5	0,34
Ramnosa	7,368	336.084,4	0,64
Fucosa	7,847	136.171,1	0,26
Xilosa	8,803	225.926,8	0,43
GalA	10,644	105.925,6	0,20
Manosa	11,129	262.125,1	0,50
Galactosa	11,936	154.690,4	0,29
Glucosa	13,065	202.270,3	0,39
GlcA	13,778	132.357,6	0,25
Escilo inositol	15,821	524.677,6	n/a
GlcNAc	16,525	30.715,8	0,06
GalNAc	17,029	59.821,6	0,11

Figura 3b



Estándares	Relación	Relación estándar	nMoles	%
Arabinosa	0,37	0,29	6,38	14,17
Ramnosa	0,12	0,54	1,1	2,45
Fucosa		0,25	0	0
Xilosa	0,06	0,36	0,85	1,89
GalA		0,17	0	0
Manosa	0,14	0,46	1,48	3,3
Galactosa	1,14	0,27	21,12	46,92
Glucosa	0,99	0,38	12,88	28,61
ALCA	0,05	0,22	1,2	2,66
GlcNAc		0,07	0	0
GalNAc		0,1	0	0

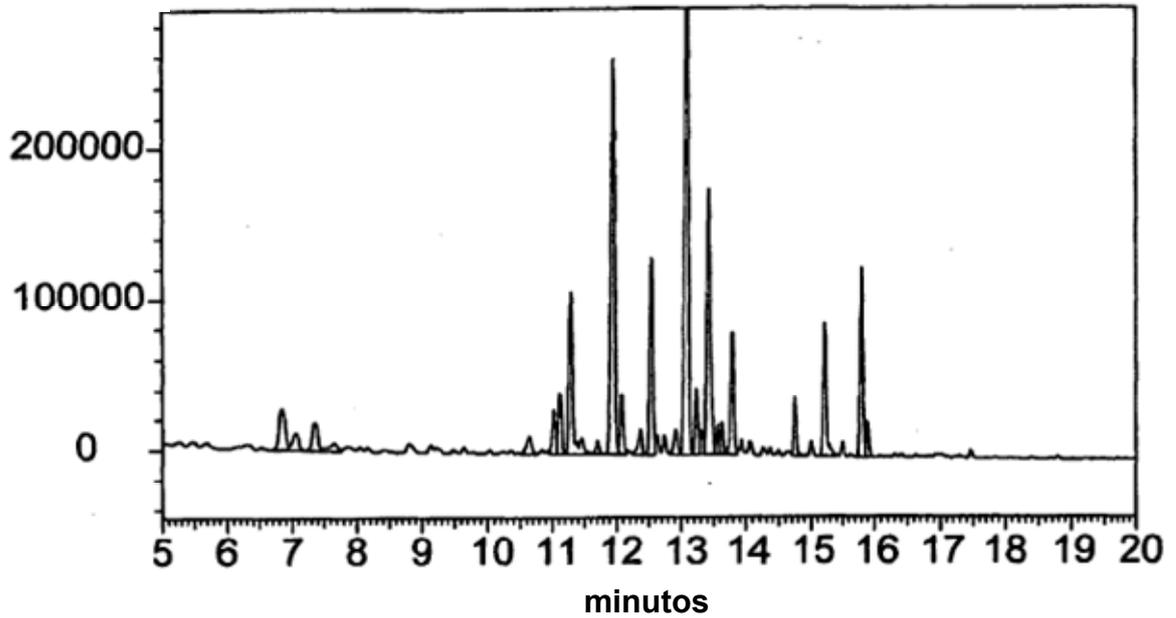
Figura 3c



Estándares	Relación	Relación estándar	nMoles	%
Arabinosa	0,56	0,34	8,26	8,47
Ramnosa	0,09	0,64	0,68	0,7
Fucosa		0,26	0	0
Xilosa	0,18	0,43	2,04	2,09
GalA	0,09	0,2	2,22	2,29
Manosa		0,5	0	0
Galactosa	3,28	0,29	56,5	57,99
Glucosa	1,87	0,39	23,97	24,6
ALCA	0,19	0,25	3,76	3,86
GlcNAc		0,06	0	0
GalNAc		0,11	0	0

Figura 3d

Intensidad



Estándares	Relación	Relación estándar	nMoles	%
Arabinosa	0,45	0,34	6,67	5,68
Ramnosa	0,29	0,64	2,26	1,92
Fucosa		0,26	0	0
Xilosa		0,43	0	0
GalA	0,18	0,2	4,58	3,89
Manosa	0,38	0,5	3,76	3,2
Galactosa	2,48	0,29	42,75	36,34
Glucosa	3,45	0,39	44,22	37,59
ALCA	0,67	0,25	13,38	11,38
GlcNAc		0,06	0	0
GalNAc		0,11	0	0

Figura 3e

	Fragmento grande de polisacárido		Fragmento pequeño de polisacárido		Fragmento pequeño de polisacárido	
	HPAEC-PAD	GC-FID	HPAEC-PAD	GC-FID	HPAEC-PAD	GC-FID
Arabinosa	2,37	10,86	2,63	5,62	3,18	6,57
Ramnosa	0,43	1,44	0,83	1,36	0,84	1,41
Fucosa	0,10	0,00	0,06	0,00	0,07	0,00
Xilosa	0,51	1,76	1,20	1,74	1,11	1,41
Ácido Galacturónico	0,93	0,00	1,29	3,24	1,28	3,22
Manosa	0,00	0,00	0,37	0,92	0,35	1,03
Galactosa	11,80	37,50	21,58	37,63	18,94	34,53
Glucosa	82,24	45,31	68,27	42,52	71,02	45,07
Ácido Glucurónico	1,00	3,12	2,88	6,97	2,50	6,76

	polisacárido de alto peso molecular		polisacárido de alto peso molecular		polisacárido de alto peso molecular	
	HPAEC-PAD	GC-FID	HPAEC-PAD	GC-FID	HPAEC-PAD	GC-FID
Arabinosa	3,61	13,79	2,31	5,25	3,51	6,80
Ramnosa	0,60	2,47	0,40	0,86	0,69	1,07
Fucosa	0,03	0,00	0,03	0,00	0,07	0,00
Xilosa	0,95	1,64	1,26	1,72	0,81	1,76
Ácido Galacturónico	0,70	0,00	0,68	1,92	0,78	0,00
Manosa	0,59	2,37	0,34	0,97	0,43	0,93
Galactosa	33,70	47,26	34,22	64,63	33,26	58,75
Glucosa	57,68	29,62	58,75	21,71	57,75	26,68
Ácido Glucurónico	1,77	2,86	1,66	2,93	2,39	4,01

Figura 3f

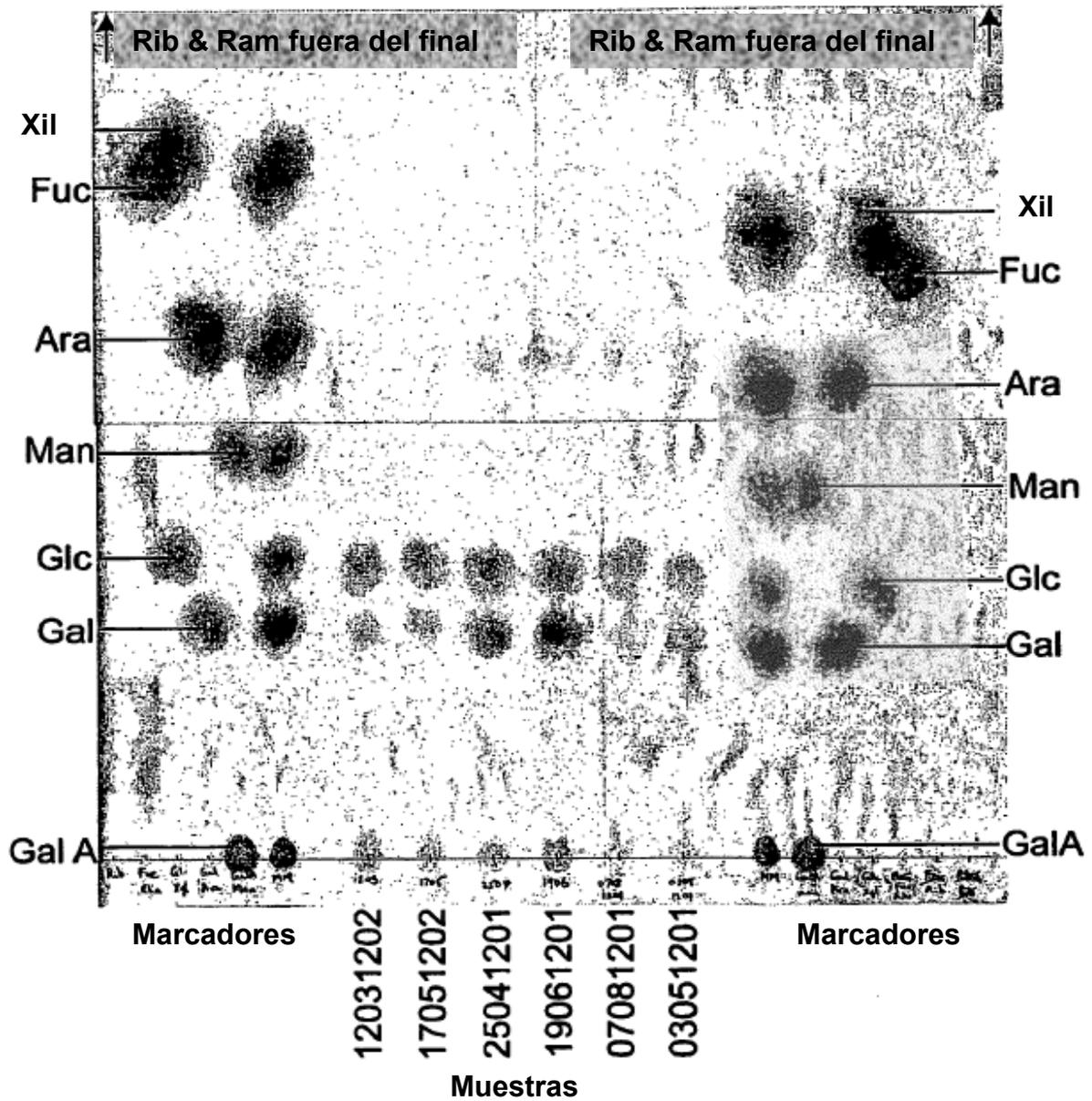


Figura 3g

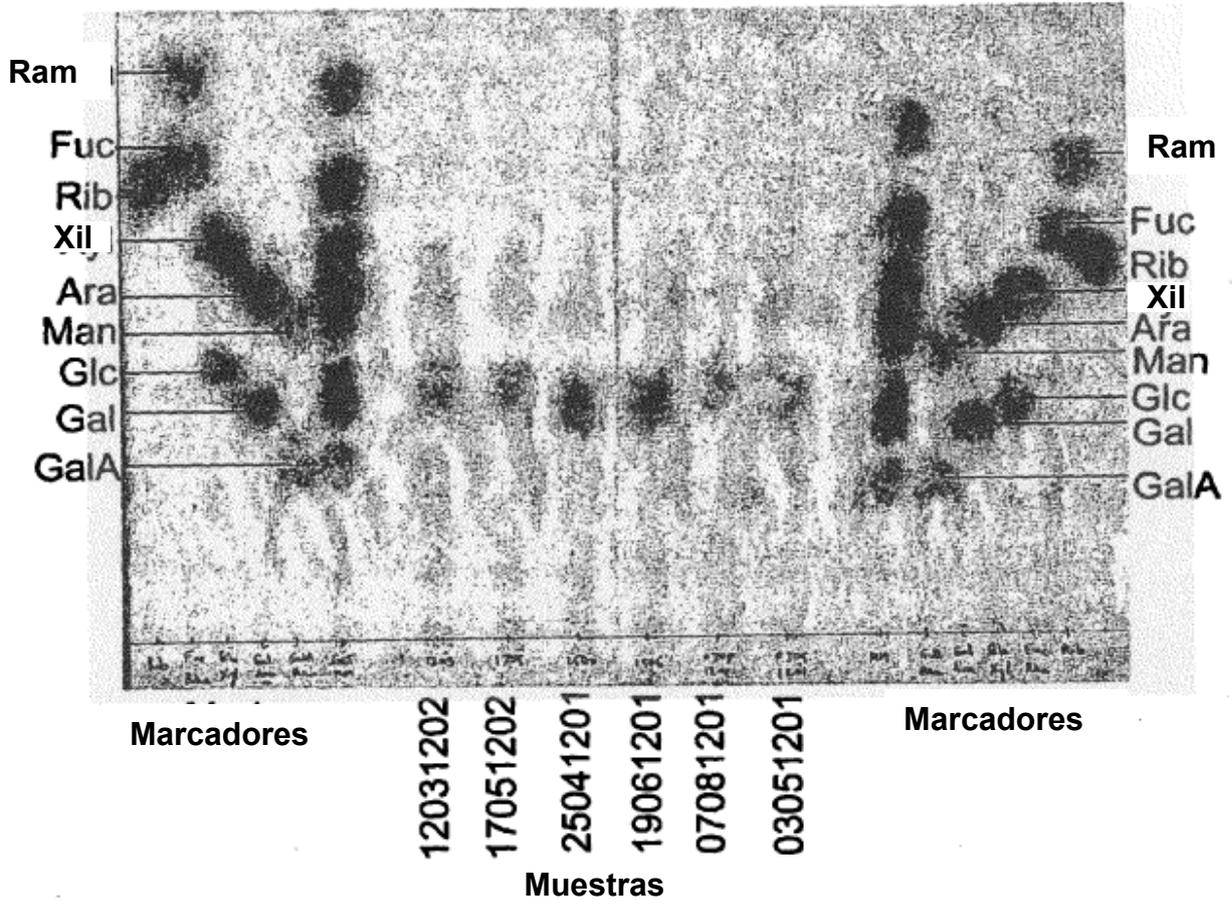
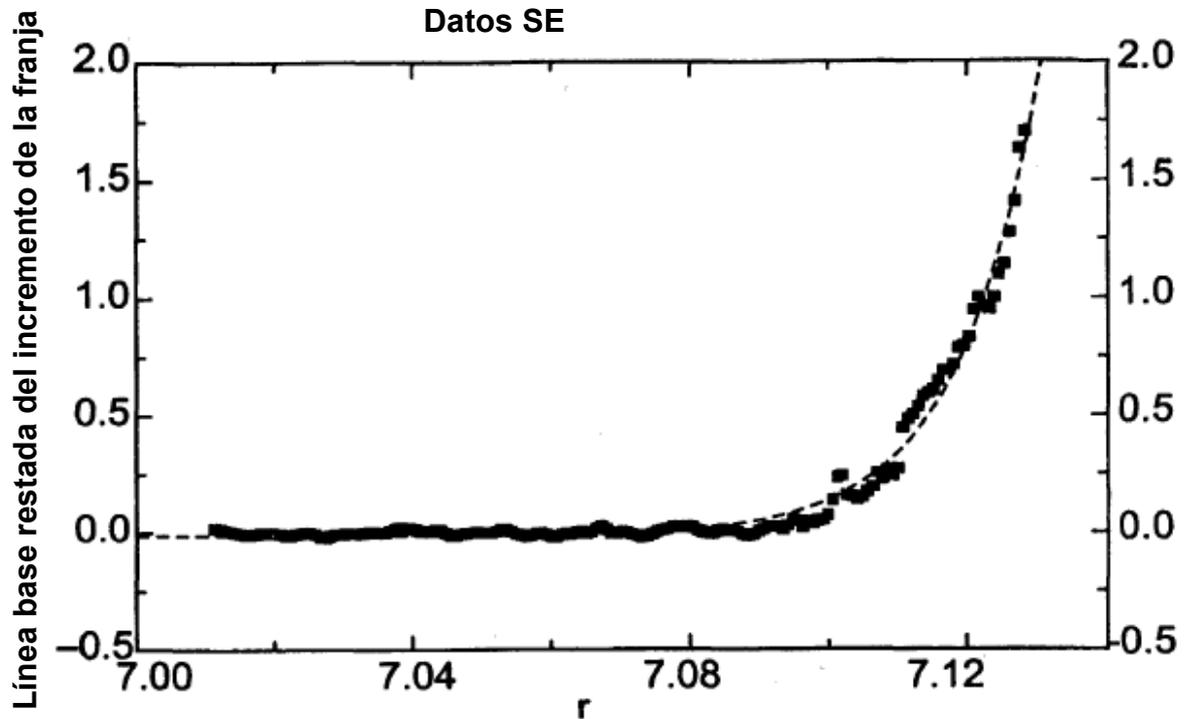


Figura 4



Chi cuadrado = 0.2930

Parámetros

ci = 0.8165

sigma = 11.9615

ri = 7.1200

E = -1.1688e-2

Desviación estándar

Δci = 1.0079e-2

$\Delta sigma$ = 0.2458

ΔE = 4.3565e-3

M = 38.62 MDa

Figura 5

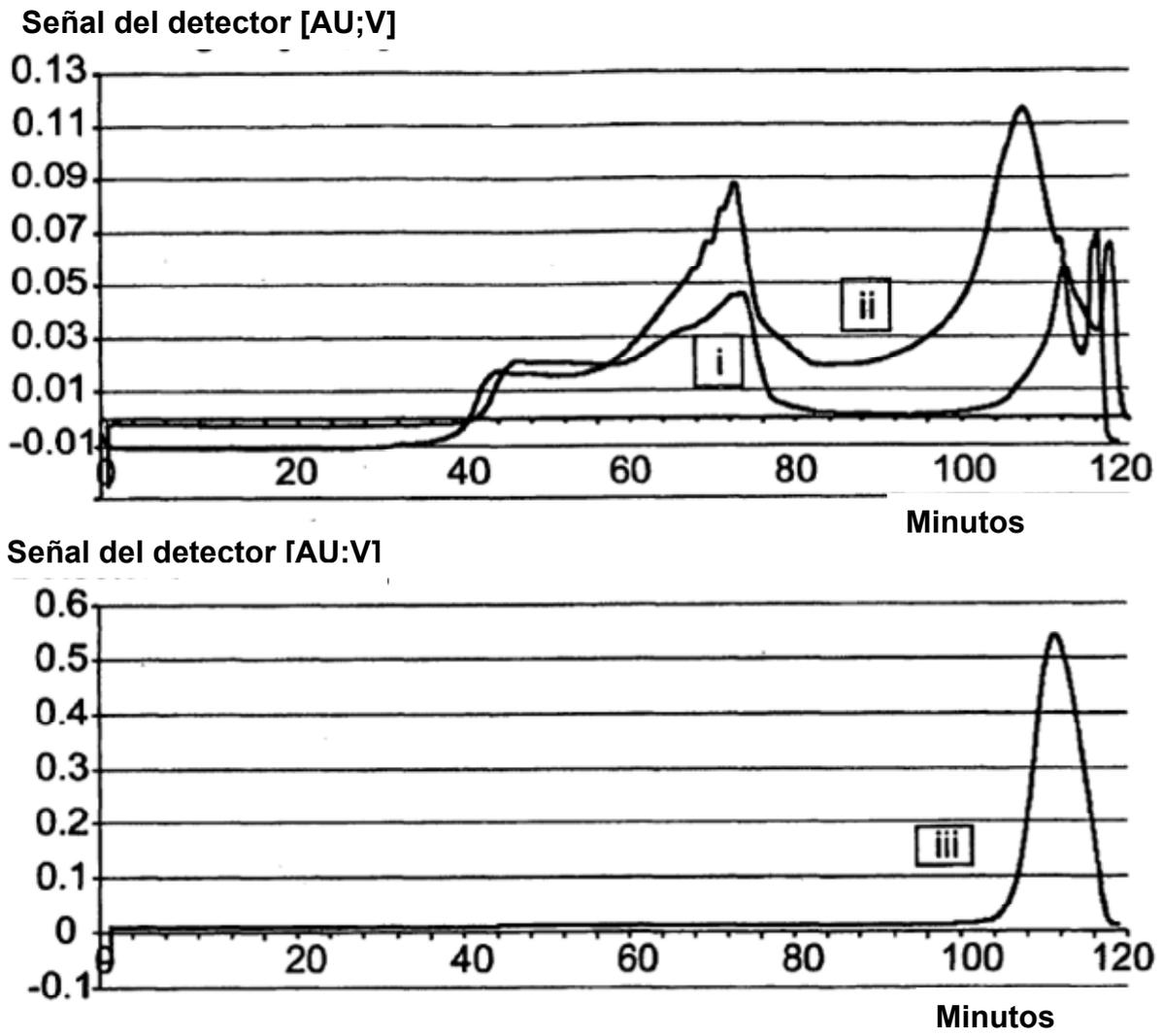


Figura 6

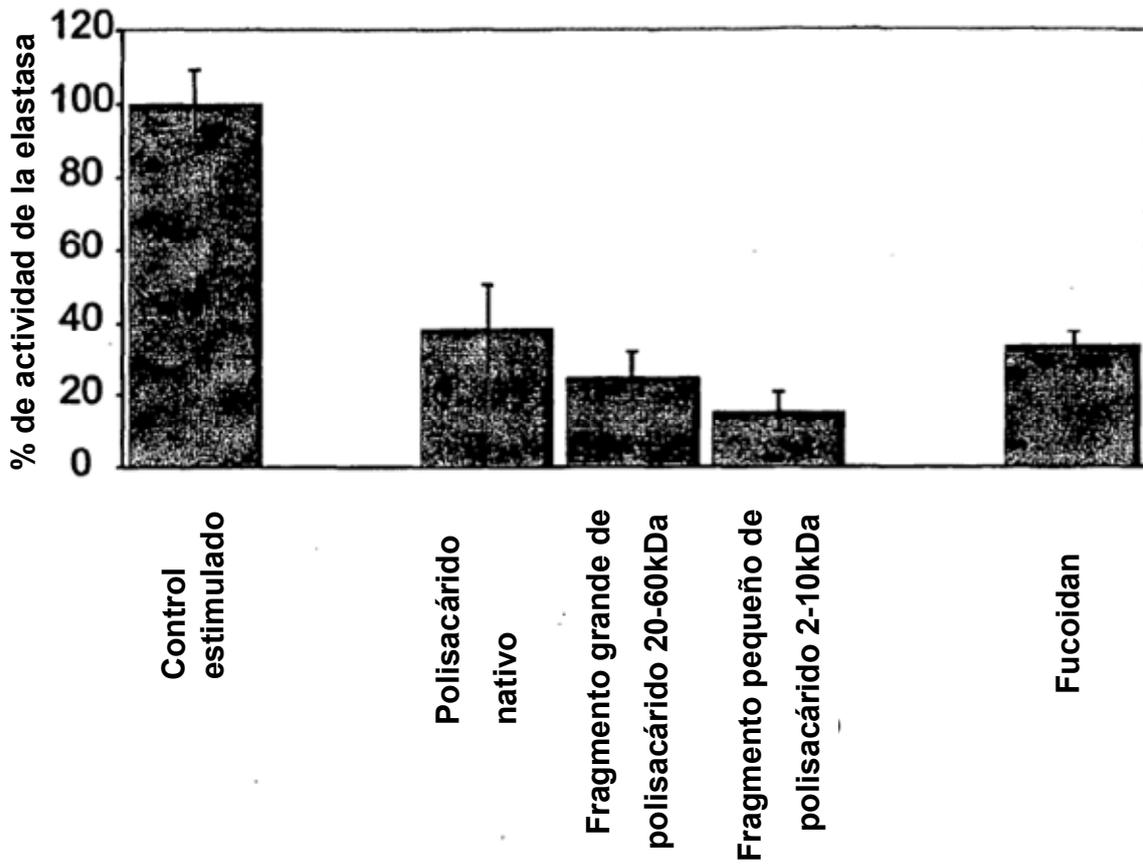


Figura 7

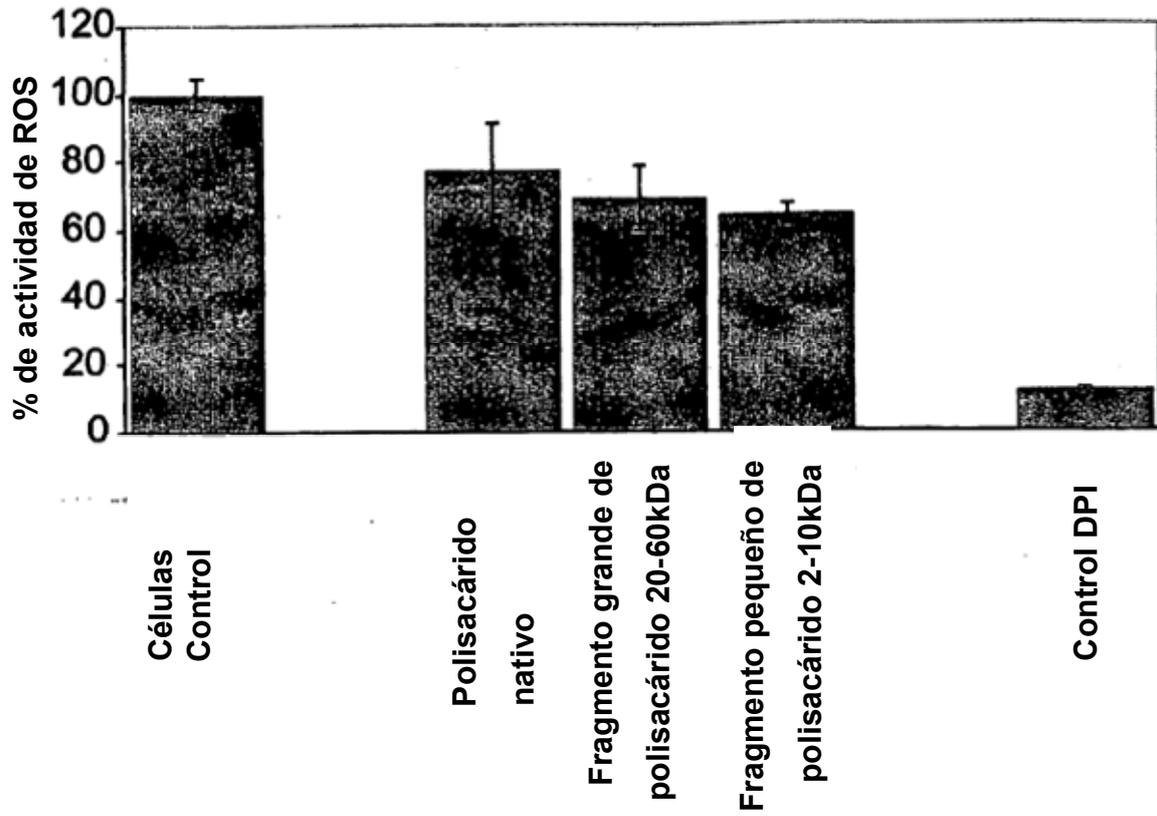


Figura 8

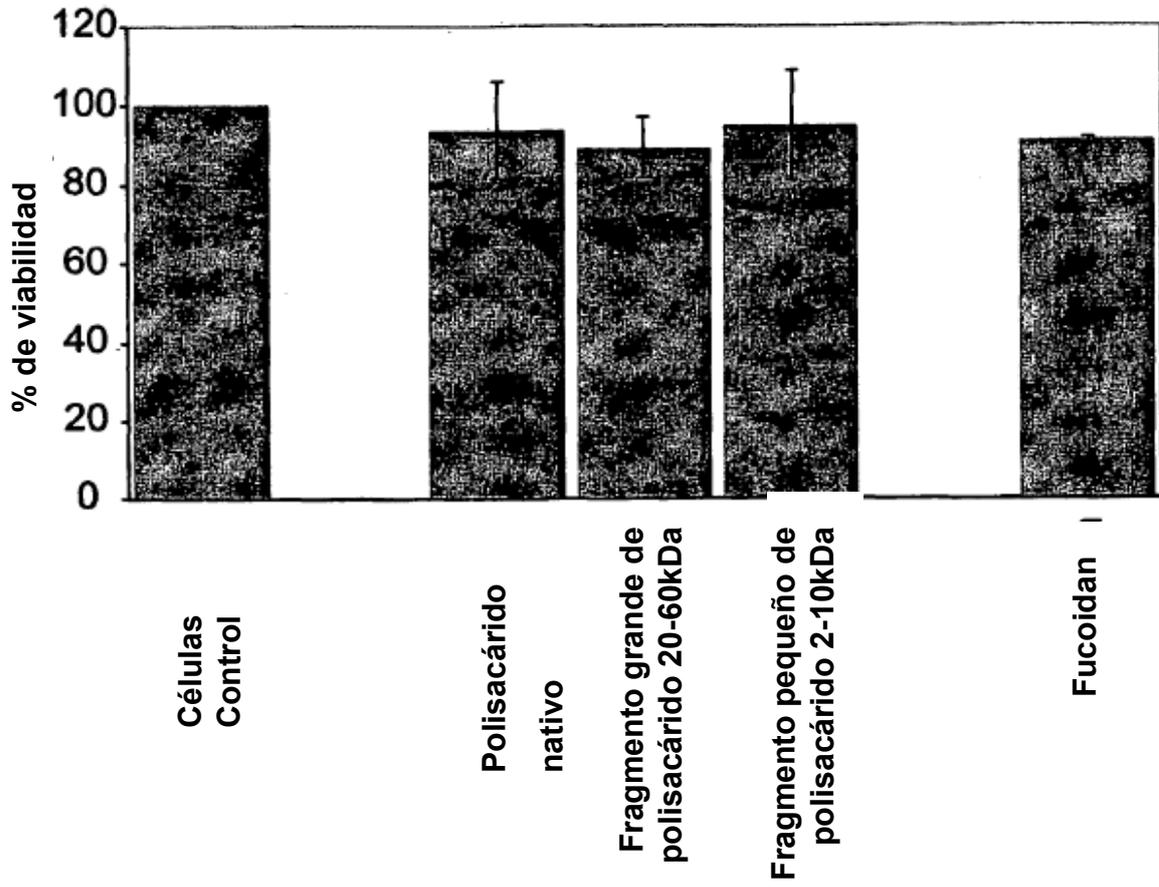


Figura 9a

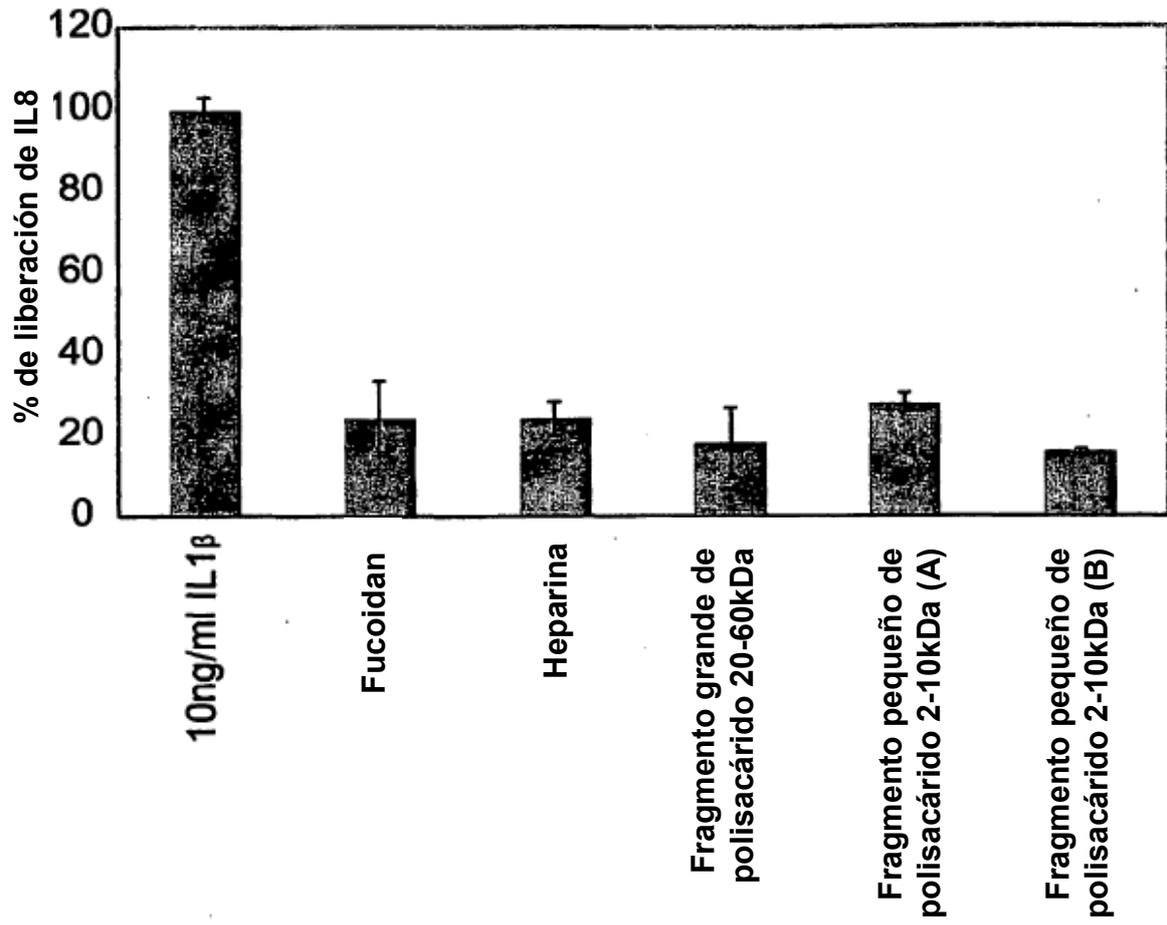


Figura 9b

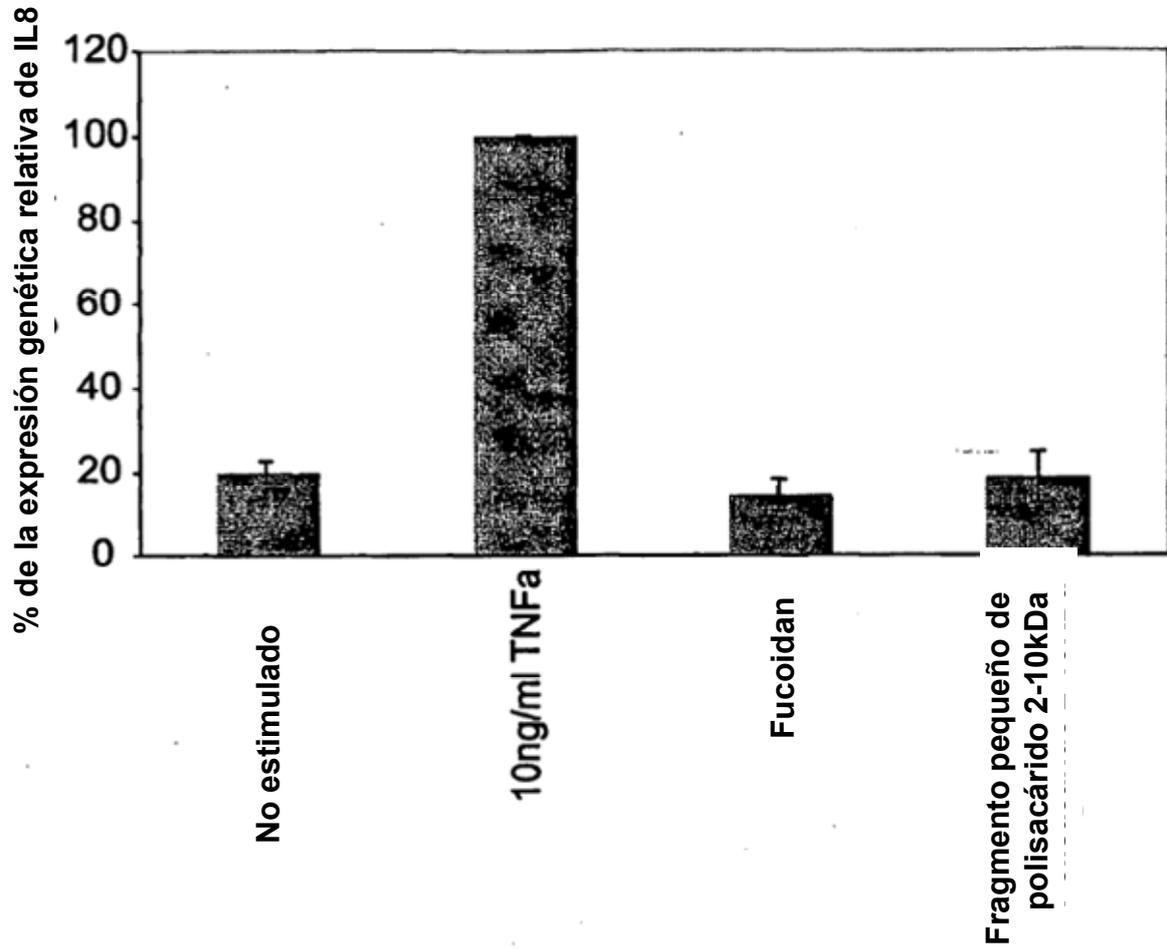


Figura 10

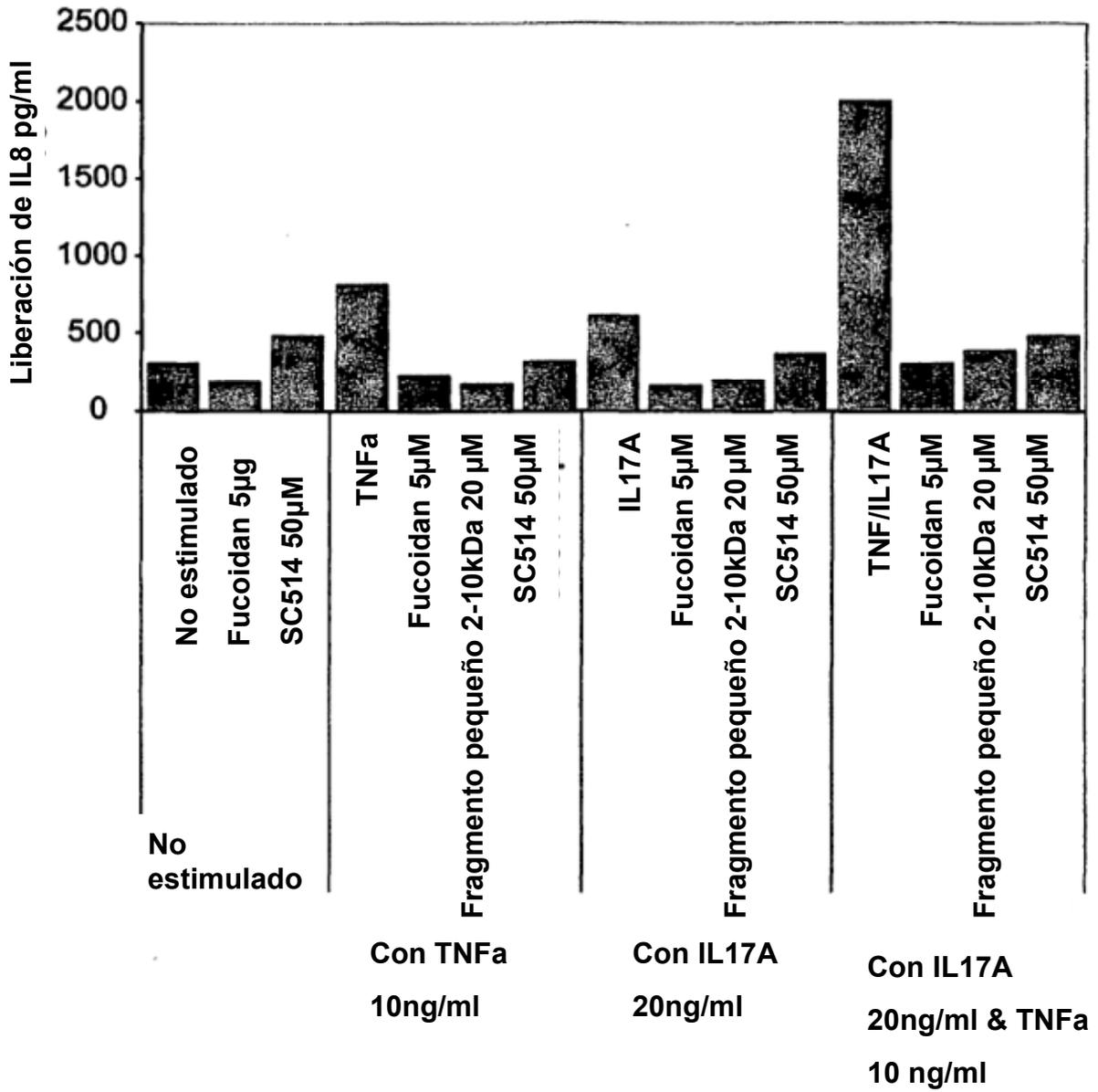


Figura 11a

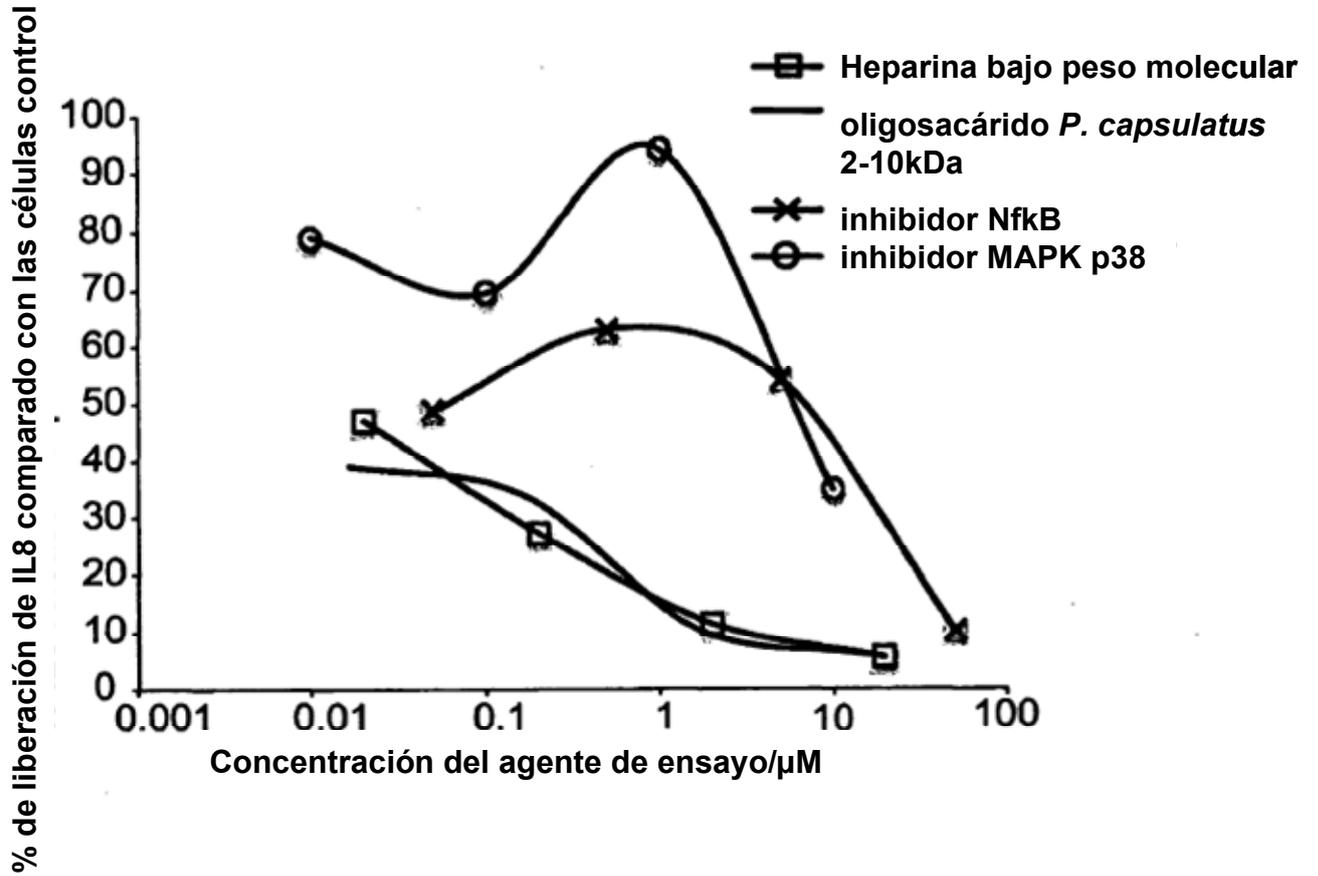


Figura 11b

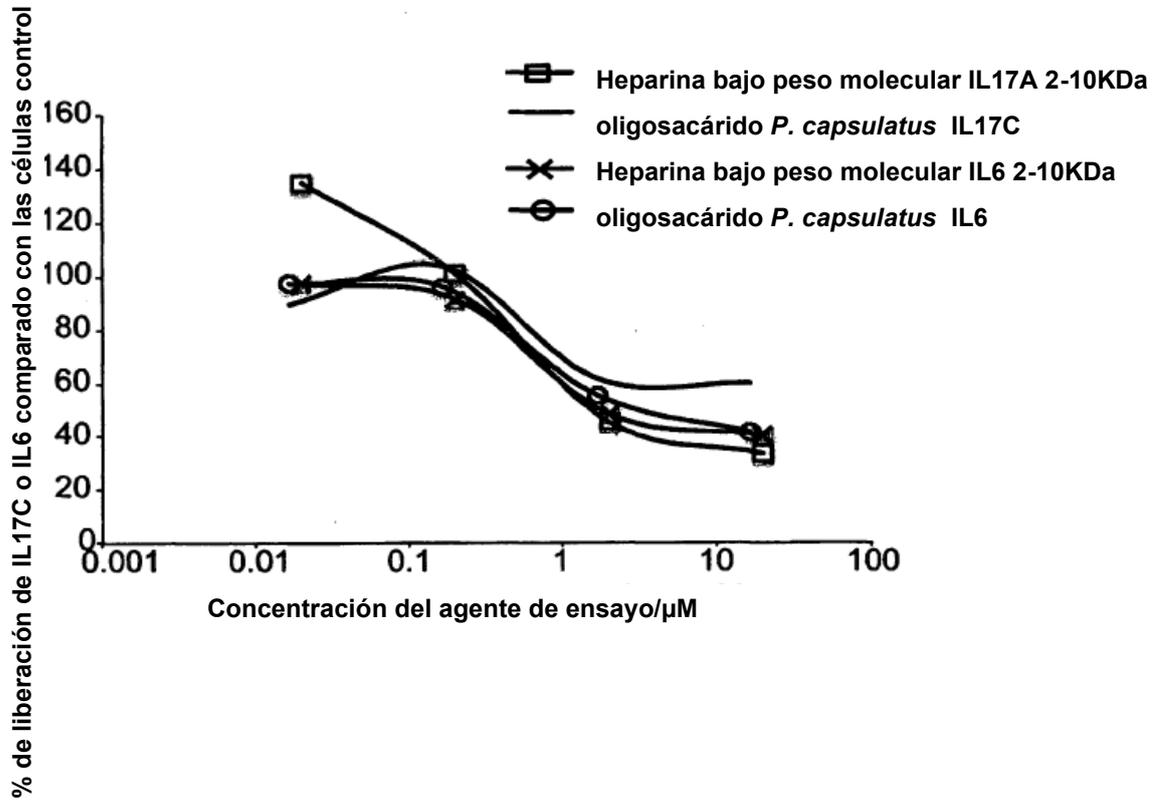


Figura 12

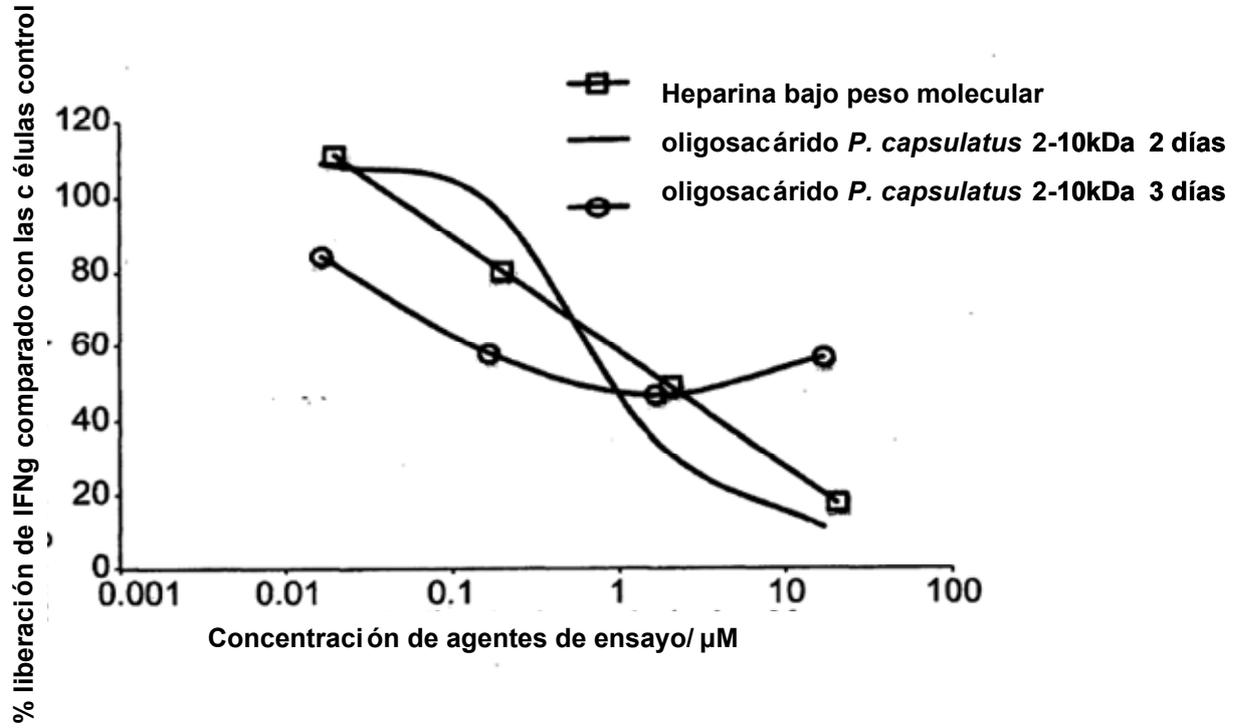


Figura 13

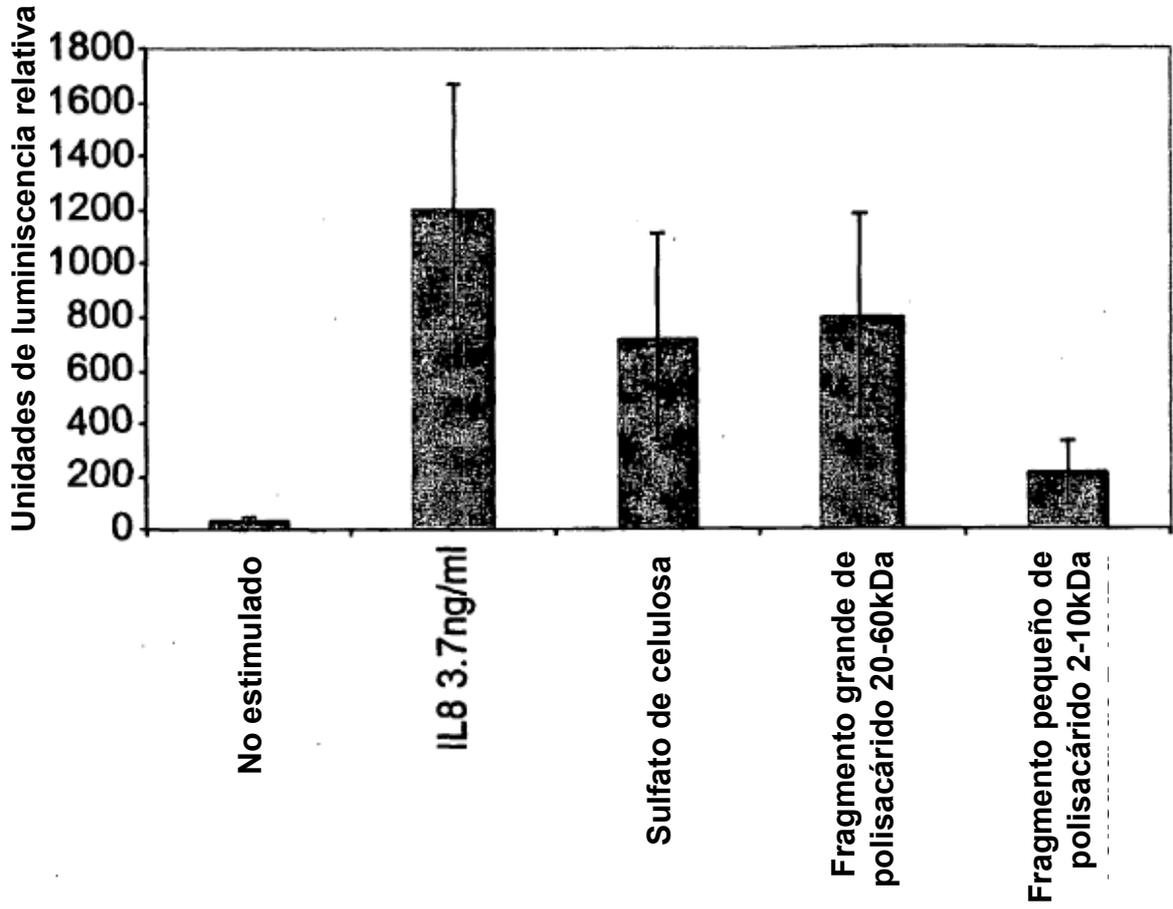


Figura 14

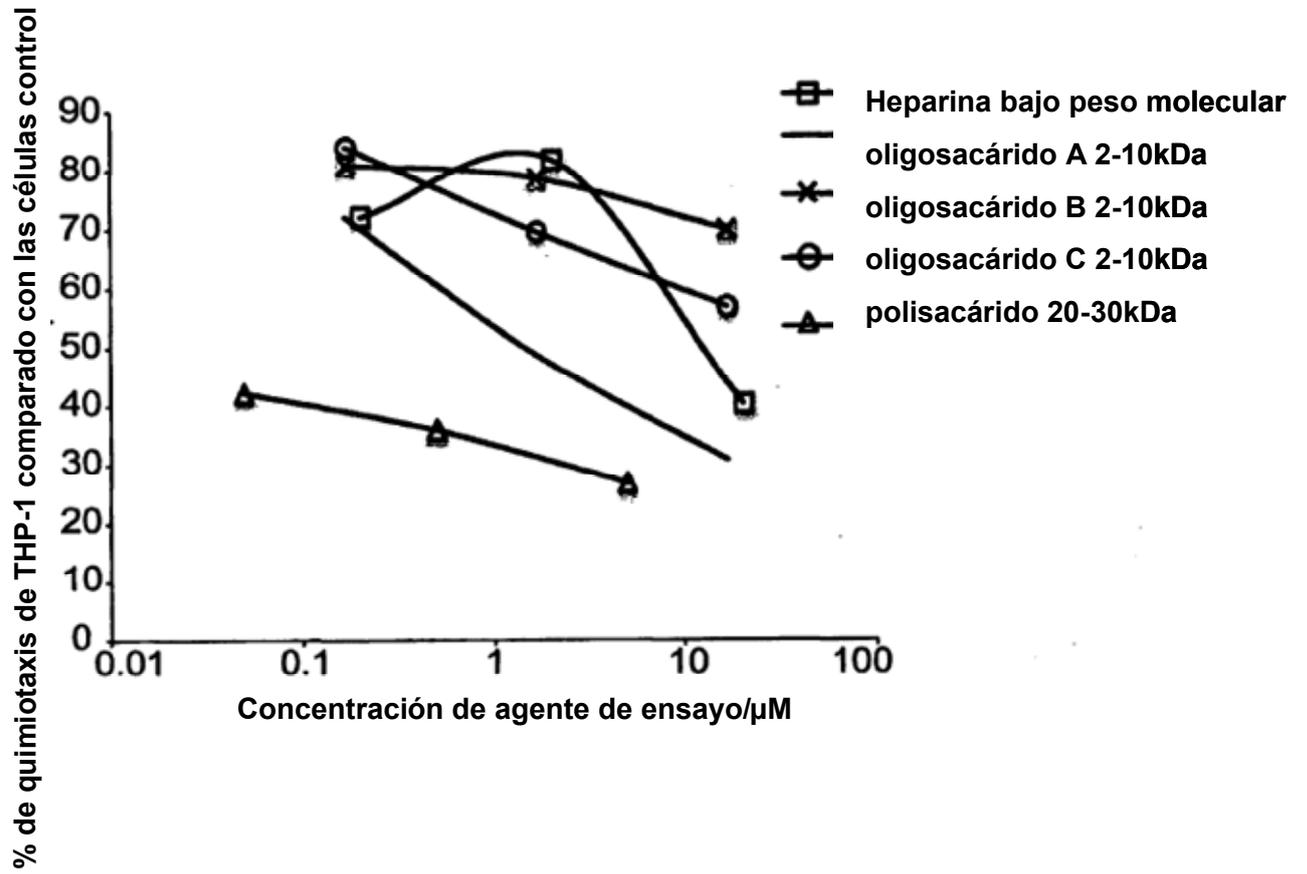


Figura 15

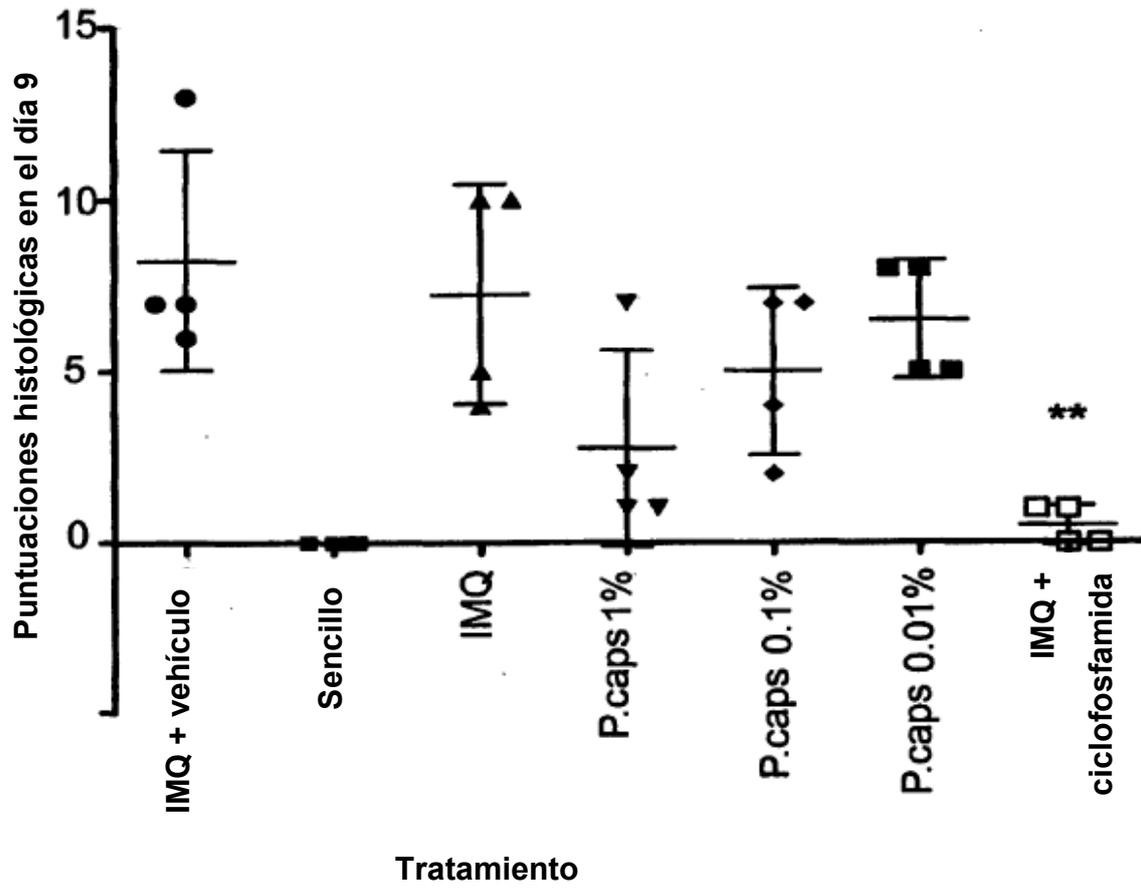


Figura 16a

	Valores medios para polisacárido nativo de HMW	Valores medios para fragmentos despolimerizados de polisacárido de LMW	Valores medios para fragmentos grandes despolimerizados
Peso Molecular/kDa	>670, con algún material más pequeño <20	2-10	20-60
de Contenido de sulfato / %	19	26	25
% de Composición de monosacárido	Glucosa 25-28 Galactosa 25-45 Arabinosa 15 urónicos 4-6 Otros: xilosa/ramnosa	Glucosa 35 Galactosa 35 Arabinosa 11 urónicos 9 Otros: xilosa/ramnosa	Glucosa 25-28 Galactosa 35-45 Arabinosa 15 urónicos 4-6 Otros: xilosa/ramnosa
Citotoxicidad (0,1mg/ml) / %	93	107	89
Actividad de elastasa de neutrófilo (0,1mg/ml) / %	38	15	25
Explosión oxidativa (0,1mg/ml) / %	73	64	69
Liberación de IL8 de los queratinocitos (0,1mg/ml) / %	NA	23	23
Expresión genética de IL8 (0,1mg/ml) / %	NA	21	23

Figura 16b

Muestra	% de sulfato por el método Terho	% de sulfato por ICP-OES
Polisacárido HMW 06111201	20	31
Polisacárido HMW 19111203	30,4	31
Polisacárido HMW 11121201	26,8	31
Polisacárido HMW 14011302	28,2	30
Polisacárido HMW 01021302	35	33