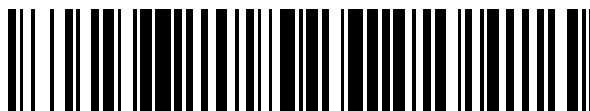


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 455**

51 Int. Cl.:

A61K 8/73 (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
A61K 36/04 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2007 PCT/US2007/001653**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2007 WO07084769**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2007 E 07718342 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 1986665**

54 Título: **Composiciones derivadas de microalgas para mejorar la salud y la apariencia de la piel**

30 Prioridad:

19.01.2006 US 337171 19.01.2006 US 337103
19.01.2006 US 336656 19.01.2006 US 336428
19.01.2006 US 336426 19.01.2006 US 336431
19.01.2006 US 336430 28.06.2006 US 816967 P
20.07.2006 US 832091 P 17.08.2006 US 838452 P
30.11.2006 US 872072 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.09.2018

73 Titular/es:

TERRAVIA HOLDINGS, INC. (100.0%)
225 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

DILLON, HARRISON, F.;
SOMANCHI, ARAVIND;
ZAMAN, ANWAR;
RAO, KAMALESH;
WOLFSON, JONATHAN;
DAY, ANTHONY, G. y
CORAGLIOTTI, ANNA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 682 455 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

Composiciones derivadas de microalgas para mejorar la salud y la apariencia de la piel

5 Antecedentes de la invención

Los carbohidratos tienen la fórmula molecular general CH_2O , y por lo tanto durante algún tiempo se pensaba que representaba el "carbono hidratado". Sin embargo, la disposición de átomos en los carbohidratos tiene poco que ver con las moléculas de agua. El almidón y la celulosa son dos carbohidratos comunes. Ambas son macromoléculas con pesos moleculares de cientos de miles. Ambos son polímeros; es decir, cada uno se construye a partir de unidades repetitivas, monómeros, de forma similar a como se construye una cadena a partir de sus eslabones.

15 Tres azúcares comunes comparten la misma fórmula molecular: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Debido a sus seis átomos de carbono, cada uno es una hexosa. La glucosa es la fuente inmediata de energía para la respiración celular. La galactosa es un azúcar en la leche. La fructosa es un azúcar que se encuentra en la miel. Aunque los tres comparten la misma fórmula molecular ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), la disposición de los átomos difiere en cada caso. Sustancias como estas tres, que tienen fórmulas moleculares idénticas pero diferentes fórmulas estructurales, se conocen como isómeros estructurales. La glucosa, la galactosa y la fructosa son azúcares o monosacáridos "simples".

20 Dos monosacáridos se pueden unir para formar un azúcar "doble" o disacárido. Tres disacáridos comunes son sacarosa, azúcar de mesa común (glucosa + fructosa); lactosa, el principal azúcar en la leche (glucosa + galactosa); y maltosa, el producto de la digestión del almidón (glucosa + glucosa). Aunque el proceso de unión de los dos monómeros es complejo, el resultado final en cada caso es la pérdida de un átomo de hidrógeno (H) de uno de los monosacáridos y un grupo hidroxilo (OH) del otro. El enlace resultante entre los azúcares se llama un enlace glicosídico. La fórmula molecular de cada uno de estos disacáridos es $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} = 2 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - \text{H}_2\text{O}$. Todos los azúcares son muy solubles en agua debido a sus muchos grupos hidroxilo. Aunque no es un combustible tan concentrado como las grasas, los azúcares son la fuente de energía más importante para muchas células.

30 Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a polisacáridos y biomasa producidos a partir de microalgas. Los polisacáridos representativos incluyen los presentes en la pared celular de microalgas, así como polisacáridos secretados o exopolisacáridos. Además de los propios polisacáridos, tales como los que se encuentran en una forma aislada, purificada o semipurificada, la invención incluye una variedad de composiciones que contienen uno o más polisacáridos de microalgas como se describe en este documento. Las composiciones incluyen composiciones nutracéuticas, cosmeceúticas, industriales y farmacéuticas que se pueden usar para una variedad de indicaciones y usos como se describe en este documento. Otras composiciones incluyen aquellas que contienen uno o más polisacáridos de microalgas y un vehículo o excipiente adecuado para administración tópica u oral.

40 La presente invención se refiere a una composición que comprende un polisacárido de microalgas, la composición producida por:

a) aislar un polisacárido a partir de microalgas;

45 b) secar el polisacárido aislado para formar una película que se ha hecho total o parcialmente insoluble en agua por calentamiento; y

c) homogeneizar la película para generar partículas, en donde las partículas aumentan de volumen al contacto con el agua en comparación con su volumen anhidro o parcialmente hidratado,

50 en donde la etapa b) se lleva a cabo mediante (i) calentamiento en dos partes en donde el segundo calentamiento está a una temperatura de 148°C a 160°C , o (ii) calentamiento a una temperatura de 135°C a 152°C .

La presente invención también se refiere a un método de fabricación de una composición, que comprende:

55 a) aislar un polisacárido de microalgas;

b) secar el polisacárido aislado hasta una película sólida que se ha hecho total o parcialmente insoluble en agua por calentamiento;

60 c) homogeneizar la película en partículas, en donde las partículas aumentan de volumen al contacto con agua en comparación con su volumen anhidro o parcialmente hidratado; y

d) formular las partículas en un material no acuoso,

65

en donde la etapa b) se lleva a cabo mediante (i) calentamiento en dos partes en donde el segundo calentamiento está a una temperatura de 148°C a 160°C, o (ii) calentamiento a una temperatura de 135°C a 152°C. Se divulgan microalgas decoloradas para formulación en productos para el cuidado de la piel como una composición. Composiciones altamente deseables de células de microalgas que no manchan la piel humana con pigmentos rojos o verdes pero que aún proporcionan el suministro de ingredientes cosmecéuticos o de alto valor tales como carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos hidratantes, superóxido dismutasa y otros componentes.

Se divulga la idea de que las combinaciones de alta irradiación luminosa y limitar los niveles de compuestos que contienen nitrógeno en los medios de cultivo permite la producción de una biomasa alta en valor cosmecéutico/nutracéutico pero no contiene cantidades sustanciales de pigmentos que manchan la piel humana cuando se aplica como parte de una formulación para el cuidado de la piel. Además, se producen polisacáridos antioxidantes e hidratantes a niveles más altos en células de microalgas, tales como las del género *Porphyridium* en condiciones de alta/baja concentración de nitrógeno. Se describen composiciones de biomasa de *Porphyridium* que están sustancialmente libres de coloración roja y contienen mayores cantidades de exopolisacárido que las células que contienen cantidades significativas de coloración roja que crecen en condiciones de abundancia de nitrógeno.

Entonces, en un aspecto, lo divulgado incluye una composición que comprende células del género *Porphyridium*, en donde un extracto acuoso de la composición contiene un nivel reducido de pigmentación roja, o una absorbancia reducida a 545 nm, en relación con las mismas células cultivadas en diferentes condiciones. En algunas realizaciones, el extracto contiene no más de aproximadamente 75% a no más de aproximadamente 5% de la absorbancia por gramo a 545 nm en comparación con un extracto de células de la misma especie cultivadas en un fotobiorreactor en medio de agua de mar artificial (ASW) ATCC 1495 en presencia de 50 microeinsteins de luz por segundo por metro cuadrado. En otras realizaciones, la composición comprende un vehículo y/o un conservante adecuado para administración tópica. En realizaciones adicionales, el vehículo es adecuado para la administración tópica en seres humanos.

Se divulgan métodos para producir o preparar polisacáridos de microalgas. En algunos métodos divulgados, los azúcares exógenos se incorporan en los polisacáridos para producir polisacáridos distintos de los presentes en las microalgas que no incorporan azúcares exógenos. También se describen métodos de conversión trófica y expresión génica recombinante en microalgas. En algunos métodos, las microalgas recombinantes se preparan para expresar productos de genes heterólogos, como proteínas de mamíferos como un ejemplo no limitante, mientras que en otras realizaciones, las microalgas se modifican para producir más de una molécula pequeña ya producida por microalgas en ausencia de modificación genética.

También se describen métodos para cultivar, producir y preparar biomasa de microalgas. En algunos métodos divulgados, el exceso de luz se proporciona como un método de eliminación de la pigmentación. En otros métodos, la reducción de la cantidad de nitrógeno proporcionada a las células de microalgas en cultivo se proporciona como un método para eliminar la pigmentación. En otros métodos, se usa una mayor irradiación luminosa combinada con medios de cultivo que contienen cantidades limitadas de nitrógeno para reducir y/o eliminar la pigmentación roja o verde. Además, la divulgación proporciona cepas decoloradas producidas a través de métodos de mutagénesis química o de inserción/eliminación de genes que se utilizan para generar biomasa para productos para cuidado de la piel.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a composiciones para aplicación tópica, tales como una composición para aplicación a la piel humana que comprende un polisacárido aislado de células del género *Porphyridium*. En algunas realizaciones, la composición comprende un polisacárido que es parte de una célula de microalgas, o un homogeneizado de las mismas. En otras realizaciones, el polisacárido está contenido dentro de células de microalgas, o un homogeneizado de las mismas, que está esencialmente libre, o completamente libre, de coloración roja. Por lo tanto, una composición descrita aquí también puede estar esencialmente libre, o completamente libre, de coloración roja. Ejemplos no limitantes incluyen composiciones que comprenden menos de aproximadamente 15 miligramos, menos de aproximadamente 1 miligramo o menos de aproximadamente 0,1 miligramos de ficoeritrina por gramo seco de células en la composición.

En realizaciones adicionales, la composición es la de un cosmético u otro producto para el cuidado de la piel. Dichos productos pueden contener uno o más polisacáridos de microalgas, o un homogeneizado de células de microalgas, un vehículo tópico y/o un conservante. En algunas realizaciones, el vehículo puede ser cualquier vehículo adecuado para aplicación tópica, tal como, pero no limitado a, uso en piel humana o tejido de la mucosa humana. En otras realizaciones, la composición puede contener un polisacárido de microalgas purificado, tal como un exopolisacárido y un vehículo tópico. Ejemplos de vehículos incluyen formulación de liposomas, microcápsulas biodegradables, loción, pulverización, aerosol, polvo pulverizable, polímero biodegradable, aceite mineral, petróleo líquido, petróleo blanco, propilenglicol, compuestos de polioxietileno polioxipropileno, cera emulsionante, sorbitano monoestearato, polisorbato 60, cera de éster cetílico, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Ejemplos de conservantes incluyen diiodometil-p-tolilsulfona, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, cis-isómero 1-(3-cloroalil)-3,5,7-triaza-1-azoniaadamantano cloruro, glutaraldehído, 4,4-dimetiloxazolidina, 7-etilbiciclooxazolidina, metilparabeno, ácido sórbico, Germaben 11 y EDTA de disodio.

Como cosmeceútico, la composición puede contener un polisacárido u homogeneizado de microalgas y otro material componente que se encuentra en los cosméticos. En algunas realizaciones, el material componente puede ser el de una fragancia, un colorante (por ejemplo, óxido de hierro negro o rojo, dióxido de titanio y/u óxido de zinc, etc.), un bloqueador solar (por ejemplo, titanio, zinc, etc.) y un aditivo mineral o metálico.

En otros aspectos, la descripción incluye métodos para preparar o producir un polisacárido de microalgas. En algunos aspectos relacionados con un exopolisacárido, la divulgación incluye métodos que separan el exopolisacárido de otras moléculas presentes en el medio utilizado para cultivar microalgas productoras de exopolisacáridos. En algunas realizaciones, la separación incluye la eliminación de las microalgas del medio de cultivo que contiene el exopolisacárido, después de que la microalga se haya cultivado durante un período de tiempo. Por supuesto, los métodos se pueden practicar con polisacáridos de microalgas distintos de los exopolisacáridos. En otras realizaciones, los métodos incluyen aquellos en los que las microalgas se cultivaron en un biorreactor, opcionalmente cuando se infunde un gas en el biorreactor.

En una realización, la divulgación incluye un método para producir un exopolisacárido, en donde el método comprende cultivar microalgas en un biorreactor, en donde el gas se infunde en el biorreactor; separar las microalgas de los medios de cultivo, en donde los medios de cultivo contienen el exopolisacárido; y separar el exopolisacárido de otras moléculas presentes en los medios de cultivo.

Las microalgas de la invención o descripción pueden ser las de cualquier especie, incluidas las enumeradas en la Tabla 1 de este documento. En algunas realizaciones, la microalga es un alga roja, tal como las algas rojas *Porphyridium*, que tiene dos especies conocidas (*Porphyridium sp.* y *Porphyridium cruentum*) que según se ha observado secretan grandes cantidades de polisacáridos en sus medios de crecimiento circundantes. En otras realizaciones, la microalga es de un género seleccionado de *Rhodella*,

Chlorella, y *Achnanthes*. Ejemplos no limitantes de especies dentro de un género de microalgas de la invención incluyen *Porphyridium sp.*, *Porphyridium cruentum*, *Porphyridium purpuretum*, *Porphyridium aeruginosum*, *Rhodella nzaculata*, *Rhodella reticulata*, *Chlorella autotrophica*, *Chlorella stigmatophora*, *Chlorella capsulata*, *Achnanthes brevipes* y *Achnanthes longipes*.

En algunas realizaciones, se practica un método de preparación de polisacáridos con medios de cultivo que contienen más de 26,7 o más de 27 mM de sulfato (o SO_4^{2-} total). Ejemplos no limitantes incluyen medios con más de aproximadamente 28, más de aproximadamente 30, más de aproximadamente 35, más de aproximadamente 40, más de aproximadamente 45, más de aproximadamente 50, más de aproximadamente 55, más de aproximadamente 60, más de aproximadamente 65, más de aproximadamente 70, más de aproximadamente 75, más de aproximadamente 80, más de aproximadamente 85, más de aproximadamente 90, más de aproximadamente 95, más de aproximadamente 100 mM de sulfato, y en algunos casos más de 250 mM, más de 400 mM, más de 550 mM y más de 750 mM, más de 900 mM, más de 1 M y más de 2 mM de sulfato. El sulfato en los medios puede proporcionarse en una o más de las siguientes formas: Na_2SO_4 , $10 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

MnSO_4 y CuSO_4 .

Otras realizaciones del método incluyen la separación de un exopolisacárido de otras moléculas presentes en los medios de cultivo mediante filtración de flujo tangencial. Alternativamente, los métodos pueden practicarse separando un exopolisacárido de otras moléculas presentes en el medio de cultivo mediante precipitación con alcohol. Ejemplos no limitantes de alcoholes por usar incluyen etanol, isopropanol y metanol.

En otras realizaciones, un método puede comprender además tratar un polisacárido o exopolisacárido con una proteasa para degradar el polipéptido (o material proteínico) unido a, o encontrado con, el polisacárido o exopolisacárido. Los métodos pueden comprender opcionalmente separar el polisacárido o exopolisacárido de proteínas, péptidos y aminoácidos después del tratamiento con proteasa.

En otras realizaciones, se describe un método para formular una composición cosmeceútica. Como un ejemplo no limitante, la composición se puede preparar añadiendo polisacáridos separados, o exopolisacáridos, a células de microalgas homogeneizadas antes, durante o después de la homogeneización. Tanto los polisacáridos como las células de microalgas pueden ser de un cultivo de células de microalgas en suspensión y en condiciones que admiten o permiten la división celular. El medio de cultivo que contiene los polisacáridos se separa a continuación de las células de microalgas, seguido de 1) separación de los polisacáridos de otras moléculas en el medio y 2) homogeneización de las células.

Se pueden formular otras composiciones de la divulgación sometiendo un cultivo de células de microalgas y exopolisacáridos solubles a filtración de flujo tangencial hasta que la composición esté sustancialmente libre de sales. Alternativamente, se prepara un polisacárido después de la proteólisis de los polipéptidos presentes en el polisacárido. El polisacárido y cualquier polipéptido contaminante pueden ser los de un medio de cultivo separado de células de microalgas en un cultivo de los mismos. En algunas realizaciones, las células son del género *Porphyridium*.

En un aspecto adicional, la descripción incluye una composición que comprende polisacáridos en partículas. Los polisacáridos pueden ser de cualquier fuente de microalgas, y con cualquier nivel de sulfatación, como se describe en este documento. La composición puede ser estéril o sustancialmente libre de endotoxinas y/o proteínas en algunas realizaciones. En otras formas de realización, la composición comprende además ácido hialurónico u otro agente adecuado o deseable para el tratamiento de la piel. Las partículas en algunas realizaciones se generan purificando primero el polisacárido de la biomasa, luego secando el polisacárido purificado en una película, y luego homogeneizando y/o triturando la película en partículas más pequeñas. Las composiciones definidas en la reivindicación 1 forman parte de la invención.

En algunas realizaciones, los polisacáridos están en forma de un material purificado que se secó para que sea completamente o parcialmente insoluble en agua. Preferiblemente el material purificado

se ha separado de la biomasa celular, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 2. En tal forma purificada, el polisacárido es al menos 50% en peso de polisacárido, y más preferiblemente superior a 75% en peso de polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido está asociado con una o más especies de proteínas que pueden ser endógenas a la fuente de microalgas, y alternativamente puede ser una proteína de fusión que es parcialmente endógena a la fuente de microalgas como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, las partículas de polisacáridos secados están en mezcla con un disolvente o material no acuoso. En otras realizaciones, las partículas de polisacáridos secados son parcialmente solubles de manera que son de menos de aproximadamente 70% a menos de aproximadamente 1% solubles en agua.

En realizaciones adicionales, las partículas de polisacáridos aumentan en volumen, o se hinchan, al contacto con agua o vapor de agua. Por lo tanto, el volumen de las partículas de polisacáridos aumenta en comparación con su volumen anhidro o parcialmente hidratado antes de la exposición al agua o al vapor de agua. En algunas realizaciones, las partículas aumentan en volumen en una cantidad seleccionada de al menos aproximadamente 5% a al menos aproximadamente 5000%.

La invención divulgada incluye además métodos para la preparación o fabricación de las partículas de polisacáridos secos. En algunas realizaciones, el método comprende formular partículas de material polisacárido en un material no acuoso. Las partículas pueden formarse a partir de una película de material de polisacárido seco, en donde al menos una porción (o alguna proporción) de la película se ha hecho total o parcialmente insoluble en agua. Opcionalmente, las partículas se forman por homogeneización de la película en forma de partículas. Los métodos como se definen en la reivindicación 12 forman parte de la invención.

En algunos casos, la película se forma calentando una suspensión de material polisacárido hasta que la totalidad o parte de la película sea insoluble. El calentamiento puede ser de una suspensión acuosa del material para eliminar el agua de la suspensión. Por supuesto, el polisacárido en la suspensión puede ser de cualquier fuente de microalgas como se describe en este documento. Opcionalmente, el polisacárido en la suspensión se ha aislado de la biomasa de microalgas. Opcionalmente, el polisacárido en la suspensión se ha aislado del sobrenadante de un cultivo de microalgas.

La invención descrita incluye así un método para preparar o fabricar una composición para aplicación tópica, tal como para mejorar la apariencia de la piel. El método puede comprender 1) secar una suspensión acuosa de un polisacárido aislado de microalgas en una película sólida, en donde al menos parte de la película se ha hecho total o parcialmente insoluble en agua; 2) homogeneizar la película en partículas; y opcionalmente 3) formular las partículas en un material no acuoso. En algunas realizaciones, la homogeneización es mediante un método seleccionado de molienda por chorro, molienda de bolas, fresado Retsch®, fresado de púas y fresado en un dispositivo Quadro®. Opcionalmente, la formulación de las partículas se realiza en la fase no acuosa de una emulsión de aceite en agua, tal como una emulsión adecuada para aplicación tópica. La fase no acuosa puede comprender un aceite adecuado para aplicación tópica, tal como ácido hexadecanoico como ejemplo no limitante. En otros casos, la formulación de las partículas se realiza en un vehículo adecuado para administración tópica como se describe en este documento. En algunas realizaciones, las partículas pueden ser de tamaño relativamente uniforme o pueden variar en tamaño, pero en muchas realizaciones, las partículas tienen un tamaño promedio entre aproximadamente 400 y 0.1 micrómetros.

La formación de una película sólida puede realizarse calentando entre aproximadamente 40 y aproximadamente 180 grados Celsius. En otras realizaciones, el calentamiento se realiza en dos partes. La primera parte puede comprender calentar una suspensión, opcionalmente acuosa, de material polisacárido a no más de aproximadamente 60 a aproximadamente 100°C durante un período de tiempo suficiente para formar o producir una película sólida. Esto puede ser seguido por un segundo calentamiento de la película sólida durante un (segundo) período de tiempo suficiente para alcanzar no más de aproximadamente 148 a aproximadamente 160 °C. En una realización, el primer calentamiento es en presencia de aire, que puede combinarse opcionalmente con el segundo calentamiento (de la película sólida) en al menos un vacío parcial o en un alto vacío. Por supuesto, el segundo calentamiento a presión reducida puede usarse independientemente del primer calentamiento en presencia de aire. En otras realizaciones, el calentamiento se realiza en una sola etapa, ya sea en presencia de aire o en presencia de un vacío parcial o total.

En algunas realizaciones alternativas, un método para convertir el material polisacárido en insoluble se selecciona de entrecruzamiento químico, deshidratación química mediante el desplazamiento por un alcohol del agua ligada, precipitación de una solución usando un alcohol o una cetona o pH, y recubrimiento de partículas mediante microencapsulación.

En un aspecto adicional, la invención descrita incluye un método de aplicación tópica de una composición que comprende polisacáridos en forma de partículas. En algunas realizaciones, la aplicación es para la piel, tal como para piel de mamífero o humana. Alternativamente, la aplicación es para labios o arrugas en la piel humana, o por inyección en la piel o un tejido de la piel. En muchas realizaciones, la aplicación es para mejorar la apariencia de la piel.

En realizaciones adicionales de la divulgación, se puede usar una composición que contiene polisacáridos (opcionalmente con polisacáridos en forma de partículas) en un método de mejora cosmética. En una realización, un método puede incluir inyectar un polisacárido producido por microalgas en la piel de un mamífero. Preferiblemente, el polisacárido es estéril y está libre de proteína.

En realizaciones adicionales, se describe un método para tratar la piel, tal como piel de mamífero o humana. En algunas realizaciones, el método es para el tratamiento de la piel facial humana o un

tejido de la misma. Dichos métodos incluyen un método para estimular la síntesis de colágeno, estimular la síntesis de elastina o inhibir la actividad de collagenasa en dicha piel aplicando a la piel una composición divulgada de la invención. Métodos adicionales incluyen un método para reducir los signos del envejecimiento o reducir el aspecto del envejecimiento en la piel humana aplicando a la piel una composición de la invención divulgada. Ejemplos no limitantes de un signo de envejecimiento o una apariencia del envejecimiento incluyen arrugas, como aquellas en la frente o alrededor de los ojos y/o labios, y manchas por el hígado (manchas planas de color marrón amarillento que aparecen como grandes pecas). En algunas realizaciones, un signo o apariencia de envejecimiento se asocia con la formación y/o actividad de especies de oxígeno reactivo (ROS) en la piel. El uso de una composición puede estar basado en parte en la idea de que los polisacáridos descritos poseen actividad antioxidante, y además los polisacáridos altamente sulfatados en donde el porcentaje de azufre en peso está por encima de 4,75%.

Realizaciones adicionales incluyen el uso de una composición que contiene polisacáridos en un método para reducir los efectos de la luz o radiación ultravioleta (UV), tal como el que se presenta

a la luz del sol, en la piel o en un tejido de la piel. Un ejemplo no limitante es un método para proteger la piel de mamífero de la luz UV. El método puede comprender aplicar una composición de la invención divulgada a la piel o un tejido de la piel en una cantidad eficaz o suficiente para proteger, al

menos en parte, la piel de la radiación UV. En una realización alternativa, se puede aplicar una composición de la invención en una cantidad efectiva o suficiente para tratar la piel que ha sido dañada por la radiación UV. Un ejemplo adicional no limitante es un método para tratar la piel para reducir el riesgo de cáncer de piel inducido por la luz solar o la radiación UV. El método puede comprender aplicar una composición de la invención en una cantidad efectiva o suficiente para reducir el riesgo de cáncer de piel inducido por UV o luz solar.

Un ejemplo adicional no limitante es un método para tratar la piel para reducir el riesgo de cáncer de piel inducido por la luz solar o radiación UV que causa eritema. El eritema es el enrojecimiento de la piel causado por un mayor flujo de sangre a los capilares. Un sujeto puede evaluar la cantidad efectiva de materiales de microalgas suficientes para tratar el eritema usando métodos conocidos en la técnica. Véase por ejemplo J. Invest. Dermatol., 117 (5); 1318-1321 (2001).

Además de lo anterior, la aplicación de una composición de la descripción a la piel humana se puede usar en un método para reducir las especies de oxígeno reactivo (ROS) en la piel o en un tejido de la piel.

Esto se basa en parte en la idea de que los polisacáridos descritos poseen actividad antioxidante. En algunas realizaciones, el método se usa para prevenir o tratar una enfermedad o afección no deseada asociada con ROS o estrés oxidativo. Ejemplos no limitantes de dicha enfermedad o afección no deseada incluyen reducir la inflamación o irritación de la piel. En algunas realizaciones, la composición de polisacárido comprende uno o más de otros agentes o compuestos con actividad antioxidante. En realizaciones adicionales, el método puede usarse para disminuir el nivel de ROS, o reducir o disminuir la cantidad de daño causado por ROS en la piel o un tejido de la piel. La cantidad de la composición puede ser cualquiera que sea efectiva o suficiente para producir una mejora deseada o un beneficio terapéutico.

Los detalles de las realizaciones adicionales de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 muestra la precipitación de 4 litros de exopolisacárido de *Porphyridium cruentum* usando 38,5% de isopropanol. (a) sobrenadante; (b) adición de 38,5% de isopropanol; (c) polisacárido precipitado; (d) paso de separación.
- La Figura 2 muestra el crecimiento de *Porphyridium sp.* y células de *Porphyridium cruentum* cultivadas a la luz en presencia de diversas concentraciones de glicerol.
- 10 La figura 3 muestra *Porphyridium sp.* células cultivadas en la oscuridad en presencia de diversas concentraciones de glicerol.
- La Figura 4 muestra los niveles de polisacáridos accesibles a solventes en *Porphyridium sp.* homogeneizados sometidos a diversas cantidades de ruptura física del experimento de sonicación 1.
- 15 La Figura 5 muestra los niveles de polisacáridos accesibles a solventes en *Porphyridium sp.* homogeneizados sometidos a diversas cantidades de ruptura física del Experimento de Sonicación 2.
- La Figura 6 muestra las mediciones de la concentración de proteínas de exopolisacáridos tratados en autoclave, tratados con proteasas y diafiltrados.
- 20 La Figura 7 muestra diversas cantidades e intervalos de cantidades de compuestos encontrados por gramo de células en células del género *Porphyridium*.
- 25 La figura 8 muestra *Porphyridium sp.* cultivadas en placas de agar que contienen diversas concentraciones de zeocina.
- La Figura 9 muestra cultivos de *Porphyridium cruentum* con nitrógeno a plenitud (matraz 1) y en carencia de nitrógeno (matraz 2). El medio de cultivo en el matraz 1 es como se describe en el Ejemplo 1. El medio de cultivo en el matraz 2 es como se describe en el Ejemplo 1 excepto que los medios de cultivo no contenían Tris y nitrato de potasio 0,125 g/l, pH 7,6. Los matraces 1 y 2 se inocularon con cantidades idénticas de células de color rojo oscuro tomadas de un cultivo que se hizo crecer en medio ASW ATCC1495. Las células en el matraz 2 están sustancialmente libres de coloración roja.
- 30 La figura 10 muestra la biomasa liofilizada con nitrógeno a plenitud (panel 1) y en carencia de nitrógeno (panel 2) de *Porphyridium cruentum* Células. El medio de cultivo utilizado para cultivar las células mostradas en el panel 1 fue como se describe en el Ejemplo 1. El medio de cultivo utilizado para cultivar las células mostradas en el panel 2 fue como se describe en el Ejemplo 1 excepto que el medio de cultivo no contenía Tris y 0,125 g/l nitrato de potasio, pH 7.6. La biomasa liofilizada en el panel 2 está sustancialmente libre de coloración roja.
- 35 La Figura 11 (a) muestra la formación del dímero TT inducido por UVB en presencia y ausencia de materiales derivados de microalgas.
- 40 La Figura 11 (b) muestra la secreción de procolágeno por fibroblastos humanos en presencia y ausencia de materiales derivados de microalgas.
- 45 La Figura 12 (a) muestra la secreción de elastina por fibroblastos humanos en presencia y ausencia de materiales derivados de microalgas.
- 50 La Figura 12 (b) muestra la inhibición de la migración de PMN en presencia y ausencia de materiales derivados de microalgas.
- La Figura 13 (a) muestra la secreción de IL1- α en presencia y ausencia de materiales derivados de microalgas.
- 55 La Figura 13 (b) muestra la secreción de interferón gamma en presencia y ausencia de materiales derivados de microalgas.
- La Figura 14 (a) muestra la genotipificación de PCR de dos transformantes de *Porphyridium* para el transgén de resistencia a antibiótico ble.
- 60 La Figura 14 (b) muestra la genotipificación de PCR de dos transformantes de *Porphyridium* para el promotor del gen de glicoproteína endógeno.
- La Figura 14 (c) muestra la genotipificación de PCR de transformantes de *Porphyridium* para un gen exógeno que codifica un transportador GLUT1 humano recodificado.
- 65

La Figura 15 muestra una inmunotransferencia Southern que indica la integración cromosómica de un gen exógeno que codifica un transportador GLUT1 humano recodificado.

La Figura 16 muestra preparaciones de perlas de polisacáridos solubles e insolubles.

La Figura 17 (a) muestra el hinchamiento de las perlas de polisacáridos a lo largo del tiempo.

La Figura 17 (b) muestra porcentajes de polisacárido en la fase de gel insoluble a lo largo del tiempo.

La Figura 18 muestra la proliferación de PBMC en presencia y ausencia de materiales derivados de microalgas.

Descripción detallada de la invención

Definiciones: las siguientes definiciones están destinadas a transmitir el significado previsto de los términos utilizados a lo largo de la especificación y las reivindicaciones, sin embargo, no son limitantes en el sentido de que las diferencias menores o triviales caen dentro de su alcance.

"Activo en microalgas" significa un ácido nucleico que es funcional en microalgas. Por ejemplo, un promotor que se ha usado para dirigir un gen de resistencia a antibióticos para impartir resistencia a antibióticos a una microalga transgénica es activo en microalgas. Ejemplos no limitantes de promotores activos en microalgas son promotores endógenos de ciertas algas especies y promotores encontrados en virus de plantas.

"ARA" significa ácido araquidónico.

"Asociados con" significa, en el contexto de una proteína de fusión que se une a polisacáridos, una molécula que se une a otra molécula. La afinidad y la selectividad de la unión pueden variar cuando un polisacárido y una proteína de unión a polisacárido están en asociación entre sí.

"Axénico" significa un cultivo de un organismo que está libre de contaminación por otros organismos vivos.

"Biorreactor" significa un recinto o recinto parcial en donde las células se cultivan en suspensión.

"Vehículo adecuado para administración tópica" significa un compuesto que se puede administrar, junto con uno o más compuestos de la presente divulgación, y que no destruye la actividad del mismo y no es tóxico cuando se administra en concentraciones y cantidades suficientes para administrar el compuesto a la piel o un tejido de la mucosa. "Producto de combinación" significa un producto que comprende al menos dos composiciones destinadas a la administración humana a través de distintas rutas, tales como una ruta tópica y una vía oral. En algunas realizaciones, el mismo agente activo está contenido tanto en los componentes tópicos como en los orales del producto de combinación.

"Condiciones favorables para la división celular" significa condiciones en las que las células se dividen al menos una vez cada 72 horas.

"DHA" significa ácido docosahexaenoico.

"Endopolisacárido" significa un polisacárido que se retiene intracelularmente.

"EPA" significa ácido eicosapentaenoico.

Las células o biomasa que están "esencialmente libres de coloración roja" no contienen ningún color rojo visible a simple vista o una pequeña cantidad de color rojo, de modo que el rojo es un color menor de la composición general en comparación con al menos otro color como el amarillo.

Las células o la biomasa que están "completamente libres de coloración roja" no contienen ningún color rojo visible a simple vista.

"Gen exógeno" significa un gen transformado en un organismo de tipo salvaje. El gen puede ser heterólogo de una especie diferente, u homólogo de la misma especie, en cuyo caso el gen ocupa una ubicación diferente en el genoma del organismo que el gen endógeno.

"Provista exógenamente" describe una molécula proporcionada a los medios de cultivo de un cultivo celular.

"Exopolisacárido" significa un polisacárido que se secreta desde una célula al entorno extracelular.

"Filtrado" significa la porción de una muestra de filtración de flujo tangencial que ha pasado a través del filtro.

"Fuente de carbono fija" significa moléculas que contienen carbono que a temperatura y presión ambiente están presentes en forma sólida o líquida.

5 "Glicopolímero" significa una molécula biológicamente producida que comprende al menos dos monosacáridos. Ejemplos de glicopolímeros incluyen proteínas glicosiladas, polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos.

"Homogeneizado" significa biomasa celular que ha sido alterada. Un homogeneizado no es necesariamente homogéneo.

10 Un compuesto que puede ser "metabolizado por células" significa un compuesto cuyos componentes elementales se incorporan en productos producidos endógenamente por las células. Por ejemplo, un compuesto que contiene nitrógeno que puede ser metabolizado por las células es un compuesto que contiene al menos un átomo de nitrógeno por molécula que puede incorporarse en un metabolito producido de manera endógena que contiene nitrógeno, tal como un aminoácido.

15 "Microalgas" significa un organismo unicelular que es capaz de realizar la fotosíntesis. Las microalgas incluyen fotoautótrofos obligados, que no pueden metabolizar una fuente de carbono fija como energía, así como heterótrofos, que pueden vivir únicamente de la luz, únicamente de una fuente de carbono fija, o una combinación de ambos.

20 "Producido de forma natural" describe un compuesto que es producido por un organismo de tipo salvaje.

"Fotobiorreactor" significa un contenedor impermeable, al menos parcialmente transparente, que permite el paso de la luz, en donde se cultivan una o más células de microalgas. Los fotobiorreactores pueden sellarse, como en el caso de una bolsa de polietileno, o pueden estar abiertos al medio ambiente, como en el caso de un estanque.

25 El "material polisacárido" es una composición que contiene más de una especie de polisacárido y, opcionalmente, contaminantes tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, un homogeneizado de células de microalgas.

30 "Polisacárido" significa un compuesto o preparación que contiene una o más moléculas que contienen al menos dos moléculas sacáridas unidas covalentemente. Un "polisacárido", "endopolisacárido" o "exopolisacárido" puede ser una preparación de moléculas de polímero que tienen unidades repetitivas similares o idénticas pero diferentes pesos moleculares dentro de la población.

35 "Puerto", en el contexto de un fotobiorreactor, significa una abertura en el fotobiorreactor que permite la entrada o salida de materiales tales como gases, líquidos y células. Los puertos generalmente están conectados a tubos que conducen hacia y/o desde el fotobiorreactor.

40 "Microalgas rojas" significa algas unicelulares que pertenecen a la lista de clases que comprenden las especies *Bangiophyceae*, *Florideophyceae*, *Goniotrichales*, o son miembros de la *Rhodophyta*.

"Retenido" significa la porción de una muestra de filtración de flujo tangencial que no ha pasado a través del filtro.

45 "Molécula pequeña" significa una molécula que tiene un peso molecular de menos de 2000 daltons, en algunos casos menos de 1000 daltons, y en otros casos menos de 500 daltons o menos. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, compuestos heterocíclicos, compuestos carbocíclicos, esteroides, aminoácidos, lípidos, carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados.

50 Una molécula está " disponible en solvente" cuando la molécula se aísla hasta el punto en donde se puede disolverse en un disolvente, o se puede dispersar suficientemente en suspensión en el disolvente de manera que se pueda detectar en la solución o suspensión. Por ejemplo, un polisacárido es "disolvente disponible" cuando está lo suficientemente aislado de otros materiales, como aquellos con los que está asociado de forma natural, de manera que el polisacárido puede disolverse o suspenderse en un regulador acuoso y detectarse en solución usando el ensayo de azul de dimetilmetileno (DMMB) o fenol:ácido sulfúrico. En el caso de un polisacárido de alto peso molecular que contiene cientos o miles de monosacáridos, parte del polisacárido puede estar "disponible en solvente" cuando está en la capa más externa de la pared celular, mientras que otras partes de la misma molécula de polisacárido no están "disponibles en solvente". "porque están sepultadas dentro de la pared celular". Por ejemplo, en un cultivo de microalgas en donde el polisacárido está presente en la pared celular, hay poco polisacárido "disponible en el disolvente" ya que la mayoría del polisacárido de la pared celular está secuestrado dentro de la pared celular y no disponible para el disolvente. Sin embargo, cuando las células se rompen, por ejemplo, mediante sonicación, la cantidad de polisacárido "disponible en el disolvente" aumenta. La cantidad de polisacárido "accesible por solvente" antes y después de la homogeneización puede compararse tomando dos alícuotas de igual volumen de células del mismo cultivo, homogeneizando una alícuota y comparando el nivel de polisacárido en el disolvente de las dos alícuotas usando un ensayo DMMB. La cantidad de polisacárido accesible al disolvente en un

homogeneizado de células también se puede comparar con la presente en una cantidad de células del mismo tipo en un cultivo diferente necesario para generar la misma cantidad de homogeneizado.

"Sustancialmente libre de proteína" significa composiciones que son preferiblemente de alta pureza y sustancialmente libres de contaminantes potencialmente dañinos, incluyendo proteínas (por ejemplo, al menos grado National Food (NF), generalmente al menos grado analítico, y más típicamente al menos grado farmacéutico). Las composiciones son al menos 80, al menos 90, al menos 99 o al menos 99,9% p/p puras con respecto a contaminantes no deseados tales como proteínas que están sustancialmente libres de proteína. En la medida en que un compuesto dado debe sintetizarse antes de su uso, el producto resultante típicamente está sustancialmente libre de cualquier agente potencialmente tóxico, particularmente cualquier endotoxina, que puede estar presente durante el proceso de síntesis o purificación. Las composiciones se hacen generalmente bajo condiciones GMP. Las composiciones para administración parenteral son generalmente estériles y sustancialmente isotónicas.

I General

Los polisacáridos forman un grupo heterogéneo de polímeros de diferente longitud y composición. Se construyen a partir de residuos de monosacáridos que están unidos por enlaces glicosídicos. Los enlaces glicosídicos pueden estar ubicados entre la C₁ (o C₂) de un residuo de azúcar y la C₂, C₃, C₄, C₅ o C₆ del segundo residuo. Se produce un azúcar ramificado si están presentes más de dos tipos de enlaces en una sola molécula de monosacárido.

Los monosacáridos son azúcares simples con múltiples grupos hidroxilo. En función del número de carbonos (por ejemplo, 3, 4, 5 o 6), un monosacárido es una triosa, una tetrosa, una pentosa o una hexosa. Las pentosas y las hexosas pueden formar ciclos, ya que el grupo aldehído o ceto reacciona con un hidroxilo en uno de los carbonos distales. Ejemplos de monosacáridos son galactosa, glucosa y rhamnosa.

Los polisacáridos son moléculas que comprenden una pluralidad de monosacáridos unidos covalentemente entre sí a través de enlaces glicosídicos. Los polisacáridos que consisten en un número relativamente pequeño de unidades de monosacáridos, tales como 10 o menos, a veces se denominan oligosacáridos. El final del polisacárido con un carbono anomérico (C₁) que no está involucrado en un enlace glicosídico se llama el extremo reductor. Un polisacárido puede consistir en un tipo de monosacárido, conocido como un homopolímero, o dos o más tipos de monosacáridos, conocido como un heteropolímero. Ejemplos de homopolisacáridos son celulosa, amilosa, inulina, quitina, quitosano, amilopectina, glucógeno y pectina. La amilosa es un polímero de glucosa con enlaces glicosídicos α (1 → 4). La amilopectina es un polímero de glucosa con enlaces α (1 → 4) y ramificaciones formadas por enlaces α (1 → 6). Ejemplos de heteropolisacáridos son glucomanano, galactoglucomanano, xiloglucano, 4-O-metilglucuronoxilano, arabinoxilano y 4-O-metilglucuronarabinoxilano.

Los polisacáridos pueden modificarse estructuralmente tanto enzimática como químicamente. Ejemplos de modificaciones incluyen sulfatación, fosforilación, metilación, O-acetilación, acilación grasa, N-acetilación de amino, N-sulfatación, ramificación y lactonización de carboxilo.

Los glicosaminoglicanos son polisacáridos de disacáridos repetidos. Dentro de los disacáridos, los azúcares tienden a modificarse, con grupos ácidos, grupos amino, grupos hidroxilo sulfatados y grupos amino. Los glicosaminoglicanos tienden a estar cargados negativamente, debido a la prevalencia de grupos ácidos. Ejemplos de glicosaminoglicanos son heparina, condroitina y ácido hialurónico.

Los polisacáridos se producen en eucariotas principalmente en el retículo endoplásmico (ER) y el aparato de Golgi. Las enzimas de biosíntesis de polisacáridos generalmente se retienen en el ER, y se han identificado motivos de aminoácidos que imparten retención en ER (Gene. 2000 Dec 31; 261 (2): 321-7) Los polisacáridos también son producidos por algunos procariotas, como las bacterias del ácido láctico.

Los polisacáridos que se secretan de las células se conocen como exopolisacáridos. Muchos tipos de paredes celulares, en plantas, algas y bacterias, están compuestas de polisacáridos. Las paredes celulares se forman a través de la secreción de polisacáridos. Algunas especies, incluidas las algas y las bacterias, secretan polisacáridos que se liberan de las células. En otras palabras, estas moléculas no se mantienen en asociación con las células como lo están los polisacáridos de la pared celular. En cambio, estas moléculas se liberan de las células. Por ejemplo, los cultivos de algunas especies de microalgas secretan exopolisacáridos que se suspenden en los medios de cultivo.

II Métodos de producción de polisacáridos

A. Métodos de cultivo celular: microalgas

Los polisacáridos se pueden producir cultivando microalgas. Ejemplos de microalgas que se pueden cultivar para producir polisacáridos se muestran en la Tabla 1. También se enumeran referencias que permiten al experto en la técnica cultivar las especies de microalgas en condiciones suficientes para la producción de polisacáridos. También

se enumeran los números de cepas de diversas colecciones de algas disponibles públicamente, así como las cepas publicadas en revistas que requieren la difusión pública de reactivos como requisito previo para la publicación.

Tabla 1

Especies	Número de cepa/fuente	Referencia del método de purificación de cultivos y polisacáridos	Composición reportada de monosacáridos	Condiciones de cultivo
<i>Porphyridium cruentum</i>	UTEX ¹ 161	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	Xilosa, Glucosa, Galactosa, Ácido Glucónico	Cultivos obtenidos de diversas fuentes y fueron cultivados en caldo F/2 preparado con agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45um o agua destilada dependiendo de la tolerancia a la sal de las microalgas. Incubados a 25°C en matraces e iluminados con lámparas fluorescentes blancas.
<i>Porphyridium cruentum</i>	UTEX 161	Fabregas et al., Antiviral Research 44 (1999)-67-73	Xilosa, Glucosa, Galactosa y Ácido Glucorónico	Cultivado en tubos de vidrio de 80 ml con aireación de 100 ml/min y 10% de CO ₂ , durante 10s cada diez minutos para mantener el pH> 7.6. Mantenido a 22° en Periodicidad de luz/oscuridad 12:12. Luz a 152,3 umol/m ² /s. Salinidad 3.5% (nutriente enriquecido como Fabregas, 1984 modificado en 4 mmol Nitrógeno/L)
<i>Porphyridium</i> sp.	UTEX 637	Dvir, Brit. J. of Nutrition (2000), 84 469-476. [Revisión: S. Geresh Biosource Technology 38 (1991) 195-201]-Huleihel, 2003, Applied Spectroscopy, v57, No. 4 2003	Xilosa, glucosa y galactosa, metil hexosas, manosa, rhamnosa	Cultivo al aire libre durante 21 días en agua de mar artificial en mangas de polietileno. Véase Jones (1963) y Cohen y Malis Arad, 1989)
<i>Porphyridium aerugineum</i>	SAG ² 111.79	Talyshinsky, Marina Cancer Cell Int'l 2002, 2; Revisión: S. Geresh Biosource Technology 38 (1991) 195-201] I Véase Ramus_1972	xilosa, galactosa, hexosas glucosa, metil	véase Dubinsky et al. Plant Physiol. Y Biochem. (192) 30: 409-414. De acuerdo con Ramus_1972 -> Los cultivos axénicos se cultivan en medio líquido MCYII a 25 °C y se iluminan con tubos fluorescentes Cool White en un ciclo de luz oscuridad de 16:8 h. Las células se mantienen en suspensión por agitación en un agitador giratorio o por una corriente de aire filtrado.
<i>Porphyridium purpurpeum</i>	cepa 1380-1a	Schmitt D., Water Research Volume 35, Issue 3, March 2001, Pages 779-785, Bioprocess Biosyst Eng. 2002 Apr; 25 (1): 35-42. Epub 2002 Mar 6	desconocido	Véase referencia citada

Especies	Número de cepa/fuente	Referencia del método de purificación de cultivos y polisacáridos	Composición reportada de monosacáridos	Condiciones de cultivo
Chaetoceros sp.	USCE ³	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Véase referencia citada
Chlorella autotropica	USCE	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Véase referencia citada
Chlorella autotropica	UTEX 580	Fabregas et al., Antiviral Research 44 (1999)-67-73	desconocido	Cultivado en tubos de vidrio de 80 ml con aireación de 100 ml/min y 10% de CO ₂ , durante 10s cada diez minutos para mantener el pH> 7.6. Mantenido a 22 ° en Periodicidad de luz/oscuridad 12:12. Luz a 152,3 umol/m ² /s. Salinidad 3.5% (enriquecido con nutrientes como Fabregas, 1984)
Chlorella capsulata	UTEX LB2074	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478 (especie es a.k.a. Schizochlamydeella capsulata)	Desconocido	Cultivos obtenidos de diversas fuentes y fueron cultivados en caldo F/2 preparado con agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45um o agua destilada dependiendo de la tolerancia a la sal de microalgas. Incubados a 25 °C en matraces e iluminados con lámparas fluorescentes blancas.
Chlorella stigmatophora	GGMCC ⁴	S. Guzman, Phytotherapy Rscrh (2003) 17: 665-670	glucosa, ácido glucurónico, xilosa, ribosa/fucosa	Cultivado en 10 L de agua de mar filtrada con membrana (0,24 um) y esterilizado a 120 ° durante 30 min y enriquecido con medio Erd Schreiber. Cultivos mantenidos a 18 +/- 1 °C bajo 1% de CO ₂ constante en burbujeo
Dunalliella tertiolecta	DCCBC ⁵	Fabregas et al., Antiviral Research 44 (1999)-67-73	desconocido	Cultivado en tubos de vidrio de 80 ml con aireación de 100 ml/min y 10% de CO ₂ , durante 10s cada diez minutos para mantener el pH> 7.6. Mantenido a 22 ° en Periodicidad de luz/oscuridad 12:12. Luz a 152,3 umol/m ² /s. Salinidad 3.5% (enriquecido con nutrientes como Fabregas, 1984)

Especies	Número de cepa/fuente	Referencia del método de purificación de cultivos y polisacáridos	Composición reportada de monosacáridos	Condiciones de cultivo
<i>Dunalliella bardawil</i>	DCCBC	Fabregas et al., Antiviral Research 44 (1999)-67-73	desconocido	Cultivado en tubos de vidrio de 80 ml con aireación de 100 ml/min y 10% de CO ₂ , durante 10s cada diez minutos para mantener el pH> 7.6. Mantenido a 22 ° en Periodicidad de luz/oscuridad 12:12. Luz a 152,3 umol/m ² /s. Salinidad 3.5% (enriquecido con nutrientes como Fabregas, 1984)
<i>Isochrysis galbana</i> var. <i>tahitiana</i>	HCTMS ⁶	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Los cultivos se obtuvieron de diversas fuentes y se cultivaron en caldo F/2 preparado con agua de mar filtrada a través de una carga Millipore de 0.45um o agua destilada dependiendo de la tolerancia a la sal de las microalgas. Incubados a 25 °C en matraces e iluminados con lámparas fluorescentes blancas.
<i>Isochrysis galbana</i> var. <i>Tiso</i>	UTEX LB 987	Fabregas et al., Antiviral Research 44 (1999)-67-73	desconocido	Cultivado en tubos de vidrio de 80 ml con aireación de 100 ml/min y 10% de CO ₂ , durante 10s cada diez 22° minutos para mantener el pH> 7.6. Mantenido a 22 ° en Periodicidad de luz/oscuridad 12:12. Luz a 152,3 umol/m ² /s. Salinidad 3.5% (enriquecido con nutrientes como Fabregas, 1984)
<i>Isochrysis</i> sp.	CCMP ⁷	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Cultivos obtenidos de diversas fuentes y fueron cultivados en caldo F/2 preparado con agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45um o agua destilada dependiendo de la tolerancia a la sal de microalgas. Incubados a 25 °C en matraces e iluminados con lámparas fluorescentes blancas.
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	UTEX 642, 646, 2089	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Los cultivos se obtuvieron de diversas fuentes y se cultivaron en caldo F/2 preparado con agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45um o agua destilada dependiendo de la tolerancia de la vela a las microalgas. Incubados a 25 °C en matraces e iluminados con lámparas fluorescentes blancas.

Especies	Número de cepa/fuente	Referencia del método de purificación de cultivos y polisacáridos	Composición reportada de monosacáridos	Condiciones de cultivo
Phacodactylum tricornutum	GGMCC	S. Guzman, Phytotherapy Rscrh (2003) 17: 665-670	glucosa, ácido glucurónico y manosa	Cultivado en 10 L de agua de mar filtrada con membrana (0,24 um) y esterilizado a 120 ° durante 30 min y enriquecido con medio Erd Schreiber. Los cultivos se mantuvieron a 18 +/- 1 °C bajo burbujeo constante de CO ₂ al 1%.
Tetraselmis sp.	CCMP 1640; 2767 1634-UTEX	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Cultivos obtenidos de diversas fuentes y fueron cultivados en caldo F/2 preparado con agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45um o agua destilada dependiendo de la tolerancia a la sal de microalgas. Incubados a 25 °C en matraces e iluminados con lámparas fluorescentes blancas.
Botryococcus braunii	UTEX 572 y 2441	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Cultivos obtenidos de diversas fuentes y fueron cultivados en caldo F/2 preparado con agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45um o agua destilada dependiendo de la tolerancia a la sal de microalgas. Incubados a 25 °C en matraces e iluminados con lámparas fluorescentes blancas.
Chlorococcum	UTEX 105	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Cultivos obtenidos de diversas fuentes y fueron cultivados en caldo F/2 preparado con agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45um o agua destilada dependiendo de la tolerancia a la sal de microalgas. Incubados a 25 °C en matraces e iluminados con lámparas fluorescentes blancas.
Hormotilopsis gelatinosa	UTEX 104	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Cultivos obtenidos de diversas fuentes y fueron cultivados en caldo F/2 preparado con agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45um o agua destilada dependiendo de la tolerancia a la sal de microalgas. Incubados a 25 °C en matraces e iluminados con lámparas fluorescentes blancas.

Especies	Número de cepa/fuente	Referencia del método de purificación de cultivos y polisacáridos	Composición reportada de monosacáridos	Condiciones de cultivo
<i>Neochloris oleoabundans</i>	UTEX 1185	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Cultivos obtenidos de diversas fuentes y fueron cultivados en caldo F/2 preparado con agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45um o agua destilada dependiendo de la tolerancia a la sal de microalgas. Incubados a 25 °C en matraces e iluminados con lámparas fluorescentes blancas.
<i>Ochromonas Danica</i>	UTEX L1298	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Cultivos obtenidos de diversas fuentes y fueron cultivados en caldo F/2 preparado con agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45um o agua destilada dependiendo de la tolerancia a la sal de microalgas. Incubados a 25 °C en matraces e iluminados con lámparas fluorescentes blancas.
<i>Gyrodinium impudicum</i>	KG03; KG09; KGJOI	Yim, Joung Han et. Al., J. of Microbiol 2004, 305-14; Yim, J.H. (2000) Ph.D. Disertaciones, Universidad de Kyung Hee, Seúl	Dec. Homopolysacchari de galactosa con 2.96% de ácido urónico	Aislado del agua de mar recogida de la marea roja en aguas costeras de Corea. Mantenido en medio 172 a 22 ° bajo luz circadiana a 100uE/m ² /sec: ciclo de oscuridad de 14h:10h durante 19 días. Seleccionado con neomicina y/o cefalosporina 20ug/ml
<i>Ellipsoidon sp.</i>	Véanse referencias citadas	Fabregas et al., Antiviral Research 44 (1999)-67-73; Lewin, R.A. Cheng, L., 1989, Phycologia 28, 96-108	desconocido	Cultivado en tubos de vidrio de 80 ml con aireación de 100 ml/min y 10% de CO ₂ , durante 10s cada diez minutos para mantener el pH> 7.6. Mantenido a 22 ° en Periodicidad de luz/oscuridad 12:12. Luz a 152,3 umol/m ² /s. Salinidad 3.5% (enriquecido con nutrientes como Fabregas, 1984)
<i>Rhodella reticulata</i>	UTEX 2320	Talyshinsky, Marina Cancer Cell Int'l 2002, 2	desconocido	Véase Dubinsky O. et al. Composición del polisacárido de pared celular producido por algas rojas unicelulares <i>Rhodella reticulata</i> . 1992 Plant Physiology and biochemistry 30: 409-414

Especies	Número de cepa/fuente	Referencia del método de purificación de cultivos y polisacáridos	Composición reportada de monosacáridos	Condiciones de cultivo
<i>Rhodella maculata</i>	UTEX LB 2506	Evans, LV., Et al. J. Cell Sci 16, 1-21 (1974)); EVANS, L. V. (1970). Br. phycol.J. 5, 1-13.	Galactosa, xilosa, ácido glucurónico	Cultivado en medio SWM3 o ASP12, suplemento de MgCl ₂ . 100 ml en matraz Erlenmeyer volumétrico de 250 ml con agitación suave y luz fluorescente Northern Light de 4000 l durante 16 horas.
<i>Gymnodinium</i> sp.	Oku-1	Sogawa, K., et al., Life Sciences, vol. 66, No. 16, pp. PL 227-231 (2000)) Y Umermura, Ken: Biochemical Pharmacology 66 (2003) 481-487	desconocido	Véase referencia citada
<i>Spirulina platensis</i>	UTEX LB 1926	Kaji, T et. Al., Life Sci 2002 Mar 8; 70 (16): 1841-8 Schaeffer y Krylov (2000) Review-Ectotoxicology and Environmental Safety. 45, 208-227.	Na-Sp contiene dos repeticiones de disacáridos: ácido aldobiurónico y acofriosa + otros sacáridos menores e ion sodio	Véase referencia citada
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	Oku-2	Hasui., Et. Al., Int. J. Bio. Macromol. Volumen 17 No.5 1995.	manosa, galactosa, glucosa y ácido urónico	Precultivos cultivados en cónicos de 500 ml que contienen 300 ml de ESM (?) a 21,5°C durante 14 días en luz continua (3500 lux) en una cabina de crecimiento) y luego transferidos a un matraz cónico de 5 litros que contiene 3 litros de ESM. Cultivado 50 días y luego filtrado a través de filtro GFF Wortmann.
<i>Muscorum Nostoc</i>	PCC ⁸⁷⁴ 3, 7936, 8113	Sangar, VK Applied Micro. (1972)) & a.m. Burja et al Tetrahedron 57 (2001) 937-9377; Otero A., J Biotechnol. 2003 Apr 24; 102 (2): 143 - 52	desconocido	Crecimiento en condiciones de fijación de nitrógeno en medio BG-11 en cultivos aireados mantenidos en fase logarítmica durante varios meses. 250 ml de medio de cultivo que se dispusieron en una incubadora con temperatura controlada y se iluminaron continuamente con fotón de 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 30 °C.
<i>Cyanospira capsulata</i>	Véanse referencias citadas	A.M. Burja et al. Tetrahedron 57 937-9377 & Garozzo, D., Carbohydrate Res. 1998 307 113-124. Ascensio, F., Folia Microbiol (Praha). 2004; 49 (1): 64-70., Cesaro, A., et al., Int J Biol Macromol. 1990 Apr 12 (2): 79-84	desconocido	Véase referencia citada

Especies	Número de cepa/fuente	Referencia del método de purificación de cultivos y polisacáridos	Composición reportada de monosacáridos	Condiciones de cultivo
Cyanothece sp.	ATCC 51142	Ascensio F., Folia Microbiol (Praha). 2004; 49 (1): 64-70.	desconocido	Se mantuvo a 27 °C en medio ASN III con un ciclo claro/oscuras de 16/8 h bajo luz fluorescente de 3.000 lux de intensidad de luz. En Phillips, cada una de las 15 cepas se cultivaron fotoautótroficamente en medio de agua de mar enriquecida. Cuando se requirió, la cantidad de NaNO ₃ se redujo de 1.5 a 0.35 g/L. Cepas cultivadas axénicamente en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO ₂ durante 8 días bajo iluminación continua, con un flujo medio de fotones de 30 µmol de fotones/m ² /s durante los primeros 3 días de crecimiento y 80 µmol de fotones/m/s
Chlorella pirenoidosa	UTEX 343; UTEX 1806	Cheng_2004 Journal of Medicinal Food 7 (2) 146-152	desconocido	Véase referencia citada
Phaeodactylum tricornutum	CCAP 1052/1A	Fabregas et al., Antiviral Research 44 (1999)-67-73	desconocido	Cultivado en tubos de vidrio de 80 ml con aireación de 100m/min y 10% de CO ₂ , durante 10s cada diez minutos para mantener el pH> 7.6. Mantenido a 22 en Periodicidad de luz/oscuridad 12:12. Luz a 152,3 µmol/m ² /s. Salinidad 3.5% (enriquecido con nutrientes como Fabregas, 1984)
Chlorella autotrophica	USCE	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Véase referencia citada
Chlorella sp.	CCM	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Véase referencia citada
Dunaliella tertiolecta	USCE	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Véase referencia citada

Especies	Número de cepa/fuente	Referencia del método de purificación de cultivos y polisacáridos	Composición reportada de monosacáridos	Condiciones de cultivo
Isochrysis galabana	UTEX LB 987	Fabregas et al., Antiviral Research 44 (1999)-67-73	desconocido	Cultivado en tubos de vidrio de 80 ml con aireación de 100 ml/min y 10% de CO ₂ , durante 10s cada diez minutos para mantener el pH> 7.6. Mantenido a 22 ° en Periodicidad de luz/oscuridad 12:12. Luz a 152,3 umol/m ² /s. Salinidad 3.5% (enriquecido con nutrientes como Fabregas, 1984)
Tetraselmis tetratele	CCAP 66/1A-D	Fabregas et al., Antiviral Research 44 (1999)-67-73	desconocido	Cultivado en tubos de vidrio de 80 ml con aireación de 100 ml/min y 10% de CO ₂ , durante 10s cada diez minutos para mantener el pH> 7.6. Mantenido a 22 ° en Periodicidad de luz/oscuridad 12:12. Luz a 152,3 umol/m ² /s. Salinidad 3.5% (enriquecido con nutrientes como Fabregas, 1984)
Tetraselmis suecica	UTEX LB 2286	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Véase referencia citada
Tetraselmis suecica	CCAP 66 /4	Fabregas et al., Antiviral Research 44 (1999)-67-73 y Otero y Fabregas-Aquaculture 159 (1997) 111-123.	desconocido	Cultivado en tubos de vidrio de 80 ml con aireación de 100 ml/min y 10% de CO ₂ , durante 10s cada diez minutos para mantener el pH> 7.6. Mantenido a 22 ° en Periodicidad de luz/oscuridad 12:12. Luz a 152,3 umol/m ² /s. Salinidad 3.5% (enriquecido con nutrientes como Fabregas, 1984)
Botryococcus sudeticus	UTEX 2629	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Véase referencia citada
Chlamydomon como mexicana	UTEX 729	Moore y Tisher Science. 1964 7 de agosto; 145: 586-7.	desconocido	Véase referencia citada
Dysmorphococcus globosus	UTEX LB 65	M.A. Guzman-Murillo y F. Ascencio., Letters in Applied Microbiology 2000, 30, 473-478	desconocido	Véase referencia citada
Rhodella reticulata	UTEX LB 2320	S. Geresh et al., J Biochem. Biophys. Methods 50 (2002) 179-187 [Revisión: S. Geresh Biosource Technology 38 (1991) 195-201]	desconocido	Véase referencia citada

Especies	Número de cepa/fuente	Referencia del método de purificación de cultivos y polisacáridos	Composición reportada de monosacáridos	Condiciones de cultivo
Anabena cylindrica	ATCC 29414	Sangar, VK Appl Microbiol. 1972 Nov; 24 (5): 732-4	En pared vegativa, donde solo el 18% es carbohidrato, glucosa [35%], manosa [50%], galactosa, xilosa y fucosa. En la pared de heterocistos donde el 73% es carbohidrato glucosa 73% y manosa 21% con algo de galactosa y xilosa	Véase referencia citada
Anabena flosaquae	A37; JM Kingsbury Laboratory, Cornell University	Moore, BG [1965] Can J. Microbiol. Dec; 11 (6): 877-85	Glucosa y manosa	Véase referencia citada y APPLIED ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Apr. 1978, 718-723)
Mucosa de Palmella	Véanse referencias citadas	Sangar, VK Appl Microbiol. 1972 Nov; 24 (5): 732-4 ; Lewin RA., (1956) Can J Microbiol. 2: 665-672 ; Arch Mikrobiol. 1964 Aug 17; 49: 158-66	desconocido	Véase referencia citada
Anacystis nidulans	PCC 6301	Sangar, VK Appl Microbiol. 1972 Nov; 24 (5): 732-4	Glucosa, galactosa, manosa	Véase referencia citada
Phormidium 94a	Véase referencia citada	Vicente-Garcia V. y otros, Biotechnol Bioeng. 2004 Feb 5; 85 (3): 306-10	Galactosa, manosa, ácido galacturónico, arabinosa y ribosa	Se cultivó en 2 l de medio BG-II a 28° C. Se añadió acetona para precipitar el exopolisacárido.
Anabaenaopsis circularis	1402/1 ⁹	David KA, Fay P. Appl Environ Microbiol. 1977 Dic; 34 (6): 640-6	desconocido	Véase referencia citada
Aphanocapsa halophytia	MN-11	Sudo H., et al., Current Microbiology vol. 30 (1995), pp.219-222	Rhamnosa; manosa, fucosa; galactosa; xilosa; glucosa en proporción de: 15: 53: 3: 3:25	Cultivado aeróbicamente durante 20 días en medio a base de agua de mar, con 8% de NaCl y 40 mg/l de NaHPO ₄ . El nitrato cambió el contenido de exopolisacárido. La densidad celular más alta se obtuvo del cultivo suplementado con 100 mg/l de NaNO ₃ . Se podría agregar fósforo (40 mg/l) para controlar la biomasa y la concentración de exopolisacáridos.
Aphanocapsa sp	Véase referencia	De Philippis R et al., Sci Total Environ. 2005 Nov 2;	desconocido	Incubados a 20 y 28 °C con luz artificial en u flujo de fotones de 5-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Especies	Número de cepa/fuente	Referencia del método de purificación de cultivos y polisacáridos	Composición reportada de monosacáridos	Condiciones de cultivo
Cylindrotheca sp	Véase referencia	De Philippis R et al., Sci Total Environ. 2005 Nov 2;	Ácido Glucurónico, Ácido Galacturónico, Glucosa, Manosa, Arabinosa, Fructosa y Rhamnosa	Cultivos madre enriquecidos incubados a 20 y 28 °C con luz artificial en un flujo de fotones de 5-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La producción de exopolisacáridos se realizó en tubos de vidrio que contenían 100 ml de cultivo a 28 °C con iluminación continua a una densidad de fotón de 5-10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
Navicula sp	Véase referencia	De Philippis R et al., Sci Total Environ. 2005 Nov 2;	Ácido Glucurónico, Ácido Galacturónico, Glucosa, Manosa, Arabinosa, Fructosa y Rhamnosa	Incubados a 20 y 28 °C con luz artificial a un flujo de fotones de 5-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La producción de EPS se realizó en tubos de vidrio que contenían 100 ml de cultivo a 28 °C con iluminación continua a una densidad de fotón de 5-10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
Gloeocapsa sp	Véase referencia	De Philippis R et al., Sci Total Environ. 2005 Nov 2;	desconocido	Incubados a 20 y 28 °C con luz artificial a un flujo de fotones de 5-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
Gloeocapsa alpicola	Véanse referencias citadas	J Appl Microbiol. 2005; 98 (1): 114-20; Photochem Photobiol. 1982 Mar; 35 (3): 359-64; J Gen Microbiol. 1977 Jan; 98 (1): 277-80; Arch Microbiol. 1976 Feb; 107 (1): 93-7; FEMS Microbiol Lett. 2002 Sep 10; 214 (2): 229-33	desconocido	Véanse referencias citadas
Phaeocystis pouchetii	Véanse referencias citadas	Toxicología. 2004 Jul 1; 1 99 (2-3): 207-17; Toxicon 2003 Jun; 41 (7): 803-12; Protista. 2002 Sep; 153 (3): 275-82; J Virol. 2005 Jul; 79 (14): 9236-43; J Bacteriol. 1961 Jul; 82 (1): 72-9	desconocido	Véanse referencias citadas
Leptolyngbya sp	Véase referencia	De Philippis R et al., Sci Total Environ. 2005 Nov 2;	desconocido	Incubados a 20 y 28 °C con luz artificial a un flujo de fotones de 5-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
Symploca sp.	Véase referencia	De Philippis R et al., Sci Total Environ. 2005 Nov 2;	desconocido	Incubados a 20 y 28 °C con luz artificial a un flujo de fotones de 5-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Especies	Número de cepa/fuente	Referencia del método de purificación de cultivos y polisacáridos	Composición reportada de monosacáridos	Condiciones de cultivo
<i>Synechocystis</i>	PCC 6714 /6803	Jurgens UJ, Weckesser J. J Bacteriol. 1986 Nov; 168 (2): 568-73	Glucosamina, manosamina, galactosamina, manosa y glucosa	Cultivado fotoautótroficamente en medio BG-II, pH 7,5 a 25 °C. Cultivos en masa preparados en un fermentador de 12 litros y gaseados por aire y dióxido de carbono a caudales de 250 a 2.5 litros/h, con iluminación de lámparas fluorescentes blancas a una intensidad de luz constante de 5,000 lux.
<i>Stauroncis decipiens</i>	Véase referencia	Lind, JL (1997) Planta 203: 213-221	desconocido	Véase referencia citada
<i>Achnanthes brevipes</i>	Indiana University Culture Collection	Holdsworth, RH., Cell Biol. 1968 Jun; 37 (3): 831-7; Acta Cient Venez. 2002; 53 (1): 7-14.; J. Phycol 36 pp. 882-890 (2000)	desconocido	Véase referencia citada
<i>Achnanthes longipes</i>	Strain 330 del National Institute for Environmental Studies	Wang, Y., et al., Plant Physiol. 1997 Apr; 113 (4): 1071-1080.	desconocido	Véase referencia citada

Las microalgas se cultivan preferiblemente en medios líquidos para la producción de polisacáridos. Los parámetros de las condiciones de cultivo se pueden manipular para optimizar la producción total de polisacáridos y para alterar la estructura de los polisacáridos producidos por las microalgas.

Los medios de cultivo de microalgas generalmente contienen componentes tales como una fuente fija de nitrógeno, oligoelementos, un regulador para el mantenimiento del pH y fosfato. Otros componentes pueden incluir una fuente de carbono fija tal como acetato o glucosa, y sales tales como cloruro de sodio, particularmente para microalgas de agua de mar. Ejemplos de oligoelementos incluyen zinc, boro, cobalto, cobre, manganeso y molibdeno en, por ejemplo, las formas respectivas de $ZnCl_2$, H_3BO_3 , $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ y $(NH_4)_6Mes_7O_{24} \cdot 4H_2O$.

Algunas especies de microalgas pueden crecer utilizando una fuente fija de carbono como la glucosa o el acetato. Dichas microalgas se pueden cultivar en biorreactores que no permiten el ingreso de la luz. Alternativamente, tales microalgas también se pueden cultivar en fotobiorreactores que contienen fuente fija de carbono y permiten que la luz incida en las células. Tal crecimiento se conoce como crecimiento heterotrófico. Cualquier cepa de microalgas, incluidas las enumeradas en la Tabla 1, se puede cultivar en presencia de una o más fuentes fijas de carbono, incluidas las enumeradas en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2

2,3-Butanodiol
2-Aminoetanol
2'-Desoxiadenosina
3-Metil Glucosa
Ácido acético
Adenosina
Adenosina-5'-monofosfato
Adonitol
Amigdalina

Arbutin
Ácido bromosuccínico
Ácido Cis-Aconítico
Ácido cítrico
D, L-carnitina
ácido D, L-láctico
D, fosfato de L- α -glicerol
D-alanina
D-Arabitol
D-celobiosa
Dextrina
D-Fructosa
D-fructosa-6-fosfato
Ácido D-Galactónico Lactona
D-galactosa
Ácido D-Galacturónico
Ácido D-glucónico
Ácido D-Glucosamínico
D-Glucosa
D-Glucosa-6-Fosfato
Ácido D-Glucurónico
Éster metílico del ácido D-láctico
D-L- α -Glicerol Fosfato
Ácido D-Málico
D-manitol
D-Manosa
D-Melezitosa
D-Melibiosa
D-Psicosa
D-Rafinosa
D-Ribosa
Ácido D-Sacárico
D-Serina
D-Sorbitol
D-Tagatosa
D-Trehalosa
D-xilosa
Ácido fórmico
Gentiobiosa
Glucuronamida
Glicerol

Glucógeno
Ácido Glicil-L-Aspártico
Ácido Glicil-L-Glutámico
Hidroxi-L-Prolina
i-eritritol
Inosina
Inulina
Ácido itacónico
Lactamida
Lactulosa
L-Alaninamida
L-alanina
L-Alanilglicina
L-Alanil-Glicina
L-Arabinosa
L-Asparagina
Ácido L-aspártico
L-Fucosa
Ácido L-Glutámico
L-Histidina
Ácido láctico
L-Leucina
Ácido L-Málico
L-ornitina
L-fenilalanina
L-Prolina
Ácido L-Piroglutámico
L-Rhamnosa
L-Serina
L-treonina
Ácido malónico
Maltosa
Maltotriosa
Manano
m-Inositol
N-Acetil-D-Galactosamina
N-Acetil-D-Glucosamina
Ácido N-Acetil-L-Glutámico
N-acetil- β -D-Manosamina
Palatinosa
Feniletilamina

Ácido p-hidroxi-fenilacético
Ácido propiónico
Putrescina
Ácido pirúvico
Éster metílico del ácido pirúvico
Ácido Quínico
Salicina
Ácido sebácico
Sedoheptulosano
Estaquiosa
Ácido succinámico
Ácido succínico
Ácido succínico
Ácido succínico mono-metil-éster
Sacarosa
Timidina
Timidina-5'-Monofosfato
Turanosa
Tween 40
Tween 80
Uridina
Uridina-5'-Monofosfato
Ácido urocénico
Agua
Xilitol
 α -ciclodextrina
 α -D-Glucosa
 α -D-Glucosa-1-fosfato
 α -D-Lactosa
Ácido α -hidroxibutírico
Ácido α -ceto butírico
Ácido α -ceto glutárico
Ácido α -Ceto Valérico
Ácido α -Cetoglutárico
Ácido α -Cetovalérico
 α -Metil-D-Galactósido
 α -metil-D-Glucósido
 α -Metil-D-Manósido
Ácido β -ciclodextrina β -hidroxibutírico
 β -Metil-D-Galactósido
 β -Metil-D-Glucósido

Ácido γ-amino butírico

Ácido γ-hidroxibutírico

Tabla 3

(2-amino-3,4-dihidroxi-5-hidroximetil)-1-ciclohexil)glucopiranosido

(3,4-disinapoil)fructofuranosil-(6-sinapoil)glucopiranosido

(3-sinapoil)fructofuranosil-(6-sinapoil)glucopiranosido

1 referencia

1,10-di-O-(2-acetamido-2-desoxiglucopiranosil)-2-azi-1,10-decanodiol

1,3-manosilmanosa

1,6-anhidrolactosa

1,6-anhidrolactosa hexaacetato

1,6-diclorosacarosa

1-clorosacarosa

1-desoxi-1-glicinomaltosa

1-O-alfa-2-acetamido-2-desoxiglactopiranosil-inositol

1-O-metil-di-N-trifluoroacetil-beta-chitobiósido

1-propil-4-O-beta galactopiranosil-alfa galactopiranosido

2-(acetilamino)-4-O-(2-(acetilamino)-2-desoxi-4-O-sulfogalactopiranosil)-2-desoxiglucosa

2-(trimetilsilil)etil lactósido

2,1', 3', 4', 6'-penta-O-acetilsacarosa

2,2'-O-(2,2'-diacetamido-2,3,2',3'-tetradexi-6,6'-di-O-(2-tetradecilhexadecanoil)-alfa, alfa'-trehalosa-3,3'- diil)bis(N-lactoil-alanil-isoglutamina)

2,3,6,2',3',4',6'-hepta-O-acetilcellobiosa 2,3'-anhidrosacarosa

2,3-di-O-fitanil-1-O-(manopiranosil-(2-sulfato)-(1-2)-glucopiranosil)-sn-glicerol

2,3-epoxipropil	O-galactopiranosil(1-6)galactopiranosido	2,3-isoprolilideneerthrofuranosil	2,3-O-
isopropylideneerythrofuranósido			

2,3-epoxipropil	O-galactopiranosil	(1-6)galactopiranosido	2,3-isoprolilideneerthrofuranosil	2,3-O-
isopropylideneerythrofuranósido				

2', 4'-dinitrofenilo 2-desoxi-2-fluoro-beta-xilobiósido

2,5-anhidromanitol-iduronato

2,6-sialilactosa

2-acetamido-2,4-didesoxi-4-fluoro-3-O-galactopiranosilglucopiranososa

2-acetamido-2-desoxi-3-O-(gluco-4-enepiranosilurónico)glucosa

2-acetamido-2-desoxi-3-O-ramnopiranosilglucosa

2-acetamido-2-desoxi-6-O-betagalactopiranosilgalactopiranososa

2-acetamido-2-desoxiglucosilgalactitol

2-acetamido-3-O-(3-acetamido-3,6-dideoxi-beta-glucopiranosil)-2-desoxi-galactopiranososa

2-amino-6-O-(2-amino-2-desoxi-glucopiranosil)-2-desoxiglucosa

2-azido-2-desoximanopiranosil-(1,4)-rhamnopiranososa

2-desoxi-6-O-(2,3-didesoxi-4,6-O-isopropilideno-2,3-(N-tosilepimino)manopiranosil)-4,5-O-isopropilideno-1,3-di-N-tosilstreptamina

2-desoximaltosa

2-yodobencil-1-tiocelbióxido

2-N-(4-benzoil) benzoil-1,3-bis(manos-4-iloxi)-2-propilamina
 2-nitrofenil-2-acetamido-2-desoxi-6-O-beta galactopiranosil-alfa galactopiranosido
 2-O-(ácido glucopiranosilurónico)xilosa
 2-O-glucopiranosilribitol-1-fosfato
 2-O-glucopiranosilribitol-4'-fosfato
 2-O-ramninopiranosil-ramnpiranosil-3-hidroxildecanoil-3-hidroxidodecanoato
 2-O-talopiranosilmanopiranosido
 2-tiokojibiosa
 2-tiosoforosa
 3,3'-neotrehalosadamina
 3,6,3', 6'-dianhidro(galactopiranosilgalactopiranosido)
 3,6-di-O-metil-beta-glucopiranosil-(1-4)-2,3-di-O-metil-alfa-ramnopiranosida
 3-amino-3-desoxialtropiranosil-3-amino-3-desoxialtropiranosido
 3-desoxi-3-fluorosacarosa
 3-desoxi-5-O-ramnopiranosil-2-octulopiranosonato
 3-Acido (alfa-2-4)-3-desoxioctulosónico
 3-desoxisacarosa
 3-cetolactosa
 3-cetosacarosa
 3-cetotrehalosa
 3-metilactosa
 3-O-(2-acetamido-6-O-(N-acetilneuraminil)-2-desoxigalactosil)serina
 3-O-(ácido glucopiranosilurónico)galactopiranosida
 3-O-beta-glucuronosilgalactosa
 3-O-fucopiranosil-2-acetamido-2-desoxiglucopiranosida
 3'-O-galactopiranosil-1-4-O-galactopiranosilcitrarabina
 3-O-galactosilarabinosa 3-O-talopiranosilmanopiranosido
 3-trehalosamina
 4-(trifluoroacetamido)fenil-2-acetamido-2-desoxi-4-O-beta-manopiranosil-beta-glucopiranosido
 4,4', 6,6'-tetracloro-4,4',6,6'-tetradexigalactotrehalosa
 4,6,4', 6'-dianhidro(galactopiranosilgalactopiranosido)
 4,6-didesoxisacarosa
 4,6-O-(1-etoxi-2-propenilideno)sacarosa-hexaacetato
 4-cloro-4-desoxi-alfa-galactopiranosilo3,4-anhidro-1,6-dicloro-1,6-didesoxi-beta-lixo-hexulofuranosida
 4-glucopiranosilmanosa
 4-metillumbeliferilcelobiósido
 4-nitrofenil 2-fucopiranosil-fucopiranosido
 4-nitrofenil 2-O-alfa-D-galactopiranosil-alfa-D-manopiranosida
 4-nitrofenil 2-O-alfa-D-glucopiranosil-alfa-D-manopiranosida
 4-nitrofenil 2-O-alfa-D-manopiranosil-alfa-D-manopiranosida
 4-nitrofenil 6-O-alfa-D-manopiranosil-alfa-D-manopiranosida

4-nitrofenil-2-acetamido-2-desoxi-6-O-beta-D-galactopiranosil-beta-D-glucopiranosido
 4-O-(2-acetamido-2-desoxi-beta-glucopiranosil)ribitol
 Ácido 4-O-(2-amino-2-desoxi-alfa-glucopiranosil)-3-desoxi-mano-2-octulosónico
 4-O-(ácido glucopiranosilurónico)xilosa 4-O-acetil-alfa-N-acetilneuraminil-(2-3)-lactosa
 4-O-alfa-D-galactopiranosil-D-galactosa
 4-O-galactopiranosil-3,6-anhidrogallactosa dimetilacetal
 4-O-galactopiranosilxilosa
 4-O-manopiranosil-2-acetamido-2-desoxiglucosa
 4-tioxilobiosa 4-trehalosamina
 Ácido 4-trifluoroacetamidofenil-2-acetamido-4-O-(2-acetamido-2-desoxiglucopiranosil)-2-desoximanopiranosidurónico
 5-bromoindoxil-beta-celobiósido
 5'-O-(fructofuranosil-2-1-fructofuranosil)piridoxina
 5-O-beta-galactofuranosil-galactofuranosa
 6 beta-galactinol
 6(2)-tiopanosa
 6,6'-di-O-corinomycolil-alfa-manopiranosil-alfa-manopiranosido
 6,6-di-O-maltosil-beta-ciclodextrina
 6,6'-di-O-micoloil-alfa-manopiranosil-alfa-marmopiranosido
 6-cloro-6-desoxisacarosa
 6-desoxi-6-fluorosacarosa
 ácido 6-desoxi-alfa-gluco-piranosidurónico
 6-desoxi-gluco-heptopiranosilo 6-desoxi-glucoheptopiranosido
 6-desoxisacarosa
 6-O-decanoil-3,4-di-O-isobutirilsacarosa
 6-O-galactopiranosil-2-acetamido-2-desoxigallactosa
 6-O-galactopiranosilgalactosa
 6-O-heptopiranosilglucopiranosil
 6-tiosacarosa
 7-O-(2-amino-2-desoxiglucopiranosil) heptosa
 8-metoxicarboniloctil-3-O-glucopiranosil-manopiranosido
 Ácido 8-O-(4-amino-4-desoxiarabinopiranosil)-3-desoxioctulosónico
 alolactosa
 alosacarosa
 6-O-(ácido 3-desoxioct-2-ulopiranosilónico)-(1-6)-2-desoxi-2-(3-hidroxitetradecanamido)glucopiranosido 4-fosfato de alilo
 Ácido alfa-(2-9)-disialico
 alfa alfa-trehalosa 6,6'-difosfato
 alfa-glucopiranosil alfa-xilopiranosido
 alfa-maltosil fluoruro
 aprosulato
 bencilo 2-acetamido-2-desoxi-3-O-(2-O-metil-beta-galactosil)-beta-glucopiranosido
 bencilo 2-acetamido-2-desoxi-3-O-beta-fucopiranosil-alfa-galactopiranosido

bencilo 2-acetamido-6-O-(2-acetamido-2,4-dideoxi-4-fluoroglucopiranosil)-2-desoxigalactopiranosido
gentiobiósido de bencilo
beta-D-galactosil (1-3)-4-nitrofenil-N-acetil-alfa-D-galactosamina
beta-metilmelibiosa
fosfato de calcio sacarosa
camiglibosa
celofán
ácido celobiónico
celobionolactona
Celobiosa
octaacetato de celobiosa
heptaacetato de bromuro de celobiosilo
Celsior
quitobiosa
condrosina
Cristolax
metil beta-manobiósido deuterado
dextrinmaltosa
D-glucopiranosa, O-D-glucopiranosilo
Sacarosa dietética
anhídrido de difructosa I
anhídrido de difructosa III
anhídrido de difructosa IV
ácido digalacturónico
DT 5461
ediol
epilactosa
épsilon-N-1-(1-desoxilactulosil)lisina
feruloil arabinobiosa
Floridósido
fructofuranosil-(2-6)-glucopiranosido
FZ 560
galactosil-(1-3)galactosa
garamina
gentiobiosa
geranil 6-O-alfa-L-arabinopiranosil-beta-D-glucopiranosido
geranil 6-O-xilopiranosil-glucopiranosido
Monofosfato de glucosaminil-1,6-inositol-1,2-cíclico
glucosil (1-4) N-acetilglucosamina
glucuronosil (1-4)-rhamnosa
heptosil-2-ceto-3-desoxioctonato

inulobiosa
 Isomaltosa
 isomaltulosa
 isoprimeverosa
 kojibiosa
 ácido lactobiónico
 lacto-N-biosa II
 Lactosa
 lactosilurea
 Lactulosa
 laminarribiosa
 lepidimoide
 leucrosa
 levanbiosa
 lucidin 3-O-beta-primverosida
 LW 10121
 LW 10125
 LW 10244
 maltal
 maltitol
 Maltosa
 hexaestearato de maltosa
 maltosa-maleimida
 heptaacetato de maltosilnitrometano
 maltosiltriotoxicolesterol
 maltotetraosa
 Malun 25
 manosacarosa
 manosil-(1-4)-N-acetilglucosaminil-(1-N)-urea
 manosil (2)-N-acetil (2)-glucosa
 ácido melibiónico
 Melibiosa ácido melibiourónico
 metil 2-acetamido-2-desoxi-3-O-(ácido alfa-idopiranosilurónico)-4-O-sulfo-beta-galactopiranosido
 metil 2-acetamido-2-desoxi-3-O-(ácido beta-glucopiranosilurónico)-4-O-sulfo-beta-galactopiranosido
 metil 2-acetamido-2-desoxi-3-O-glucopiranosiluronoilglucopiranosido
 metil 2-O-alfa-ramnopiranosil-beta-galactopiranosido
 metil 2-O-beta-ramnopiranosil-beta-galactopiranosido

 metil 2-O-fucopiranosilfucopiranosido 3 sulfato
 metil 2-O-manopiranosilmanopiranosido
 metil 2-O-manopiranosil-rhamnopiranosido
 metil 3-O-(2-acetamido-2-desoxi-6-tiogluconopiranosil)galactopiranosido

metil 3-O-galactopiranosilmanopiranósido
 metil 3-O-manopiranosilmanopiranósido
 metil 3-O-manopiranosiltalopiranósido
 metil 3-O-talopiranosiltalopiranósido
 metil 4-O-(6-desoxi-manto-heptopiranosil)galactopiranósido
 6-O-acetil-3-O-benzoil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzoilgalactopiranosil)-2-desoxi-2-ftalimidoglucopeiranósido metilo
 metil 6-O-manopiranosilmanopiranósido
 metil beta-xilobiósido
 metil fucopiranosil (1-4)-2-acetamido-2-desoxiglucopiranósido
 metil laminarabiósido
 metil O-(3-desoxi-3-fluorogalactopiranosil) (1-6)galactopiranósido
 ácido metil-2-acetamido-2-desoxiglucopiranosil-1-4-glucopiranosidurónico
 metil-2-O-fucopiranosilfucopiranósido 4-sulfato
 MK 458
 N (1)-2-carboxi-4,6-dinitrofenil-N (6)-lactobionoil-1,6-hexanodiamina
 N-(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-1,2-bis(manos-4'-yoxi) propil-2-amina
 N-(2'-mercaptoetil)lactamina
 N-(2-nitro-4-azofenil)-1,3-bis(manos-4'-iloxi) propil-2-amina
 N-(4-azidosalicilamida)-1,2-bis(manos-4'-iloxi) propil-2-amina
 N, N-diacetilocitobiosa
 N-acetilcondrina
 N-acetildermosina
 N-acetilgalactosaminil-(1-4)-galactosa
 N-acetilgalactosaminil-(1-4)-glucosa
 N-acetilgalactosaminil-1-4-N-acetilglucosamina
 N-acetilgalactosaminil-1-4-N-acetilglucosamina
 N-acetilgalactosaminil-alfa (1-3)galactosa
 N-acetilglucosamina-N-acetilmuramil-alanil-isoglutaminil-alanil-glicerol dipalmitoil
 N-acetilglucosaminil beta (1-6) N-acetilgalactosamina
 N-acetilglucosaminil-1-2-manopiranososa
 Ácido N-acetilhialobiurónico
 N-acetilneuraminoyllactose
 Éster de sulfato de N-acetilneuraminolactosa
 N-acetilneuraminil-(2-3)-galactosa
 N-acetilneuraminil-(2-6)-galactosa
 N-bencil-4-O-(beta-galactopiranosil) glucamina-N-carboditioato
 neoagarobiosa
 N-formilkansosaminil-(1-3)-2-O-metilrhamnopiranososa
 Ácido O-((Nalfa)-acetilglucosamina 6-sulfato)-(1-3)-idónico
 O-(4-O-feruloil-alfa-xilopiranosil)-(1-6)-glucopiranososa
 O-(ácido alfa-idopiranosilurónico)-(1-3)-2,5-anhidroalditol-4-sulfato

O-(ácido glucurónico 2-sulfato)-(1--3)-O-(2,5)-andrydrotalitol 6-sulfato
O-(ácido glucurónico 2-sulfato)-(1-4)-O-(2,5)-anhidromanitol-6-sulfato
O-alfa-glucopiranosiluronato-(1-2)-galactosa
O-beta-galactopiranosil-(1-4)-O-beta-xilopiranosil-(1-0)-serina
octil maltopiranosido
O-demetilpaulomicina A
O-demetilpaulomicina B
O-metil-di-N-acetil beta-quitobiósido
Palatinit
paldimicina
paulomenol A
paulomenol B
paulomicina A
paulomicina A2
paulomicina B
paulomicina C
paulomicina D
paulomicina E
paulomicina F
fenil 2-acetamido-2-desoxi-3-O-beta-D-galactopiranosil-alfa-D-galactopiranosido
fenil O-(2,3,4,6-tetra-O-acetilgalactopiranosil)-(1-3)-4,6-di-O-acetil-2-desoxi-2-phthalimido-1-tioglucopiranosido
poly-N-4-vinylbencil lactonamida
pseudo-celobiosa
pseudomalosa
ramnopoliranosil-(1-2)-ramnopoliranosido-(1-metil-éter)
rhoifolina
ácido ruberítrico
S-3105
senfolomicina A
senfolomicina B
solabiosa
SS 554
estreptobiosamina
Sucralfato
Sacarosa
isobutirato de acetato de sacarosa
caproato de sacarosa
diestearato de sacarosa
monolaurato de sacarosa
monopalmitato de sacarosa
monoestearato de sacarosa

miristato de sacarosa
 octaacetato de sacarosa
 sacarosa, ácido octabenzóico
 octaisobutirato de sacarosa
 octasulfato de sacarosa
 poliéster de sacarosa
 sulfato de sacarosa
 swertiamacrósido
 T-1266
 tangshenósido I
 tetrahidro-2-((tetrahidro-2-furanil) oxi)-2H-pirano
 tionigerosa
 Trehalosa
 trehalosa 2-sulfato
 trehalosa 6,6'-dipalmitato
 trehalosa-6-fosfato
 Trehalulosa
 Trehazolina
 triclorosacarosa
 tunicamina
 turanosa
 U 77802
 U 77803
 xilobiosa
 xilosa-glucosa
 xilosacarosa

- Las microalgas contienen maquinaria fotosintética capaz de metabolizar fotones y transferir la energía recolectada de los fotones a fuentes fijas de energía química como el monosacárido. La glucosa es un monosacárido común producido por microalgas al metabolizar la energía de la luz y fijar el carbono del dióxido de carbono. Algunas microalgas también pueden crecer en ausencia de luz en una fuente fija de carbono que se proporciona exógenamente (por ejemplo, véase *Planta Physiol.* 2005 Feb; 137 (2): 460-74) Además de ser una fuente de energía química, los monosacáridos tales como la glucosa también son sustrato para la producción de polisacáridos (véase el Ejemplo 14). La divulgación proporciona métodos de producción de polisacáridos con nuevas composiciones de monosacáridos. Por ejemplo, las microalgas se cultivan en presencia de medios de cultivo que contienen monosacáridos proporcionados exógenamente, tales como glucosa. El monosacárido es absorbido por la célula mediante transporte activo o pasivo y se incorpora a las moléculas de polisacárido producidas por la célula. Este nuevo método de manipulación de la composición de polisacáridos se puede realizar con, por ejemplo, cualquier microalga enumerada en la Tabla 1 que utilice cualquier monosacárido o disacárido enumerado en las Tablas 2 o 3.
- En una descripción, la fuente fija de carbono es una o más seleccionadas entre glucosa, galactosa, xilosa, manosa, rhamnosa, N-acetilglucosamina, glicerol, floridosida y ácido glucurónico. Los métodos se pueden practicar el crecimiento celular en presencia de al menos aproximadamente
- 5.0 µM, al menos aproximadamente 10 µM al menos aproximadamente 15,0 µM, al menos aproximadamente 20,0 µM, al menos aproximadamente 25.0 µM, al menos aproximadamente 30,0 µM, al menos aproximadamente 35,0 µM, al menos aproximadamente 40,0 µM, al menos aproximadamente 45.0 µM, al menos aproximadamente 50,0 µM, al menos aproximadamente 55,0 µM, al menos aproximadamente 60,0 µM, al menos aproximadamente 75.0 µM, al menos aproximadamente 80,0 µM, al menos aproximadamente 85,0 µM, al menos aproximadamente 90,0 µM, al menos aproximadamente 95.0 µM, al menos aproximadamente 100,0 µM, o al menos aproximadamente 150,0 µM, de una o más fuentes de carbono fijas provistas exógenamente seleccionadas de las Tablas 2 y 3.

En algunas realizaciones que usan células del género *Porphyridium*, los métodos incluyen el uso de aproximadamente 0,5-0,75% de glicerol como fuente fija de carbono cuando las células se cultivan en presencia de luz. Alternativamente, se puede usar un intervalo de glicerol de aproximadamente 4,0% a aproximadamente 9,0% cuando las células de *Porphyridium* se cultivan en la oscuridad, más preferiblemente de 5,0% a 8,0%, y más preferiblemente 7,0%.

Después de cultivar las microalgas en presencia de la fuente de carbono proporcionada exógenamente, la composición de monosacáridos del polisacárido se puede analizar cómo se describe en el Ejemplo 5.

Los medios de cultivo de microalgas pueden contener una fuente fija de nitrógeno como KNO_3 . Alternativamente, las microalgas se colocan en condiciones de cultivo que no incluyen una fuente fija de nitrógeno. Por ejemplo las células de *Porphyridium sp.* se cultivan durante un primer período de tiempo en presencia de una fuente fija de nitrógeno, y luego las células se cultivan en ausencia de una fuente fija de nitrógeno (véase, por ejemplo, Adda M., Biomass 10: 131-140. (1986); Sudo H., et al., Current Microbiology vol. 30 (1995), pp. 219-222; Marinho-Soriano E., Bioresour Technol. 2005 Feb; 96 (3): 379-82; Bioresour. Technol. 42: 141 - 147 (1992)). Si bien la invención no está limitada por la teoría, es bien aceptado por los expertos en la técnica que el color rojo de *Porphyridium* se debe a la proteína pigmentada de recolección de luz roja phycoerythrin (por ejemplo, véase Fujimori y Pecci, subunidades distintas de ficoeritrina de *Porphyridium cruentum* y sus características espectrales, Arch. Biochem. Biophys. 118, 448-55 1967).

En el cultivo de *Porphyridium* en presencia de niveles reducidos de nitrógeno, las células degradan la ficoeritrina, lo que resulta en una disminución significativa en la cantidad de pigmentación roja. Debido a que la ficoeritrina constituye más del 2% del peso seco de Células de *Porphyridium* en condiciones de repleción de nitrógeno (véase, por ejemplo, M.M. Reboloso Fuentes 2000, Food Chemistry, 70; 345-353), este proceso catabólico permite reciclar una cantidad significativa de nitrógeno fijo. De nuevo, mientras que la invención no está limitada por la teoría, proporcionar exceso de luz también causa que las células de *Porphyridium* degraden phycoeritrina para reducir la cantidad de luz que recolecta por célula. Este proceso reduce el estrés oxidativo causado por el exceso de flujo de fotones en la membrana del tilacoide. La biomasa de *Porphyridium* cultivada en condiciones de nitrógeno limitado, particularmente cuando se cultiva con mucha luz, pierde coloración roja y se vuelve amarilla con tonos ocasionales de color marrón claro, denominada "biomasa decolorada". La invención proporciona nuevos métodos de producción de composiciones para aplicación tópica que incluyen el cultivo de células del género *Porphyridium* bajo niveles reducidos de nitrógeno (como, por ejemplo, sin Tris y menos del 20% de KNO_3 por litro de medio ATCC 1495 ASW) y opcionalmente también en condiciones relativamente ligeras, como por ejemplo $130 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En otras realizaciones, el medio de cultivo contiene no más de 300 mg/l de uno o más compuestos que contienen nitrato que pueden ser metabolizados por las células (tales como, por ejemplo, pero no limitados a KNO_3) en la inoculación, no más de 250 mg/L en la inoculación, no más de 200 mg/L en la inoculación, no más de 175 mg/L en la inoculación, no más de 150 mg/L en la inoculación, no más de 135 mg/L en la inoculación, no más de 125 mg/L en la inoculación, no más de 50 mg/L en la inoculación, no más de 25 mg/L en la inoculación, y no más de 12.5 mg/L en la inoculación.

En algunos métodos, los compuestos que contienen nitrato se proporcionan en los medios de cultivo a la inoculación a aproximadamente 180 mg/l, aproximadamente 160 mg/l, aproximadamente 140 mg/l, aproximadamente 130 mg/l, aproximadamente 125 mg/l, aproximadamente 110 mg/l, aproximadamente 100 mg/L, y aproximadamente 90 mg/L. En otras realizaciones, el medio de cultivo contiene no más de 300 milimolar de uno o más compuestos que contienen nitrato que pueden ser metabolizados por las células (tales como, por ejemplo, pero sin limitarse a KNO_3) a la inoculación, no más de 250 milimolar en la inoculación, no más de 200 milimolar en la inoculación, no más de 175 milimolar en la inoculación, no más de milimolar en la inoculación, no más que milimolar en la inoculación, no más de 50 milimolar en la inoculación, no más de 25 milimolar en la inoculación, y no más de 12.5 milimolar en la inoculación. En algunos métodos, los compuestos que contienen nitrato se proporcionan en los medios de cultivo a la inoculación a aproximadamente 180 milimolar, aproximadamente 160 milimolar, aproximadamente 140 milimolar, aproximadamente 130 milimolar, aproximadamente 125 milimolar, aproximadamente 110 milimolar, aproximadamente 100 milimolar y aproximadamente 90 milimolar. La inoculación puede significar cuando las células madre se infunden en un biorreactor, y también cuando las células crecen en medio con abundancia de nitrógeno que se han sedimentado, lavado opcionalmente, y se resuspenden en medios de cultivo que tienen cantidades limitantes de compuestos que contienen nitrógeno o sin compuestos que contienen nitrógeno. Las células inoculadas en medios que contienen cantidades limitantes de compuestos que contienen nitrógeno, tales como 125 mg/L, típicamente sufrirán división celular hasta que se consuma nitrógeno (asumiendo que otros nutrientes no son limitantes), y luego comenzarán el proceso de "blanqueo" en donde la ficoeritrina será degradada. Este proceso se acelera a medida que aumenta la intensidad de la luz. Las células cultivadas en medio con abundancia de nitrógeno también se pueden recolectar y lavar y resuspender en medios de cultivo que no contienen nitrógeno o una cantidad limitada de nitrógeno, tales como las cantidades enumeradas anteriormente. Además, los medios con abundancia de nitrógeno se pueden intercambiar con medios limitados en nitrógeno a través de filtración de flujo tangencial usando un filtro que tiene un tamaño de poro más pequeño que el diámetro de las células. El diámetro de las células de *Porphyridium* es aproximadamente de 4 a 8 micras. Este método evita la centrifugación y reduce la posibilidad de contaminación.

Otros métodos incluyen eliminar la coloración roja de diferentes especies de microalgas mediante mutagénesis. Por ejemplo, las especies del género *Porphyridium* se someten a mutagénesis química, seguido del cribado de colonias

que carecen de coloración roja. Véase por ejemplo Sivan y Arad, *Phycologia* 32 (1), pp.68-72 (1993)) Dichas cepas genéticamente decoloradas se usan para generar biomasa no roja para la formulación como productos para el cuidado de la piel. En una realización preferida, la biomasa decolorada genéticamente se homogeneiza. En otra realización preferida, el polisacárido contiene más de 4,75% de azufre en peso. La producción de ficoeritrina se reduce en algunas cepas mutagenizadas debido a mutaciones en diversas regiones del genoma, incluidos promotores, regiones codificantes y otros elementos funcionales. Tanto el blanqueo a través de la limitación de nutrientes y el exceso de luz, como a través de la mutagénesis, pueden realizarse en cualquier especie de microalgas, incluidas las enumeradas en la Tabla 1.

Algunos métodos comprenden además la formulación de biomasa decolorada de *Porphyridium*, generada a través de cualquiera o todos los métodos de limitación de nutrientes, exceso de luz y mutagénesis, con un vehículo adecuado para la administración tópica. Los métodos también incluyen opcionalmente formular biomasa de *Porphyridium* decolorada con uno o más conservantes, tales como por ejemplo diyodometil-p-tolilsulfona, 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol, isómero cis 1-(3-ehloroalil)-3, cloruro de 5,7-triaza-1-azoniadamantano (también conocido como Dowicil 200), glutaraldehído, 4,4-dimetil oxazolidina, 7-etilbiciclooxazolidina, metilparabeno, ácido sórbico, metilparabeno, Germaben II y EDTA disodio.

También pueden manipularse otros parámetros de cultivo, tales como el pH de los medios de cultivo, la identidad y la concentración de elementos traza tales como los enumerados en la Tabla 3, y otros constituyentes de los medios. Un ejemplo no limitante es la inclusión de al menos una fuente de sulfato en los medios de cultivo para aumentar el nivel de sulfatación en los polisacáridos producidos.

En algunas realizaciones, se practica un método de preparación de polisacáridos con medios de cultivo que contienen más de aproximadamente 100, más de aproximadamente 150, más de aproximadamente 200, más de aproximadamente 250, más de aproximadamente 300, más de aproximadamente 350, más de aproximadamente 400, más de aproximadamente 450, más de aproximadamente 500, más de aproximadamente 550, más de aproximadamente 600, más de aproximadamente 650, más de aproximadamente 700, o más de aproximadamente 750, más de aproximadamente 800, más de aproximadamente 850, más de aproximadamente 900, más de aproximadamente 950, o más de aproximadamente 1 o 2 M de sulfato (o SO_4^{2-} total)) Se ha demostrado que aumentar la sulfatación aumenta la capacidad antioxidante del polisacárido (véase ejemplo 23 y Spitz et al. (*J. Appl. Phycology* (2005) 17: 215-222) Sin estar obligado por la teoría, y se ofreció a mejorar la comprensión de ciertos aspectos de la divulgación, es posible que un nivel incrementado de sulfatación pueda aumentar las características anticolesterol del material celular homogeneizado o la preparación de polisacáridos descritos en este documento. La correlación entre mayores cantidades de sulfatación y actividad antioxidante demostrada aquí fue inesperada dada la débil actividad antioxidante del carragenano, que contiene tanto como 40% de sulfato.

Se cree que las microalgas del género *Porphyridium* no se han cultivado o propagado en condiciones con concentraciones de sulfato de 100 mM a 2 M. Se revela el sorprendente descubrimiento de que las microalgas son capaces de crecer en tales condiciones. Además, la divulgación se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que el crecimiento bajo mayores concentraciones de sulfato puede producir polisacáridos con niveles más altos de sulfatación. Esto permite la producción de células (y, por lo tanto, de biomasa) que contienen polisacáridos altamente sulfatados que pueden utilizarse en forma de polisacáridos purificados, un homogeneizado de células (biomasa), células intactas (biomasa) per se, o una combinación de los mismos.

El descubrimiento de que *Porphyridium* puede sobrevivir a más de 100 mM de sulfato fue sorprendente por varias razones. En primer lugar, se sabe que el sulfato puede alterar la tasa de absorción de iones metálicos tóxicos en las algas, como el cromo, y que el aumento de la acumulación de metal puede conducir a la toxicidad (véase, por ejemplo, Kaszycki et al., *Plant, Cell & Environment*, 28 (2): p.260, 2005) En segundo lugar, también se sabe que el sulfato puede inhibir la absorción de los iones metálicos necesarios para la fijación de nitrógeno, como el molibdeno, y que el aumento de las concentraciones de sulfato afecta negativamente a las algas como cianobacterias incluso a concentraciones de sulfato en niveles de sulfato estuarino (> 8-10 mM) y agua de mar (28mM) (véase por ejemplo Marino et al, *Hydrobiologia* 500: pp. 277-293, 2004) En tercer lugar, el sulfato en niveles altos a menudo puede tomarse y reducirse y el sulfuro, que es tóxico para la fotosíntesis porque ataca el fotosistema II (véase, por ejemplo, Khanal y otros, *J. Envir. Engrg.*, 129 (12); pp. 1104-1111, 2003) En cuarto lugar, los altos niveles de sulfato alteran la presión osmótica de los medios de crecimiento, y muchos organismos no pueden sobrevivir a un osmótico tan elevado. Por ejemplo, está bien establecido que la fotosíntesis de las algas se ve inhibida por el estrés hiperosmótico y salino. Véase por ejemplo "Suppression of Quantum Yield of Photosystem II by Hyperosmotic Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*" *Plant Cell Physiol.* 36: pp.1253-1258 (1995); y "The Effect of Osmotic and Ionic Stress on the Primary Processes of Photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*", *J. Exp. Bot.* 1984 35 (1): 18-27 (1984)).

Mediante el uso de métodos descritos anteriormente, la descripción incluye una preparación de células, biomasa celular o homogeneizado de células que contiene un nivel reducido de pigmentación verde, o una absorbancia reducida a 545 nm, con relación a las mismas células cultivadas en diferentes condiciones. Las células pueden ser las de cualquier microalga como se describe aquí, incluidas las del género *Porphyridium*. Las células, la biomasa

celular o el homogeneizado celular pueden formularse en una composición de la descripción de manera que un extracto acuoso de la composición contendría el mismo nivel reducido de pigmentación verde.

En algunas realizaciones, un extracto acuoso de la composición contiene no más de aproximadamente 75%, no más de aproximadamente 70%, no más de aproximadamente 65%, no más de aproximadamente 60%, no más de aproximadamente 55%, no más de aproximadamente 50%, no más de aproximadamente 45%, no más de aproximadamente 40%, no más de aproximadamente 35%, no más de aproximadamente 30%, no más de aproximadamente 25%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 15 %, no más de aproximadamente 10%, o no más de aproximadamente 5% de la absorbancia por gramo a 545 nm en comparación con un extracto de células de la misma especie cultivado en un fotobiorreactor en medio ATCC 1495 ASW (como se describe en el Ejemplo 1) en presencia de 50 microeinsteins de luz por segundo por metro cuadrado. Un medio no limitante para la detección de la absorbancia es mediante el uso de un espectrofotómetro.

Las microalgas se pueden cultivar en presencia de luz. Se puede manipular la cantidad de fotones que inciden en un cultivo de células de microalgas, así como otros parámetros como el espectro de longitud de onda y la relación de horas de oscuridad:luz por día. Las microalgas también se pueden cultivar con luz natural, así como combinaciones simultáneas y/o alternas de luz natural y luz artificial. Por ejemplo, microalgas del género *Chlorella* cultivarse bajo luz natural durante el día y bajo luz artificial durante las horas nocturnas.

El contenido de gas de un fotobiorreactor puede ser manipulado. Parte del volumen de un fotobiorreactor puede contener gas en lugar de líquido. Las entradas de gas pueden usarse para bombear gases hacia el fotobiorreactor. Cualquier gas puede ser bombeado a un fotobiorreactor, incluyendo aire, aire/CO₂ mezclas, gases nobles como el argón y otros. La tasa de entrada de gas en un fotobiorreactor también puede ser manipulada. El aumento del flujo de gas en un fotobiorreactor aumenta la turbidez de un cultivo de microalgas. La ubicación de los puertos que transportan gases a un fotobiorreactor también puede afectar la turbidez de un cultivo a un índice de flujo de gas dado. Aire/CO₂ las mezclas se pueden modular para generar diferentes composiciones de polisacáridos manipulando el flujo de carbono. Por ejemplo, aire:CO₂ mezclas de aproximadamente 99,75% de aire: 0,25% de CO₂, alrededor del 99.5% de aire:0.5% de CO₂, aproximadamente 99.0% aire:1.00% CO₂, aproximadamente 98.0% aire:2.0% CO₂, alrededor del 97.0% de aire:3.0% de CO₂, aproximadamente 96.0% de aire:4.0% de CO₂ y aproximadamente 95.00% de aire:5.0% de CO₂ puede infundirse en un biorreactor o fotobiorreactor.

Los cultivos de microalgas también se pueden someter a mezcla utilizando dispositivos tales como paletas giratorias y hélices, balanceo de un cultivo, barras de agitación y otros instrumentos.

B. Métodos de cultivo celular: Fotobiorreactores

Las microalgas se pueden cultivar y mantener en fotobiorreactores cerrados hechos de diferentes tipos de material transparente o semitransparente. Dicho material puede incluir cajas Plexiglas®, cajas de vidrio, bolsas hechas de sustancias como polietileno, tuberías transparentes o semitransparentes y otros materiales. Las microalgas también se pueden cultivar en estanques abiertos.

Los fotobiorreactores pueden tener puertos que permiten la entrada de gases, sólidos, semisólidos y líquidos a la cámara que contiene las microalgas. Los puertos generalmente están conectados a tubos u otros medios de transporte de sustancias. Los puertos de gas, por ejemplo, transportan gases al cultivo. Bombear gases en un fotobiorreactor puede servir tanto para alimentar las células CO₂ y otros gases y para airear el cultivo y, por lo tanto, generar turbidez. La cantidad de turbidez de un cultivo varía a medida que se altera el número y la posición de los puertos de gas. Por ejemplo, los puertos de gas se pueden colocar a lo largo de la parte inferior de una bolsa cilíndrica de polietileno. Las microalgas crecen más rápido cuando el CO₂ se agrega al aire y burbujea en un fotobiorreactor. Por ejemplo, una mezcla de 5% de CO₂:95% de aire se infunde en un fotobiorreactor que contiene células del género *Porphyridium* (véase, por ejemplo, Biotechnol Bioeng. 1998 20 de septiembre; 59 (6): 705-13; libro de texto de la oficina; Patentes de los Estados Unidos 5,643,585 y 5,534,417; Lebeau, T., et. Alabama. Appl. Microbiol Biotechnol (2003) 60: 612-623; Muller-Fuega, A., Journal of Biotechnology 103 (2003 153-163); Muller-Fuega, A., Biotechnology and Bioengineering, vol. 84, No. 5, 5 de diciembre, 2003; Garcia-Sánchez, J.L., Biotechnology and Bioengineering, vol. 84, No. 5, 5 de diciembre, 2003; Garcia-Gonzales, M., Journal of Biotechnology, 115 (2005) 81-90. Molina Grima, E., Biotechnology Advances 20 (2003) 491-515).

Los fotobiorreactores pueden exponerse a una o más fuentes de luz para proporcionar a las microalgas luz como fuente de energía a través de la luz dirigida a la superficie del fotobiorreactor. Preferiblemente, la fuente de luz proporciona una intensidad que es suficiente para que las células crezcan, pero no tan intensa como para causar daño oxidativo o causar una respuesta fotoinhibidora. En algunos casos, una fuente de luz tiene un rango de longitud de onda que imita o imita aproximadamente el rango del sol. En otros casos, se usa un rango de longitud de onda diferente. Los fotobiorreactores se pueden colocar al aire libre o en un invernadero u otra instalación que permita que la luz del sol golpee la superficie. Las intensidades de fotones generalmente se miden en microeinsteins de luz por metro cuadrado por segundo (uE m⁻² s⁻¹) aunque a veces se usan otras medidas como lux y velas. Intensidades de fotones preferidas para cultivar especies del género *Porphyridium* están entre 50 y 300 uE m⁻² s⁻¹ (véase por ejemplo Photosynth Res. 2005 Jun; 84 (1-3): 21-7), aunque en los casos de inducción de células de

Porphyridium para degradar la ficoeritrina, las intensidades de luz preferidas pueden ser mayores, tales como, por ejemplo, 400-700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Los fotobiorreactores preferiblemente tienen una o más partes que permiten la entrada de medios. No es necesario que solo una sustancia entre o salga de un puerto. Por ejemplo, un puerto se puede usar para hacer fluir medios de cultivo en el fotobiorreactor y luego se puede usar para muestrear, ingresar gas, salir de gases u otros fines. En algunos casos, un fotobiorreactor se llena con medio de cultivo al comienzo de un cultivo y no se infunden más medios de crecimiento después de que se inocula el cultivo. En otras palabras, la biomasa de microalgas se cultiva en un medio acuoso durante un período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen y aumentan en número; sin embargo, las cantidades de medio de cultivo acuoso no fluyen a través del fotobiorreactor durante todo el período de tiempo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el medio de cultivo acuoso no fluye a través del fotobiorreactor después de la inoculación.

En otros casos, los medios de cultivo pueden fluir a través del fotobiorreactor a lo largo del período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen y aumentan en número. En algunos casos, los medios se infunden en el fotobiorreactor después de la inoculación, pero antes de que las células alcancen la densidad deseada. En otras palabras, un régimen de flujo turbulento de entrada de gas y entrada de medios no se mantiene para la reproducción de microalgas hasta que se logre un aumento deseado en el número de dichas microalgas, sino que un parámetro como entrada de gas o entrada de medios se altera antes de las células alcanzar una densidad deseada.

Los fotobiorreactores preferiblemente tienen uno o más puertos que permiten la entrada de gas. El gas puede servir para proporcionar nutrientes como CO_2 así como para proporcionar turbulencia en los medios de cultivo. Se puede lograr la turbulencia colocando un puerto de entrada de gas por debajo del nivel del medio de cultivo acuoso de modo que el gas que entra en el fotobiorreactor burbujee hacia la superficie del cultivo. Uno o más orificios de salida de gas permiten que escape el gas, evitando así la acumulación de presión en el fotobiorreactor. Preferiblemente, un puerto de salida de gas conduce a una válvula de "un solo sentido" que evita que los microorganismos contaminantes entren en el fotobiorreactor. En algunos casos las células se cultivan en un fotobiorreactor durante un período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen y aumentan en número, sin embargo, un régimen de flujo turbulento con remolinos turbulentos predominantemente a través de los medios de cultivo causados por la entrada de gas no se mantiene durante todo el período de hora. En otros casos, se puede mantener un régimen de flujo turbulento con remolinos turbulentos predominantemente a través de los medios de cultivo causados por la entrada de gas durante todo el período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen y aumentan en número. En algunos casos, un rango predeterminado de relaciones entre la escala del fotobiorreactor y la escala de remolinos no se mantiene durante el período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen y aumentan en número. En otras instancias, dicho rango puede mantenerse.

Los fotobiorreactores preferiblemente tienen al menos un puerto que puede usarse para muestrear el cultivo. Preferiblemente, un puerto de muestreo puede usarse repetidamente sin alterar el compromiso de la naturaleza axénica del cultivo. Un puerto de muestreo se puede configurar con una válvula u otro dispositivo que permita detener e iniciar el flujo de la muestra. Alternativamente, un puerto de muestreo puede permitir el muestreo continuo. Los fotobiorreactores preferiblemente tienen al menos un puerto que permite la inoculación de un cultivo. Tal puerto también se puede usar para otros fines, como medios o entrada de gas.

Las microalgas que producen polisacáridos se pueden cultivar en fotobiorreactores. Las microalgas que producen polisacáridos que no están unidas a las células se pueden cultivar durante un período de tiempo y luego se pueden separar de los medios de cultivo y polisacáridos secretados mediante métodos tales como centrifugación y filtración de flujo tangencial. Los organismos preferidos para cultivar en fotobiorreactores para producir polisacáridos incluyen *Porphyridium sp.*, *Porphyridium cruentum*, *Porphyridium purpureum*, *Porphyridium aerugineum*, *Rhodella maculata*, *Rhodella reticulata*, *Chlorella autotrophica*, *Chlorella stigmatophora*, *Chlorella capsulata*, *Achnanthes brevipes*, *Achnanthes longipes*, *Gloeocapsa alpicola* y *Phaeocystis pouchettii*.

C. Producción de polisacáridos no microalgales

Los organismos además de las microalgas se pueden usar para producir polisacáridos, como las bacterias del ácido láctico (véase, por ejemplo, Stinglee, F., Molecular Microbiology (1999) 32 (6), 1287-1295; Ruas Madiedo, P., J. Dairy Sci. 88: 843-856 (2005)); Leyes, A., Biotechnology Advances 19 (2001) 597-625; Bacteria de goma xanthan: Pollock, T.J., J. Ind. Microbiol Biotechnol., 1997 Aug; 19 (2): 92-7.; Becker, A., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998 Aug; 50 (2): 92-7.; García-Ochoa, F., Biotechnology Advances 18 (2000) 549-579., algas marinas: Talarico, L.B., et al., Antiviral Research 66 (2005) 103-110; Dusseault, J., y otros, J Biomed Mater Res A., (2005) Nov1; Melo, F.R., J Biol Chem 279: 20824-35 (2004)).

D. Métodos ex vivo

Las microalgas y otros organismos pueden manipularse para producir moléculas de polisacáridos que no se producen de forma natural mediante métodos tales como alimentar células con monosacáridos que no son producidos por las células (Naturaleza. 2004, 19 de agosto; 430 (7002): 873-7) Por ejemplo, las especies

enumeradas en la Tabla 1 se cultivan de acuerdo con los protocolos de crecimiento referenciados, con el paso adicional de agregar a los medios de cultivo una fuente de carbono fija que no está en los medios de cultivo como se publicó y se hace referencia en la Tabla 1 y no es producida por las células en una cantidad detectable.

5 E. Métodos in vitro

Los polisacáridos pueden alterarse por modificación enzimática y química. Por ejemplo, las enzimas modificadoras de carbohidratos se pueden agregar a una preparación de polisacárido y dejar que catalicen las reacciones que alteran la estructura del polisacárido. Los métodos químicos pueden usarse para, por ejemplo, modificar el patrón de sulfatación de un polisacárido (véase, por ejemplo, Carbohydr. Polym. 63: 75-80 (2000); Pomin VH., Glycobiology. 2005 Dec; 15 (12): 1376-85; Naggi A., Semin Thromb Hemost. 2001 Oct; 27 (5): 437-43 Revisión; Habuchi, O., Glycobiology. 1996 Jan; 6 (1): 51-7; Chen, J., J. Biol. Chem. En prensa; Geresh., S et al., J. Biochem. Biophys. Methods 50 (2002) 179-187.).

15 F. Métodos de purificación de polisacáridos

Los exopolisacáridos se pueden purificar a partir de cultivos de microalgas mediante diversos métodos, que incluyen los descritos en este documento.

20 Precipitación

Por ejemplo, los polisacáridos se pueden precipitar añadiendo compuestos tales como cloruro de cetilpiridinio, isopropanol, etanol o metanol a una solución acuosa que contiene un polisacárido en solución. Los gránulos de polisacárido precipitado se pueden lavar y resuspender en agua, reguladores tales como solución salina regulada con fosfato o Tris u otras soluciones acuosas (véase, por ejemplo, Farias, W.R.L., et al., J. Biol. Chem. (2000) 275; (38) 29299-29307; Patente de los Estados Unidos No. 6,342,367; Patente de los Estados Unidos No. 6,969,705).

Díálisis

30 Los polisacáridos también se pueden dializar para eliminar el exceso de sal y otras moléculas pequeñas (véase, por ejemplo, Gloaguen, V., et al., Carbohydr Res. 2004 2 de enero; 339 (1): 97-103; Microbiol Immunol. 2000; 44 (5): 395-400.).

Filtración de flujo tangencial

35 La filtración puede usarse para concentrar polisacáridos y eliminar sales. Por ejemplo, se puede usar filtración de flujo tangencial (TFF), también conocida como filtración de flujo cruzado. Para un método de filtración preferido, véase Geresh, Carb. Polym. 50; 183-189 (2002), que analiza el uso de un filtro de fibra hueca MaxCell A/G de tecnología 0.45µm. Véase también, por ejemplo, dispositivos Millipore Pellicon®, utilizados con 100 kD, 300 kD, 40 1000 kD (número de catálogo P2C01MC01), 0,1 µm (número de catálogo P2VVPV01), 0,22 µm (número de catálogo P2GVPPV01) y membranas de 0,45 µm (número de catálogo P2HVMPV01). Se prefiere que los polisacáridos no pasen a través del filtro a un nivel significativo. También se prefiere que los polisacáridos no se adhieran al material de filtro. También se puede realizar TFF utilizando sistemas de filtración de fibra hueca.

45 Los ejemplos no limitantes de filtración de flujo tangencial incluyen el uso de un filtro con un tamaño de poro de al menos aproximadamente 0,1 micrómetros, al menos aproximadamente 0,12 micrómetros, al menos aproximadamente 0,14 micrómetros, al menos aproximadamente 0,16 micrómetros, al menos aproximadamente 0,18 micrómetros, al menos aproximadamente 0,2 micrómetros, al menos aproximadamente 0,22 micrómetros, o al menos aproximadamente 0,45 micrómetros. Los tamaños de poro preferidos de TFF permiten el paso de 50 contaminantes pero no moléculas de polisacáridos.

Cromatografía de intercambio de iones

Los polisacáridos aniónicos se pueden purificar por cromatografía de intercambio aniónico. (Jacobsson, I., Biochem J. 1979 April 1; 179 (1): 77-89; Karamanos, NK., Eur J Biochem. 1992 Mar. 1; 204 (2): 553-60).

Tratamiento de proteasa

60 Los polisacáridos se pueden tratar con proteasas para degradar las proteínas contaminantes. En algunos casos, las proteínas contaminantes se unen, ya sea covalente o no covalentemente a polisacáridos. En otros casos, las moléculas de polisacáridos están en una preparación que también contiene proteínas. Las proteasas se pueden agregar a las preparaciones de polisacáridos que contienen proteínas para degradar las proteínas (por ejemplo, la proteasa de *Streptomyces griseus* puede ser utilizado (Sigma Aldrich número de catálogo P5147). Después de la digestión, el polisacárido se purifica preferiblemente a partir de proteínas residuales, fragmentos de péptidos y 65 aminoácidos. Esta purificación se puede lograr, por ejemplo, mediante los métodos enumerados anteriormente, tales como diálisis, filtración y precipitación

El tratamiento térmico también se puede usar para eliminar proteínas en preparaciones de polisacáridos (véase, por ejemplo, Biotechnol Lett. 2005 Jan; 27 (1): 13-8; FEMS Immunol Med Microbiol. 2004 1 de octubre; 42 (2): 155-66; Carbohydr Res. 2000 Sep 8; 328 (2): 199-207; J Biomed Mater Res. 1999; 48 (2): 111-6.; Carbohydr Res. 1990 15 de octubre; 207 (1): 101-20;). Se describe la producción de un exopolisacárido que comprende la separación del exopolisacárido de contaminantes después de que se hayan degradado o destruido las proteínas unidas al exopolisacárido. Las proteínas pueden ser aquellas unidas al exopolisacárido durante el cultivo de una célula de microalgas en un medio, que primero se separa de las células antes de la proteólisis o el tratamiento con proteasa. Las células pueden ser las del género

Porphyridium como un ejemplo no limitante.

En un ejemplo no limitante, se proporciona un método para producir un exopolisacárido en donde el método comprende cultivar células del género *Porphyridium*; separar las células de los medios de cultivo; destruir proteína unida al exopolisacárido presente en los medios de cultivo; y separando el exopolisacárido de los contaminantes. En algunos métodos, los contaminantes se seleccionan de aminoácidos, péptidos, proteasas, fragmentos de proteínas y sales. En otros métodos, el contaminante se selecciona de NaCl, MgSO₄, MgCl₂, CaCl₂, KNO₃, KH₂PO₄, NaHCO₃, Tris, ZnCl₂, H₃BO₃, CoCl₂, CuCl₂, MnCl₂, (NH₄)₂Mes₇O₂₄, FeCl₃ y EDTA.

Métodos de secado

Después de la purificación por métodos tales como los anteriores, los polisacáridos se pueden secar usando métodos tales como liofilización y secado por calor (véase, por ejemplo, Shastri, S., Brazilian Journal of Microbiology (2005) 36: 57-62; Matthews KH., Int J Pharm. 2005 31 de enero; 289 (1-2): 51-62. Epub 2004 Dic 30; Gloaguen, V., et al., Carbohydr Res. 2004 Jan 2; 339 (1): 97-103).

Los secadores de bandejas aceptan sólidos húmedos en las bandejas. El aire caliente (o nitrógeno) puede circular para secar. Los secadores de estantes también pueden emplear presiones reducidas (por debajo de la atmosférica a nivel del mar, tal como alrededor de 25 en Hg o menos) o al vacío para secar a temperatura ambiente cuando los productos son sensibles a la temperatura y son similares a un liofilizador, pero menos costosos de usar y se puede ampliar fácilmente. En algunas realizaciones, el secado en secadores de bandeja de horno se realiza al vacío.

Los secadores por pulverización son de operación relativamente simple, que aceptan la alimentación en estado fluido y la convierten en una forma de partículas secas pulverizando el fluido en un medio de secado caliente.

Los secadores rotativos funcionan alimentando continuamente material húmedo, que se seca al contacto con aire caliente, mientras se transporta a lo largo del interior de un cilindro giratorio, actuando la carcasa giratoria como dispositivo de transporte y agitador.

Los secadores Spin flash se utilizan para el secado de torta húmeda, lechada o pasta que normalmente es difícil de secar en otros secadores. El material es alimentado por un alimentador de tornillo a través de un variador de velocidad en la cámara de secado vertical, donde se calienta por aire y al mismo tiempo se desintegra mediante un desintegrador especialmente diseñado. El calentamiento del aire puede ser directo o indirecto dependiendo de la aplicación. El polvo seco se recoge a través de un separador de ciclón/filtro de bolsa o con una combinación de ambos.

Extracción de célula entera

Los polisacáridos intracelulares y los polisacáridos de la pared celular se pueden purificar a partir de la masa de células enteras (véase ejemplo de forma) Patente de los Estados Unidos 4,992,540; Patente de los Estados Unidos 4,810,646; J Sietsma JH., Et al., Gen Microbiol. 1981 Jul; 125 (1): 209-12; Fleet GH, Manners DJ., J Gen Microbiol. 1976 May; 94 (1): 180-92).

G. Métodos de homogeneización de microalgas

Un disruptor de presión bombea una suspensión a través de una válvula de orificio restringido. Se aplica alta presión (hasta 1500 bar), seguido de una expansión instantánea a través de una boquilla de salida. La ruptura celular se logra mediante tres mecanismos diferentes: choque sobre la válvula, cizallamiento de alto líquido en el orificio y caída repentina de presión al momento de la descarga, lo que provoca una explosión de la célula. El método se aplica principalmente para la liberación de moléculas intracelulares. Según Hetherington et al., La ruptura celular (y en consecuencia la tasa de liberación de proteínas) es un proceso de primer orden, descrito por la relación: $\log [R_m/(R_m-R)] = K N P^{72.9}$. R es la cantidad de proteína soluble; R_m es la cantidad máxima de proteína soluble K es la constante de velocidad dependiente de la temperatura; N es el número de pases a través del homogeneizador (que representa el tiempo de residencia). P es la presión de operación.

En un molino de bolas, las células se agitan en suspensión con pequeñas partículas abrasivas. Las células se rompen debido a las fuerzas de cizalladura, la fricción de las perlas y las colisiones con perlas. Las cuentas

interrumpen las células para liberar biomoléculas. La cinética de la liberación de biomoléculas mediante este método también es un proceso de primer orden.

Otro método ampliamente aplicado es la lisis celular con sonido de alta frecuencia que se produce electrónicamente y se transporta a través de una punta metálica a una suspensión celular concentrada apropiadamente, es decir: sonicación. El concepto de ruptura ultrasónica se basa en la creación de cavidades en suspensión celular. La homogeneización también puede realizarse con un dispositivo Microfluidizer® (como el modelo M-110Y Microfluidizer®, Microfluidics Inc., Newton, MA).

La mezcla (alta velocidad o Waring), la prensa francesa, o incluso la centrifugación en el caso de paredes celulares débiles, también perturban las células utilizando los mismos conceptos.

Las células también se pueden moler después del secado en dispositivos tales como un molino coloidal.

Debido a que el porcentaje de polisacárido en función del peso en seco de una célula de microalgas puede ser con frecuencia superior al 50%, los homogeneizados de células de microalgas se pueden considerar composiciones de polisacáridos parcialmente puros. La ruptura celular ayuda a aumentar la cantidad de polisacáridos accesibles al disolvente rompiendo las paredes celulares que están compuestas en gran parte por polisacáridos.

La homogeneización tal como se describe en el presente documento puede aumentar significativamente la cantidad de polisacárido disponible en el disolvente. Por ejemplo, la homogeneización puede aumentar la cantidad de polisacárido disponible en disolvente en al menos un factor de 0,25, al menos un factor de 0,5, al menos un factor de 1, al menos un factor de 2, al menos un factor de 3, en al menos un factor de 4, al menos un factor de 5, al menos un factor de 8, al menos un factor de 10, al menos un factor de 15, al menos un factor de 20, al menos un factor de 25, y en al menos un factor de 30 o más en comparación con la cantidad de polisacárido disponible en disolvente en una cantidad idéntica o similar de células no homogeneizadas del mismo tipo. Una forma de determinar una cantidad de células suficiente para generar una cantidad determinada de homogeneizado es medir la cantidad de un compuesto en el homogeneizado y calcular la cantidad de gramos de células requeridas para generar esta cantidad del compuesto usando datos conocidos para la cantidad del compuesto por gramo masa de células. Se conoce la cantidad de muchos de tales compuestos por gramo de células particulares de microalgas. Por ejemplo, véase la Figura 7. Dada una cierta cantidad de un compuesto en una composición, el experto en la técnica puede determinar el número de gramos de células intactas necesarias para generar la cantidad observada del compuesto. El número de gramos de células de microalgas presentes en la composición se puede usar entonces para determinar si la composición contiene al menos una cierta cantidad de polisacárido disponible en disolvente suficiente para indicar si la composición contiene o no células homogeneizadas, tal como por ejemplo cinco veces la cantidad de polisacárido disponible en disolvente presente en una cantidad similar o idéntica de células no homogeneizadas.

H. Métodos de análisis

Los ensayos para detectar polisacáridos se pueden usar para cuantificar la concentración inicial de polisacáridos, medir el rendimiento durante la purificación, calcular la densidad del polisacárido secretado en un fotobiorreactor, medir la concentración de polisacáridos en un producto terminado y otros fines.

El ensayo de fenol:ácido sulfúrico detecta carbohidratos (véase Hellebust, Handbook of Phycological Methods, Cambridge University Press, 1978; y Cuesta G., et al., J Microbiol Methods. 2003 Jan; 52 (1): 69-73) El ensayo de azul de 1,6 dimetilmetileno detecta polisacáridos aniónicos. (véase por ejemplo Braz J Med Biol Res. 1999 MAY; 32 (5): 545-50; Clin Chem. 1986 Nov; 32 (11): 2073-6).

Los polisacáridos también se pueden analizar a través de métodos tales como HPLC, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio aniónico (véase, por ejemplo, Prosky L, Asp N, Schweizer TF, DeVries JW y Furda I (1988) Determinación de fibra dietética insoluble, soluble y total en alimentos y productos alimenticios: estudio interlaboratorios. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 71, 1017 ± 1023; Int J Biol Macromol. 2003 Nov; 33 (1-3): 9-18)

Los polisacáridos también se pueden detectar usando electroforesis en gel (véase, por ejemplo, Anal Biochem. 2003 Oct 15; 321 (2): 174-82; Anal Biochem. 2002 Jan 1; 300 (1): 53-68).

El análisis de monosacáridos de polisacáridos se puede realizar mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas combinada (GC/MS) de los derivados per-O-trimetilsililo (TMS) de los monosacáridos metilglicósidos producidos a partir de la muestra por metanólisis ácida (véase Merkle y Poppe (1994) Methods Enzymol. 230: 1-15; York, et al. (1985) Methods Enzymol. 118: 3-40).

La determinación de la concentración de proteína puede ser mediante el uso de cualquier procedimiento conocido, tal como el ensayo Lowry, el ensayo Biuret, el ensayo Bradford o el ensayo con ácido bicinonínico (BCA). Como un ejemplo no limitante, el ensayo BCA se basa en la formación de un Cu^{2+} - complejo de proteína en condiciones alcalinas. El Cu^{2+} luego se reduce a Cu^{1+} donde la cantidad de proteína presente es proporcional a la reducción de

cantidad. Se ha demostrado que la reducción está mediada por aminoácidos tales como cisteína, cistina, triptófano y tirosina, así como por el enlace peptídico. El resultado del ensayo es un complejo azul púrpura con Cu^{2+} bajo condiciones alcalinas. El complejo de color es estable, incluso en presencia de otros componentes posiblemente presentes con las proteínas, tales como detergentes. La cantidad de reducción se puede controlar por absorbancia a 562 nm. El ensayo de BCA es sensible y preciso en un amplio rango de concentraciones de proteínas.

111 Composiciones

A. General

Las composiciones de la divulgación incluyen un polisacárido u homogeneizado de microalgas como se describe en este documento. En realizaciones relacionadas con polisacáridos, que incluyen exopolisacáridos, la composición puede comprender una población homogénea o heterogénea de moléculas de polisacáridos, que incluyen polisacáridos sulfatados. Ejemplos no limitantes de poblaciones homogéneas incluyen aquellas que contienen un único tipo de molécula de polisacárido, tal como la que tiene la misma estructura y peso molecular. Ejemplos no limitantes de poblaciones heterogéneas incluyen aquellas que contienen más de un tipo de una molécula de polisacárido, tal como una mezcla de polisacáridos que tienen un peso molecular (PM) dentro de un rango o un MW por encima o por debajo de un valor de MW. Por ejemplo, el exopolisacárido de *Porphyridium sp.* se produce típicamente en un rango de tamaños de 3-5 millones de daltons. Por supuesto, una composición que contiene polisacáridos de la invención puede tratarse opcionalmente con proteasa, o reducirse en la cantidad de proteína, como se describió anteriormente.

En algunas realizaciones, una composición de la divulgación puede comprender uno o más polisacáridos producidos por microalgas que no han sido modificados de forma recombinante. Las microalgas pueden ser aquellas de origen natural o aquellas que se han mantenido en cultivo en ausencia de alteración por técnicas de ADN recombinante o ingeniería genética.

En otras realizaciones, los polisacáridos son aquellos de microalgas modificadas, tales como, pero sin limitación, microalgas modificadas por técnicas recombinantes. Ejemplos no limitantes de tales técnicas incluyen la introducción y/o expresión de una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica un producto génico; manipulación genética para disminuir o inhibir la expresión de un producto génico endógeno de microalgas; y/o manipulación genética para aumentar la expresión de un producto génico endógeno de microalgas. Se contempla la modificación recombinante de las diversas especies de microalgas descritas en este documento. En algunas realizaciones, la microalga es del género *Porphyridium*.

Los polisacáridos proporcionados por la divulgación que son producidos por microalgas genéticamente modificadas o microalgas que se proporcionan con una fuente de carbono exógeno pueden ser distintos de los producidos por microalgas cultivadas en medios de crecimiento mínimos bajo condiciones fotoautótrofas (es decir: en ausencia de una fuente fija de carbono) al menos en eso contienen un contenido diferente de monosacáridos en relación con polisacáridos a partir de microalgas no modificadas o microalgas cultivadas en medios de crecimiento mínimos en condiciones fotoautótrofas. Ejemplos no limitantes incluyen polisacáridos que tienen una cantidad incrementada de arabinosa (Ara), rhamnosa (Rha), fucosa (Fuc), xilosa (Xyl), ácido glucurónico (GlcA), ácido galacturónico (GalA), manosa (Man), galactosa (Gal), glucosa (Glc), N-acetilo galactosamina (GalNAc), N-acetil glucosamina (GlcNAc) y/o ácido N-acetil neuramínico (NANA), por unidad de masa (o por mol) de polisacárido, en relación con polisacáridos de microalgas no modificadas genéticamente o microalgas cultivadas fotoautótroficamente. Una cantidad incrementada de un monosacárido también se puede expresar en términos de un aumento con relación a otros monosacáridos en lugar de referirse a la unidad de masa, o mol, de polisacárido.

Un ejemplo de modificación genética que conduce a la producción de polisacáridos modificados es transformar una microalga con un gen transportador de carbohidratos y cultivar un transformante en presencia de un monosacárido que es transportado a la célula desde los medios de cultivo por la proteína transportadora de carbohidratos codificada por el carbohidrato gen transportador. En algunos casos, el cultivo puede estar en la oscuridad, donde el monosacárido, como la glucosa, es utilizado como la única fuente de energía para la célula. En otros casos, el cultivo está a la luz, donde las células se someten a fotosíntesis y por lo tanto producen monosacáridos como glucosa en el cloroplasto y transportan los monosacáridos al citoplasma, mientras que los monosacáridos adicionales provistos exógenamente son transportados a la célula por la proteína transportadora de carbohidratos.

En ambos casos, los monosacáridos del citoplasma se transportan en el retículo endoplásmico, donde se produce la síntesis de polisacáridos. Por lo tanto, se pueden producir polisacáridos novedosos por microalgas no modificadas genéticamente mediante manipulación nutricional, es decir, proporcionando carbohidratos de forma exógena en los medios de cultivo que se toman a través de mecanismos de transporte endógenos. La absorción de los hidratos de carbono provistos exógenamente puede inducirse, por ejemplo, cultivando las células en la oscuridad, lo que obliga a las células a utilizar la fuente de carbono proporcionada exógenamente. Por ejemplo, las células de *Porphyridium* cultivadas en presencia de 7% de glicerol en la oscuridad producen un polisacárido novedoso porque el flujo de carbono intracelular en estas condiciones nutricionalmente manipuladas es diferente del de las condiciones fotosintéticas. La inserción de genes transportadores de carbohidratos en microalgas facilita, pero es no

estrictamente necesario para, la manipulación de la estructura de polisacáridos porque la expresión de tales genes puede aumentar significativamente la concentración de un monosacárido particular en el citoplasma de la célula. Muchos genes transportadores de carbohidratos codifican proteínas que transportan más de un monosacárido, aunque con diferentes afinidades para diferentes monosacáridos (véase, por ejemplo, *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 (2000) 263-274). En algunos casos, una especie de microalga puede ser transformada con un gen transportador de carbohidratos y colocada bajo diferentes condiciones nutricionales, en donde un conjunto de condiciones incluye la presencia de galactosa proporcionada exógenamente, y el otro conjunto de condiciones incluye la presencia de xilosa suministrada exógenamente, y la especie transgénica produce polisacáridos estructuralmente distintos bajo las dos condiciones. Alterando la identidad y concentración de monosacáridos en el citoplasma de la microalga, a través de la manipulación genética y/o nutricional, los métodos proporcionan nuevos polisacáridos. La manipulación nutricional también se puede realizar, por ejemplo, cultivando las microalgas en presencia de altas cantidades de sulfato, como se describe en este documento. En algunos casos, la manipulación nutricional incluye la adición de una o más fuentes de carbono provistas exógenamente, así como uno o más componentes de cultivo diferentes a los carbohidratos, tales como MgSO_4 50 mM₄.

En algunas realizaciones, el aumento en uno o más de los monosacáridos enumerados anteriormente en un polisacárido puede ser de niveles detectables inferiores a superiores y/o en al menos aproximadamente 5%, a al menos aproximadamente 2000%, en relación con un polisacárido producido a partir de la misma microalga en ausencia de manipulación genética o nutricional. Por lo tanto, un aumento en uno o más de los monosacáridos anteriores, u otros hidratos de carbono enumerados en las Tablas 2 o 3, en al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos acerca de 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 100%, al menos aproximadamente 105%, al menos aproximadamente 110%, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 250%, al menos aproximadamente 300%, al menos aproximadamente 350%, al menos aproximadamente 400 %, al menos aproximadamente 450%, al menos aproximadamente 500%, al menos aproximadamente 550%, al menos aproximadamente 600%, al menos aproximadamente 650%, al menos aproximadamente 700%, al menos aproximadamente 750%, al menos aproximadamente 800%, al menos sobre 850%, al menos aproximadamente 900%, al menos aproximadamente 1000%, al menos aproximadamente 1100%, al menos aproximadamente 1200%, al menos aproximadamente 1300%, al menos aproximadamente 1400%, al menos aproximadamente 1500%, al menos aproximadamente 1600%, al menos aproximadamente 1700%, al menos aproximadamente 1800%, o al menos aproximadamente 1900%, o más, pueden usarse en la práctica de la divulgación. En los casos en que los polisacáridos de microalgas no modificadas no contienen uno o más de los monosacáridos anteriores, la presencia del monosacárido en un polisacárido de microalgas indica la presencia de un polisacárido distinto del de las microalgas no modificadas. Por lo tanto, utilizando cepas particulares de *Porphyridium sp.* y *Porphyridium cruentum* como ejemplos no limitantes, la divulgación incluye la modificación de estas microalgas para incorporar arabinosa y/o fucosa, debido a que los polisacáridos de dos cepas de estas especies no contienen cantidades detectables de estos monosacáridos (véase el Ejemplo 5 en este documento). En otro ejemplo no limitante, la modificación de *Porphyridium sp.* para producir polisacáridos que contienen una cantidad detectable de ácido glucurónico, ácido galacturónico o N-acetilgalactosamina, o más de una cantidad traza de N-acetil glucosamina, se incluye específicamente en la presente descripción. En otro ejemplo no limitativo, la modificación de *Porphyridium cruentum* para producir polisacáridos que contienen una cantidad detectable de rhamnosa, manosa o ácido N-acetil neuramínico, o más de una cantidad traza de N-acetil-glucosamina, también se incluye específicamente en la presente divulgación. En términos más generales, la divulgación incluye un método para producir un polisacárido, que comprende cultivar una célula de microalgas en presencia de al menos aproximadamente 0,01 micromolar de un compuesto de carbono fijo proporcionado exógenamente, en donde el compuesto se incorpora en el polisacárido producido por la célula. En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona de la Tabla 2 o 3. Las células se pueden seleccionar opcionalmente de las especies enumeradas en la Tabla 1, y cultivarse mediante modificación, usando los métodos descritos en este documento, o las condiciones de cultivo también enumeradas en la Tabla 1.

Los métodos también pueden considerarse un método para producir un glicopolímero cultivando una célula de microalgas transgénica en presencia de al menos un monosacárido, en donde el transportador introduce el monosacárido en la célula y se incorpora en un polisacárido de microalgas.

En algunas realizaciones, la célula se selecciona de la Tabla 1, tal como donde la célula es del género *Porphyridium*, como un ejemplo no limitante. En algunos casos, la celda se selecciona de *Porphyridium sp.* y *Porphyridium cruentum*. Las realizaciones incluyen aquellas en las que el polisacárido está enriquecido para el al menos un monosacárido en comparación con un polisacárido endógeno producido por una célula no transgénica de la misma especie. El monosacárido puede seleccionarse entre arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, manosa, xilosa, ácido glucurónico, glucosamina, galactosamina, rhamnosa y N-acetilglucosamina.

Estos métodos de la divulgación se facilitan mediante el uso de células no transgénicas que expresan un transportador de azúcar, opcionalmente en las que el transportador tiene una K_m para glucosa que al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en galactosa, xilosa, ácido glucurónico, manosa y rhamnosa. En otras realizaciones, el transportador tiene una K_m para galactosa que al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en glucosa, xilosa, ácido glucurónico, manosa y rhamnosa. En realizaciones adicionales, el transportador tiene una K_m para xilosa que al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en glucosa, galactosa, ácido glucurónico, manosa y rhamnosa. En realizaciones adicionales, el transportador tiene una K_m para ácido glucurónico que al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en glucosa, galactosa, xilosa, manosa y rhamnosa. En realizaciones aún adicionales, el transportador tiene una K_m para manosa que al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en glucosa, galactosa, xilosa, ácido glucurónico y rhamnosa. En otras realizaciones más, el transportador tiene una K_m para rhamnosa que al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en glucosa, galactosa, xilosa, ácido glucurónico y manosa. La manipulación de la concentración e identidad de monosacáridos proporcionados en los medios de cultivo, combinado con el uso de transportadores que tienen una K_m para diferentes monosacáridos, proporciona nuevos polisacáridos. Estos métodos generales también pueden usarse en células distintas a las microalgas, por ejemplo, las bacterias que producen polisacáridos.

En realizaciones alternativas, la célula se cultiva en presencia de al menos dos monosacáridos, siendo ambos transportados por el transportador. En algunos casos, los dos monosacáridos son dos seleccionados entre glucosa, galactosa, xilosa, ácido glucurónico, rhamnosa y manosa.

En un ejemplo no limitante, el método comprende proporcionar una célula transgénica que contiene un gen recombinante que codifica un transportador de monosacáridos; y cultivar la célula en presencia de al menos un monosacárido, en donde el transportador introduce el monosacárido en la célula y se incorpora en un polisacárido de la célula. Se señala que el transporte de un monosacárido desde el medio a una célula de microalgas permite que el monosacárido se use como fuente de energía, como se describe a continuación, y que el monosacárido sea transportado al retículo endoplásmico (ER) por transportadores celulares. En el ER, la producción de polisacáridos y la glicosilación ocurre de tal manera que en la presencia de monosacáridos proporcionados exógenamente, el contenido de azúcar de los polisacáridos de microalgas cambia.

En algunos aspectos, la descripción incluye un nuevo polisacárido de microalgas, tal como de microalgas del género *Porphyridium*, que comprende cantidades detectables de xilosa, glucosa y galactosa en las que la cantidad molar de uno o más de estos tres monosacáridos en el polisacárido no está presente en un polisacárido de *Porphyridium* eso no es modificado genéticamente o nutricionalmente. Un ejemplo de una modificación no nutricional y no genéticamente modificada *Porphyridium* polisacárido se puede encontrar, por ejemplo, en Jones R., Journal of Cellular Comparative Physiology 60; 61-64 (1962)) En algunas realizaciones, la cantidad de glucosa, en el polisacárido, es al menos aproximadamente 65% de la cantidad molar de galactosa en el mismo polisacárido. En otras realizaciones, la glucosa es al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 100%, al menos aproximadamente 105%, al menos aproximadamente 110%, al menos aproximadamente 120%, al menos aproximadamente 130%, al menos aproximadamente 140%, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 250%, al menos aproximadamente 300%, al menos aproximadamente 350%, al menos aproximadamente 400%, al menos aproximadamente 450%, al menos aproximadamente 500%, o más, de la cantidad molar de galactosa en el polisacárido. Las realizaciones adicionales descritas en este documento incluyen aquellas en las que la cantidad de glucosa en un polisacárido de microalgas es igual o aproximadamente igual a la cantidad de galactosa (tal que la cantidad de glucosa es aproximadamente 100% de la cantidad de galactosa). Además, la descripción incluye polisacáridos de microalgas en los que la cantidad de glucosa es mayor que la cantidad de galactosa.

Alternativamente, la cantidad de glucosa, en el polisacárido, es menor que aproximadamente el 65% de la cantidad molar de galactosa en el mismo polisacárido. La descripción proporciona así polisacáridos en los que la cantidad de glucosa es menor que aproximadamente 60%, menor que aproximadamente 55%, menor que aproximadamente 50%, menor que aproximadamente 45%, menor que aproximadamente 40%, menor que aproximadamente 35%, menor que aproximadamente 30%, menor que aproximadamente 25%, menor que aproximadamente 20%, menor que aproximadamente 15%, menor que aproximadamente 10%, o menor que aproximadamente 5% de la cantidad molar de galactosa en el polisacárido.

En otros aspectos, la invención incluye un polisacárido de microalgas, tal como de microalgas del género *Porphyridium*, que comprende cantidades detectables de xilosa, glucosa, galactosa, manosa y rhamnosa, en donde la cantidad molar de uno o más de estos cinco monosacáridos en el polisacárido no está presente en un polisacárido de microalgas no modificadas genéticamente y/o no modificadas nutricionalmente. En algunas realizaciones, la cantidad de rhamnosa en el polisacárido es al menos aproximadamente el 100% de la cantidad molar de manosa en el mismo polisacárido. En otras realizaciones, la rhamnosa es al menos aproximadamente 110%, al menos aproximadamente 120%, al menos aproximadamente 130%, al menos aproximadamente 140%, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 250%, al menos

aproximadamente 300%, al menos aproximadamente 350%, al menos aproximadamente 400%, al menos aproximadamente 450%, o al menos aproximadamente 500%, o más, de la cantidad molar de manosa en el polisacárido. Otras realizaciones del presente documento incluyen aquellas en las que la cantidad de rhamnosa en un polisacárido de microalgas es mayor que la cantidad de manosa en una base molar.

Alternativamente, la cantidad de rhamnosa, en el polisacárido, es menor que aproximadamente el 75% de la cantidad molar de manosa en el mismo polisacárido. La descripción proporciona así polisacáridos en los que la cantidad de rhamnosa es menor que aproximadamente 70%, menor que aproximadamente 65%, menor que aproximadamente 60%, menor que aproximadamente 55%, menor que aproximadamente 50%, menor que aproximadamente 45%, menor que aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 35%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10% o menos de aproximadamente 5% de la cantidad molar de manosa en el polisacárido. En aspectos adicionales, la divulgación incluye un polisacárido de microalgas, tal como de microalgas del género *Porphyridium*, que comprende cantidades detectables de xilosa, glucosa, galactosa, manosa y rhamnosa, en donde la cantidad de manosa, en el polisacárido, es al menos aproximadamente 130% de la cantidad molar de rhamnosa en el mismo polisacárido. En otras realizaciones, la manosa es al menos aproximadamente 140%, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 250%, al menos aproximadamente 300%, al menos aproximadamente 350%, al menos aproximadamente 400%, al menos aproximadamente 450%, o al menos aproximadamente 500%, o más, de la molar cantidad de rhamnosa en el polisacárido.

Alternativamente, la cantidad de manosa, en el polisacárido, es igual o menor que la cantidad molar de rhamnosa en el mismo polisacárido. La divulgación proporciona así polisacáridos en los que la cantidad de manosa es menor que aproximadamente 95%, menor que aproximadamente 90%, menor que aproximadamente 85%, menor que aproximadamente 80%, menor que aproximadamente 75%, menor que aproximadamente 70%, menor que aproximadamente 65%, menos de aproximadamente 60%, menos de aproximadamente 60%, menos de aproximadamente 55%, menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 45%, menos de aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 35°C, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, o menos de aproximadamente 5% de la cantidad molar de rhamnosa en el polisacárido.

En aspectos adicionales, la descripción incluye un polisacárido de microalgas, tal como de microalgas del género *Porphyridium*, que comprende cantidades detectables de xilosa, glucosa y galactosa, en donde la cantidad de galactosa en el polisacárido es al menos aproximadamente el 100% de la cantidad molar de xilosa en el mismo polisacárido. En otras realizaciones, rhamnosa es al menos aproximadamente 105%, al menos aproximadamente 110%, al menos aproximadamente 120%, al menos aproximadamente 130%, al menos aproximadamente 140%, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 250%, al menos aproximadamente 300%, al menos aproximadamente 350%, al menos aproximadamente 400%, al menos aproximadamente 450% o al menos aproximadamente 500%, o más, de la cantidad molar de manosa en el polisacárido. Realizaciones adicionales descritas en este documento incluyen aquellas en las que la cantidad de galactosa en un polisacárido de microalgas es mayor que la cantidad de xilosa en una base molar.

Alternativamente, la cantidad de galactosa, en el polisacárido, es menor que aproximadamente el 55% de la cantidad molar de xilosa en el mismo polisacárido. La descripción proporciona así polisacáridos en los que la cantidad de galactosa es inferior a aproximadamente 50%, inferior a aproximadamente 45%, inferior a aproximadamente 40%, inferior a aproximadamente 35%, inferior a aproximadamente 30%, inferior a aproximadamente 25%, inferior a aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, o menos de aproximadamente 5% de la cantidad molar de xilosa en el polisacárido.

En otros aspectos adicionales, la divulgación incluye un polisacárido de microalgas, tal como de microalgas del género *Porphyridium*, que comprende cantidades detectables de xilosa, glucosa, ácido glucurónico y galactosa, en donde la cantidad molar de uno o más de estos cinco monosacáridos en el polisacárido no está presente en un polisacárido de microalgas no modificadas. En algunas realizaciones, la cantidad de ácido glucurónico, en el polisacárido, es al menos aproximadamente 50% de la cantidad molar de glucosa en el mismo polisacárido. En otras formas de realización, el ácido glucurónico es al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 100%, al menos aproximadamente 105%, al menos aproximadamente 110%, al menos aproximadamente 120%, al menos aproximadamente 130%, al menos aproximadamente 140%, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 250%, al menos aproximadamente 300%, al menos aproximadamente 350%, al menos aproximadamente 400%, al menos aproximadamente 450%, o al menos aproximadamente 500%, o más, de la cantidad molar de glucosa en el polisacárido. Las realizaciones adicionales descritas en este documento incluyen aquellas en las que la cantidad de ácido glucurónico en un polisacárido de microalgas es mayor que la cantidad de glucosa en una base molar.

En otras realizaciones, el exopolisacárido, o el polisacárido homogeneizado celular, comprende glucosa y galactosa en donde la cantidad molar de glucosa en el exopolisacárido, o el polisacárido homogeneizado celular, es al menos aproximadamente el 55% de la cantidad molar de galactosa en el exopolisacárido o polisacárido. Alternativamente, la cantidad molar de glucosa en el exopolisacárido, o el polisacárido homogeneizado celular, es al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 100% de la cantidad molar de galactosa en el exopolisacárido o polisacárido.

En aún otros aspectos, la descripción incluye un polisacárido de microalgas, tal como de microalgas del género *Porphyridium*, que comprende cantidades detectables de xilosa, glucosa, ácido glucurónico, galactosa, al menos un monosacárido seleccionado de arabinosa, fucosa, N-acetil galactosamina y ácido N-acetil neuramínico, o cualquier combinación de dos o más de estos cuatro monosacáridos.

En una realización, se describe un método para determinar la cantidad de ficoeritrina por gramo seco de células en una composición formulada para el cuidado de la piel cuantificando la cantidad de ciertas moléculas que se sabe están presentes en ciertos niveles o rangos de niveles en *Porphyridium* las células.

Dicha medición es una indicación de cuántos gramos de biomasa de *Porphyridium* seco por gramo de producto para el cuidado de la piel formulado se encuentran en una formulación dada. Por ejemplo, se sabe que los compuestos enumerados en la Figura 7 están presentes en *Células de Porphyridium* en ciertos rangos de niveles. Las cantidades de compuestos, como las enumeradas en la Figura 7, se determinaron mediante análisis de *Porphyridium* biomasa celular cultivada en medio con abundancia de nitrógeno bajo condiciones de luz diurna al aire libre, es decir: células de color rojo profundos que contienen cantidades de ficoeritrina típicamente vistas en células cultivadas en medios artificiales de agua de mar tales como los descritos en el Ejemplo 1. Dada una cierta cantidad de un compuesto en una composición formulada para el cuidado de la piel, el experto puede determinar el número de gramos secos de biomasa de *Porphyridium* están presentes por gramo de producto de cuidado de la piel formulado. La cantidad de gramos secos de *Porphyridium* las células presentes en la composición se pueden usar para determinar si las células contienen menos o más de una cierta cantidad de ficoeritrina por gramo seco de células.

IV Composiciones Cosmecéuticas y Aplicación Tópica

General

Se proporcionan composiciones que comprenden polisacáridos, extractos de células enteras o mezclas de polisacáridos y extractos de células enteras para aplicación tópica o administración no sistémica. El polisacárido puede ser uno cualquiera o más de los polisacáridos de microalga descritos en este documento, incluidos los producidos por una especie, o una combinación de dos o más especies, en la Tabla 1. De forma similar, un extracto de células enteras puede ser el preparado a partir de una especie de microalgas, o una combinación de dos o más especies, en la Tabla 1. En algunas realizaciones, polisacáridos, tales como exopolisacáridos y extractos celulares de microalgas del género *Porphyridium* se usan en la práctica de la invención. Una composición de la invención puede comprender de entre aproximadamente el 0,001% y aproximadamente el 100%, aproximadamente 0,01% y aproximadamente 90%, aproximadamente 0,1% y aproximadamente 80%, aproximadamente 1% y aproximadamente 70%, aproximadamente 2% y aproximadamente 60%, aproximadamente 4% y aproximadamente 50%, aproximadamente 6% y aproximadamente 40%, aproximadamente 7 % y aproximadamente 30%, aproximadamente 8% y aproximadamente 20%, o aproximadamente 10% de polisacárido, extracto celular, en peso.

En otras realizaciones, la composición comprende un vehículo adecuado para administración tópica y/o un conservante adecuado para administración tópica; y células de Rhodophyte, opcionalmente del género *Porphyridium*. Las células pueden contener cantidades reducidas de la pigmentación roja por los métodos de preparación descritos en este documento. En algunos casos, un extracto acuoso de una composición que comprende *Porphyridium* las células contienen no más de 75% a no más de aproximadamente 1% de la absorbancia por gramo a 545 nm de una segunda composición formulada de manera idéntica, excepto que contiene células de la misma especie de *Células de Porphyridium* que se cultivaron en un fotobiorreactor en medio ATCC 1495 ASW en presencia de 50 microeinsteins de luz por metro cuadrado por segundo. En realizaciones adicionales, el vehículo es adecuado para la administración tópica a humanos, tal como a la piel humana o un tejido de la piel.

En realizaciones alternativas, una composición para aplicación a la piel humana puede comprender un polisacárido aislado de células del género *Porphyridium*. Dicha composición puede comprender además un vehículo y/o conservante adecuado para administración tópica como se describe en este documento. En algunos casos, el polisacárido de la composición contiene no más de aproximadamente 10% de proteína en peso. En otras realizaciones, el polisacárido contiene no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 2%, o no más de aproximadamente 1% de proteína en peso. Por supuesto, el polisacárido también puede estar esencialmente, o completamente, libre de proteína o proteína detectable mediante métodos de ensayo como se describe en este documento después del tratamiento para eliminar la proteína.

En realizaciones adicionales, el polisacárido puede comprender una cantidad molar de glucosa que es al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60%, de la cantidad molar de galactosa. Alternativamente, la cantidad molar de glucosa en el polisacárido es mayor que la cantidad molar de galactosa. En realizaciones adicionales, el polisacárido contiene menos de un 0,1%, o menos de un 0,01%, de la cantidad molar de al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en arabinosa, rhamnosa, fucosa y N-acetilglucosamina. Opcionalmente, el polisacárido contiene menos de un 0,1%, o menos de un 0,01%, de la cantidad molar de arabinosa, rhamnosa, fucosa y N-acetilglucosamina.

En otras realizaciones adicionales, una composición puede comprender un polisacárido que comprende una cantidad molar de glucosa que es al menos aproximadamente 30%, o al menos aproximadamente 40%, de la cantidad molar de xilosa. En algunos casos, el polisacárido comprende una cantidad molar de glucosa entre aproximadamente 15,8 y aproximadamente 25,8%; y una cantidad molar de xilosa que está entre aproximadamente 37,5 y aproximadamente 45,5%. Alternativamente, el polisacárido comprende una cantidad molar de glucosa entre aproximadamente el 17,8 y aproximadamente el 23,8%; y una cantidad molar de xilosa que está entre aproximadamente 39,5 y aproximadamente 43,5%.

En aún otras realizaciones, los polisacáridos son exopolisacáridos sulfatados que contienen al menos 3,0% de azufre, al menos aproximadamente 3,5% de azufre, al menos aproximadamente 4,0% de azufre, al menos aproximadamente 4,5% de azufre, al menos aproximadamente 4,6% de azufre, al menos aproximadamente 4,75 % de azufre, al menos aproximadamente 5,0% de azufre, al menos aproximadamente 5,25% de azufre, al menos aproximadamente 5,5% de azufre, al menos aproximadamente 5,75% de azufre, al menos aproximadamente 6,0% de azufre, al menos aproximadamente 6,25% de azufre, al menos aproximadamente 6,5% de azufre, al menos aproximadamente 6,75% de azufre, o al menos aproximadamente 7,0% de azufre en peso del polisacárido. La cantidad o el nivel de sulfatación en los polisacáridos se puede analizar y comparar con la cantidad de sulfatos utilizados para cultivar las microalgas. De este modo, la cantidad o nivel de sulfatación en los polisacáridos de células cultivadas a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 500 mM, aproximadamente 600 mM, o aproximadamente 700 mM o más, sulfato (SO_4^{2-}) puede determinarse mediante métodos rutinarios y repetitivos descritos en el presente documento. La cantidad o nivel de azufre en peso en los polisacáridos de una muestra de células o material celular puede determinarse sin conocimiento de la cantidad de sulfato utilizada para cultivar las células.

Como una alternativa adicional, una composición para aplicación tópica a la piel humana puede comprender células de microalgas. Las células pueden ser las de género *Porphyridium* o cualquier otra especie o cepa como se describe en este documento. Opcionalmente, la composición que comprende además un transportador y/o conservante adecuado para administración tópica como se describe en este documento. En realizaciones alternativas, las células se homogeneizan (tal como mediante los métodos descritos en este documento) para generar o formar un homogeneizado de células de microalgas. En algunos casos, las células u homogeneizado de las mismas, y por lo tanto la composición, están esencialmente libres de coloración roja y/o verde. Opcionalmente, las células u homogeneizado de las mismas, y por lo tanto la composición, están completamente libres de coloración roja. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células (y, por lo tanto, el homogeneizado de las mismas) contiene menos de aproximadamente 15, menos de aproximadamente 10, menos de aproximadamente 5, menos de aproximadamente 2, menos de aproximadamente 1, menos de aproximadamente 0,5 o menos de aproximadamente 0,1 miligramos de ficoeritrina por gramo seco de células.

Alternativamente, las células (y por lo tanto un homogeneizado de las mismas) contienen un polisacárido sulfatado que tiene una cantidad de azufre en peso de al menos 3,0%, al menos 3,5%, al menos 4,0%, al menos 4,5%, al menos 4,6%, al menos 4.75%, al menos 5.0%, al menos 5.25%, al menos 5.5%, al menos 5.75%, al menos 6.0%, al menos 6.25%, al menos 6.5%, al menos 6.75%, o al menos 7.0% de azufre por peso del polisacárido como se describe en este documento. En realizaciones adicionales, el homogeneizado de células de microalgas contiene al menos dos, al menos tres, al menos cinco, al menos diez, o a al menos veinte veces la cantidad de polisacárido disponible en disolvente presente en una cantidad de células no homogeneizadas necesarias para generar el homogeneizado de células de microalgas.

En realizaciones adicionales, lo divulgado incluye una composición que comprende polisacáridos en partículas, tales como micropérlas o nanopérlas que comprenden un polisacárido descrito. En algunas realizaciones, las partículas de polisacáridos se denominan Marine Nanobeads™. La composición puede ser para mejorar la apariencia de la piel, como la piel humana. Los polisacáridos pueden tener cualquier nivel de sulfatación descrito en este documento. La composición puede ser estéril y/o no pirógena y opcionalmente sustancialmente libre de endotoxinas y/o proteínas. En otras realizaciones, la composición comprende adicionalmente ácido hialurónico u otro agente adecuado o deseable para el tratamiento de la piel. Ejemplos no limitantes de dicho agente incluyen aloe vera, urea, ácido alfa hidroxilo, vitamina E, ácido glicirricínico, metilsulfonilmetano (MSM) y colágeno.

En algunas realizaciones, la composición comprende un polisacárido de algas, en donde el polisacárido: (a) se ha hecho total o parcialmente insoluble en agua durante el secado; y (b) ha sido homogeneizado o molido o alterado de otro modo para generar partículas de la invención como se define en las reivindicaciones.

El polisacárido puede ser, por supuesto, el de una variedad de células de microalgas, tales como las descritas en la Tabla 1 y las del género *Porphyridium*. En algunos casos, el polisacárido está contenido en un material no acuoso. Como ejemplos no limitantes, el material puede estar contenido en un aceite adecuado para administración tópica, con ácido hexadecanoico o aceite que está contenido en una emulsión, como ejemplos representativos. La composición también puede comprender un vehículo y/o conservante adecuado para administración tópica. Por supuesto, la composición también puede estar sustancialmente libre de endotoxinas y/o proteínas así como ser estéril y/o no pirogénica. En realizaciones adicionales, el polisacárido se encapsula mediante un recubrimiento de liberación temporizada, tal como uno adecuado para la aplicación tópica a la piel humana. La composición se prepara mediante un método de fabricación o preparación como se define en las reivindicaciones. Por lo tanto, en algunos casos, la composición comprende un polisacárido que es parcial o completamente insoluble en agua, calentando una suspensión acuosa del polisacárido como se define en las reivindicaciones, eliminando así el agua de la suspensión. Las partículas de polisacáridos pueden ser parcialmente solubles de manera que sean menos de aproximadamente 70%, menos de aproximadamente 60%, menos más de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, o menos de aproximadamente 2% solubles en agua.

En otras realizaciones de la presente divulgación, el polisacárido se ha hecho parcial o completamente insoluble por un método seleccionado del grupo que consiste en reticulación química, deshidratación química mediante el desplazamiento de agua unida por un alcohol, precipitación de la solución usando un alcohol o un alcohol o una cetona o pH, y recubrimiento de partículas mediante microencapsulación. Ejemplos no limitantes de estos métodos son conocidos por la persona experta y se pueden usar en la práctica de la invención. Por ejemplos, véase Biomacromoléculas 2005 Nov-Dic; 6 (6): 3202-8; Arterioscler Thromb Vase Biol. 2004 Mar; 24 (3): 613-7; J Biomed Mater Res. 2001 Sep 15; 56 (4): 478-86; Dalton Trans. 2004 Sep 7; (17): 2621-34. Epub 2004 Jul 28; Biomacromoléculas 2004 Jan-Feb; 5 (1): 126-36; Anticoncepción. 2002 Aug; 66 (2): 137-40; Biomacromoléculas 2006 May; 7 (5): 1471-80; Biopolímeros. 1999 Sep; 50 (3): 227-37; Biomateriales. 2003 May; 24 (12): 2083-96; Int J Pharm. 2003 Nov 28; 267 (1-2): 13-25; Med Biol Eng Comput. 1998 Jan; 36 (1): 129-34 y Reprod Fertil Dev. 2002; 14 (5-6): 307-14. Un ejemplo representativo es la reticulación química a un material en fase sólida insoluble farmacéutica o cosméticamente aceptable, tal como un polímero, microperlas o nanopérlas. El material insoluble no necesita precipitar cuando está en una solución, pero incluye un material que permanece en suspensión cuando está en solución. La deshidratación o precipitación con alcohol se puede practicar con cualquier alcohol adecuado para uso farmacéutico o cosmético. Ejemplos no limitantes incluyen etanol o un alcohol graso tal como cetilo, estearilo, cetearilo o lanolina alcohol. Un método no limitante para microencapsular un cosmético se describe en la Patente de los Estados Unidos 4,752,496.

El uso de un método divulgado de la invención también incluye la molienda de material de polisacárido seco (tal como una película) en partículas mediante cualquier método adecuado. Ejemplos no limitantes de tales métodos se describen en el presente documento y producen partículas con un tamaño medio que puede oscilar entre aproximadamente 400 y aproximadamente 0,1 micrómetros.

En algunas realizaciones, la composición comprende partículas de polisacáridos que aumentan de volumen al contacto con agua en comparación con su volumen anhidro o parcialmente hidratado. En algunas realizaciones, las partículas aumentan en volumen en una cantidad seleccionada de al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 100%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 300%, en al menos aproximadamente 500%, al menos aproximadamente 1000%, o al menos aproximadamente 5000%.

En algunas realizaciones, el polisacárido del método está asociado con una proteína de fusión como se describe en este documento. En algunos casos, la proteína de fusión comprende una primera proteína con al menos 60% de identidad de aminoácidos con la proteína de SEQ ID NO: 15 y una segunda proteína. Alternativamente, el polisacárido del método contiene una cantidad de azufre en peso de al menos aproximadamente 3,0% de azufre a al menos aproximadamente 7,0% de azufre en peso como se describe en este documento, y opcionalmente también se asocia con una proteína de fusión. Un ejemplo de un vector de expresión para la expresión en *Porphyridium* de una proteína de fusión de unión a polisacárido: superóxido dismutasa se puede encontrar en SEQ ID NO: 36. En algunas realizaciones, se coloca un espaciador de 1-15 aminoácidos entre la glicoproteína y la segunda proteína para permitir flexibilidad entre las dos proteínas. La expresión de una proteína de fusión, en donde la segunda proteína heteróloga es una proteína dimerizante o multimerizante (tal como superóxido dismutasa) puede ser ventajosa cuando se desea una mayor viscosidad o propiedad gelificante del polisacárido porque los dímeros sirven para reticular el polisacárido. La reversibilidad de la reticulación está dictada en parte por la fuerza de la dimerización en tales proteínas de fusión proporcionada por la descripción. Las composiciones tópicas generalmente se formulan con un vehículo, tal como en una pomada o una crema, y opcionalmente pueden incluir una fragancia. Una clase no limitativa de composiciones tópicas es la de los cosmeceúticos. Otros ejemplos no limitantes de formulaciones tópicas incluyen geles, soluciones, vendas impregnadas, liposomas o microcápsulas biodegradables, así como lociones, aerosoles, aerosoles, suspensiones, polvos para espolvorear, vendas y apósitos impregnados, polímeros biodegradables y pieles artificiales. Otro ejemplo no limitante de una formulación tópica es el de una preparación oftálmica. Los vehículos para la administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, petróleo líquido, petróleo blanco, propilenglicol, compuesto de polioxietileno

polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, la composición se puede formular con una loción o crema adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en un vehículo. Los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

En algunas realizaciones, los polisacáridos contienen restos de fucosa. En otras realizaciones, los polisacáridos están sulfatados, tales como exopolisacáridos de microalgas del género *Porphyridium*. En algunas realizaciones, los polisacáridos serán los de una especie de *Porphyridium*, como una que haya sido objeto de manipulación genética y/o nutricional para producir polisacáridos con contenido alterado de monosacáridos y/o sulfatación alterada.

En realizaciones adicionales, una composición de la divulgación comprende un homogeneizado de células de microalgas y un vehículo tópico. En algunas realizaciones, el homogeneizado puede ser el de una especie enumerada en la Tabla 1 o puede ser un material producido por una especie en la tabla.

En realizaciones adicionales de la divulgación, una composición que comprende polisacárido de microalgas purificado y un vehículo adecuado para administración tópica también contiene una proteína de fusión (o quimérica) asociada con el polisacárido. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una primera proteína, o región polipeptídica, con al menos aproximadamente 60% de identidad de aminoácidos con la proteína de SEQ ID NO: 15. En otras realizaciones, la primera proteína tiene al menos aproximadamente 70%, en al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 98%, o superior, identidad de aminoácidos con la secuencia de SEQ ID NO: 15. Preferiblemente, la proteína de fusión se une a un exopolisacárido sulfatado de una célula del género *Porphyridium*. Es preferible que la unión de la proteína de fusión al polisacárido sea selectiva y de alta afinidad, aunque no se requiere para la práctica de la invención.

La proteína de fusión puede comprender una segunda proteína, o región polipeptídica, con una secuencia homogénea o heteróloga. Ejemplos no limitantes de la segunda proteína incluyen un anticuerpo, una enzima o una proteína estructural de la piel o un tejido de la piel, como la de un ser humano. En realizaciones opcionales, la enzima es superóxido dismutasa, tal como la que tiene al menos aproximadamente 60% de identidad de aminoácidos con la secuencia de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, o una proteína de la Tabla 21 y muestra actividad de superóxido dismutasa como ejemplos no limitantes. En algunas realizaciones, la superóxido dismutasa tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 98%, o superior, identidad de aminoácidos con la secuencia de SEQ ID NO: 12 o 13. En otras realizaciones, la segunda proteína es una proteína estructural de la piel seleccionada del grupo que consiste en elastina y una cadena de colágeno, tal como la de la piel humana. Las secuencias que codifican elastina y una cadena de colágeno son conocidas por la persona experta y pueden incorporarse en una proteína de fusión a través de métodos de rutina. Ejemplos de tales proteínas de piel humana también se describen en el presente documento en la lista de secuencias. Los ensayos para la actividad de la superóxido dismutasa son bien conocidos en la técnica. Para ejemplos véase Song et al., Clin Sci (Lond). 2007 Jan 8; Epub ahead of print, Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly-diagnosed Type II diabetes; y Liu et al., Phytomedicine. 2006 Dic 15, Protection of PC 12 cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity by salvianolic acid B, a new compound isolated from Radix Salviae miltiorrhizae. La presencia de cualquier proteína exógena o endógena expresada en microalgas se puede ensayar, por ejemplo, usando métodos bien conocidos tales como transferencia Western y ensayos ELISA.

En otras realizaciones, la segunda proteína es un anticuerpo. Ejemplos no limitantes de anticuerpos para su uso incluyen un anticuerpo que se une selectivamente a un antígeno de un patógeno seleccionado entre el VIH, el virus del herpes simple, la gonorrea, la clamidia, el virus del papiloma humano y la tricomoniasis. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

B. Métodos de formulación

Las composiciones de polisacáridos para aplicación tópica se pueden formular preparando primero una preparación purificada de polisacárido. Como ejemplo no limitante, el polisacárido del medio de crecimiento acuoso se precipita con un alcohol, se resuspende en un regulador diluido y se mezcla con un vehículo adecuado para la aplicación a la piel humana o al tejido de la mucosa, que incluye el canal vaginal. Alternativamente, el polisacárido puede purificarse a partir de medios de crecimiento y concentrarse por filtración de flujo tangencial u otros métodos de filtración, y formularse como se describió anteriormente. Los polisacáridos intracelulares también se pueden formular de una manera similar o idéntica después de la purificación a partir de otros componentes celulares.

Como un ejemplo no limitativo, la invención incluye un método de formulación de una composición cosmecéutica, comprendiendo dicho método cultivar células de microalgas en suspensión en condiciones para permitir la división celular; separar las células de microalgas de los medios de cultivo, en donde los medios de cultivo contienen moléculas de exopolisacáridos producidas por las células de microalgas; separando las moléculas de exopolisacáridos de otras moléculas presentes en los medios de cultivo; homogeneizar las células de microalgas; y

agregar las moléculas de exopolisacáridos separadas a las células antes, durante o después de la homogeneización. En algunas realizaciones, las células de microalgas son del género *Porphyridium*.

5 En otras realizaciones, la invención incluye un método para fabricar una composición que comprende partículas, comprendiendo el método aislar un polisacárido de microalgas; secar una suspensión acuosa del polisacárido a una película sólida en donde al menos una parte de la película se ha hecho total o parcialmente insoluble en agua; homogeneizar o de otro modo triturar o romper la película en partículas; y formular las partículas en un material no acuoso.

10 Por supuesto, el método puede practicarse con una variedad de células de microalgas, tales como las descritas en la Tabla 1 y las del género *Porphyridium*.

15 Como se describe en este documento, la composición resultante puede ser para mejorar la apariencia de la piel, tal como la piel humana. En algunas realizaciones, la formulación puede ser en la fase oleosa de una emulsión de aceite en agua. En otras realizaciones, el material no acuoso es un aceite adecuado para administración tópica, con ácido hexadecanoico y aceite que está contenido en una emulsión como ejemplos no limitantes. En realizaciones adicionales, el método comprende además formular las partículas en un vehículo y/o conservante adecuado para la administración tópica. La composición resultante también puede estar sustancialmente libre de endotoxinas y/o proteínas. En muchas realizaciones, la composición también se hace estéril y/o no pirogénica. Alternativamente, el método comprende adicionalmente formular ácido hialurónico en la composición.

20 En otras realizaciones, el polisacárido después de la etapa de secado es parcial o completamente insoluble en agua. Opcionalmente, el polisacárido después de la etapa de secado es soluble en agua a un porcentaje seleccionado de la lista que consiste en menos de aproximadamente 70%, menos de aproximadamente 60%, menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5% y menos de aproximadamente 2%.

25 Las realizaciones de la etapa de secado incluyen secado realizado entre aproximadamente 40 y aproximadamente 180°C, tal como entre aproximadamente 80 y aproximadamente 170, o entre aproximadamente 100 y aproximadamente 160, entre aproximadamente 125 y aproximadamente 155, entre aproximadamente 135 y aproximadamente 152, entre aproximadamente 140 y aproximadamente 150, o entre aproximadamente 145 y aproximadamente 148°C como ejemplos no limitantes. Opcionalmente, el secado se realiza en dos etapas, donde el primer paso comprende calentar la suspensión del polisacárido a no más de aproximadamente 60°C durante un primer período de tiempo para producir una película sólida seguida de calentamiento de la película sólida durante un segundo período de tiempo a no más de aproximadamente 160 °C. En realizaciones alternativas, los pasos primero y segundo comprenden calentar hasta no más de aproximadamente 80 y no más de aproximadamente 150, o hasta aproximadamente 100 y no más de 148°C, respectivamente. En algunas realizaciones, la suspensión del polisacárido se calienta durante el primer período de tiempo en presencia de aire para producir una película sólida y la película sólida se calienta durante el segundo período de tiempo en al menos un vacío parcial o de otro modo bajo presión reducida.

30 Después de la etapa de secado, la molienda puede realizarse por cualquier método adecuado. Ejemplos no limitantes incluyen un método seleccionado de la lista que consiste en molienda por chorro, molienda de bolas, fresado Retsch® y fresado en un dispositivo Quadro®. Las partículas resultantes de la composición pueden tener un tamaño medio entre aproximadamente 400 y aproximadamente 0,1 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas de la composición tienen un tamaño medio entre aproximadamente 100 y aproximadamente 0,1 micrómetros, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 0,1 micrómetros, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 0,1 micrómetros, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 0,5 micrómetros, o entre aproximadamente 5 y alrededor de 0.5 micras.

35 En algunas realizaciones, el polisacárido del método está asociado con una proteína de fusión como se describe en este documento. En algunos casos, la proteína de fusión comprende una primera proteína con al menos 60% de identidad de aminoácidos con la proteína de SEQ ID NO: 15 y una segunda proteína. Alternativamente, el polisacárido del método contiene una cantidad de azufre en peso de al menos aproximadamente 3,0% de azufre a al menos aproximadamente 7,0% de azufre en peso como se describe en este documento, y en algunas realizaciones está asociado con una proteína de fusión.

40 Ejemplos de polisacáridos, tanto secretados como intracelulares, que son adecuados para la formulación con un vehículo para aplicación tópica se enumeran en la Tabla 1.

45 En realizaciones adicionales, el polisacárido está asociado con una proteína de fusión (o quimérica) que comprende una primera proteína (o región polipeptídica) con al menos aproximadamente 60% de identidad de aminoácidos con la proteína de SEQ ID NO: 15. En algunos casos, la primera proteína tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos

aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 98%, o más, identidad de aminoácidos con la secuencia de SEQ ID NO: 15.

La proteína de fusión puede comprender una segunda proteína, o región polipeptídica, con una secuencia homogénea o heteróloga. Un ejemplo no limitante de la segunda proteína es una enzima superóxido dismutasa.

Ejemplos de vehículos adecuados para formular polisacáridos se describen anteriormente. Las relaciones de homogeneizado:vehículo están típicamente en el intervalo de aproximadamente 0,001:1 a aproximadamente 1:1 (volumen: volumen), aunque los métodos divulgados en el presente documento comprenden proporciones fuera de este intervalo, tales como, pero sin limitación, aproximadamente 0,01:1. y aproximadamente 0.1:1.

Los extractos celulares de microalgas también se pueden formular para administración tópica. Es preferible pero no necesario que las células se vean dañadas física o químicamente como parte del proceso de formulación. Por ejemplo, las células se pueden centrifugar del cultivo, lavar con un regulador tal como solución salina regulada con fosfato 1,0 mM, pH 7,4, y someter a sonicación. Preferiblemente, las células se someten a ultrasonidos hasta que las paredes celulares se hayan alterado sustancialmente, como se puede determinar bajo un microscopio. Por ejemplo, *Porphyridium sp.* las células pueden ser sometidas a sonicación usando un sonicador Misonix como se describe en el Ejemplo 3.

Las células también se pueden secar y triturar utilizando medios tales como mortero y mortero, molienda de coloides, molienda de bolas u otro método físico para romper las paredes celulares.

Después de la rotura celular, el homogeneizado de células puede formularse con un vehículo y una fragancia como se describe anteriormente para los polisacáridos.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención también pueden usarse como agentes para el tratamiento del cabello tales como vendajes para el cabello (por ejemplo, cremas para el cabello, aerosoles para el cabello, tónicos capilares, geles para el cabello, lociones para el cabello, aceites para el cabello, esencias para el cabello, aguas para el cabello, ceras para el cabello y mousses para el cabello), champús, enjuagues para acabado, tratamientos para el cabello, cremas para el cabello, mousses para el cabello, lociones para el cabello, colorantes para el cabello, tintes para el cabello (por ejemplo, colorantes para el cabello, tintes para el cabello en una parte y tintes para el cabello en dos partes), soluciones permanentes (por ejemplo, soluciones de ondas permanentes, soluciones para alisar el cabello y agentes permanentes de retención de ondas), potenciadores del flujo sanguíneo, lociones para el cuero cabelludo y agentes anticaída. Otra aplicación de las composiciones de acuerdo con la presente invención incluye, por ejemplo, cosméticos para el cuidado de la piel tales como tónicos, sueros, tónicos blanqueadores, lociones lechosas, lociones blanqueadoras, cremas, cremas blanqueadoras, ungüentos, ungüentos blanqueadores, lociones, lociones blanqueadoras, aceites, paquetes faciales. Además, todavía otras aplicaciones de las composiciones según la presente invención incluyen, por ejemplo, cosméticos de maquillaje tales como bases, bases líquidas, barras de labios, brillos de labios, sombras de ojos, polvos, polvos faciales, coloretes, sombras de ojos, colirios, máscaras, y lápices de cejas. Otras aplicaciones de las composiciones de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, limpiadores de la piel tales como jabón, cremas limpiadoras, lociones limpiadoras, leches limpiadoras, composiciones cosméticas, lavados faciales y champús corporales. Además, otra aplicación de las composiciones de acuerdo con la presente invención incluye cosméticos de acabado tales como manicuras. Otras aplicaciones de las composiciones de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, composiciones cosméticas en forma de agentes de baño, parches, perfumes, pastas dentales, lavados dentales y enjuagues bucales.

C. Composiciones coadministradas

Las composiciones tópicas pueden comprender una porción de una composición completa vendida como una sola unidad. Otras porciones de las composiciones completas pueden comprender un suplemento oral destinado a la administración como parte de un régimen para alterar el aspecto de la piel. Debido a que las capas superiores de la piel contienen células muertas, los nutrientes administrados a través de los capilares no pueden alcanzar las capas externas de las células. Las capas externas de las células deben recibir nutrientes a través de la administración tópica. Sin embargo, la administración tópica no siempre es un método efectivo para proporcionar nutrientes a las capas profundas de la piel que contienen células vivas. Las composiciones proporcionadas en este documento comprenden tanto composiciones tópicas que contienen polisacáridos de algas y/o extractos celulares como composiciones orales que comprenden moléculas nutraceuticas tales como polisacáridos purificados, extractos de células completas, carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados y otras moléculas que se administran a la piel a través de capilares. El efecto combinado de la administración tópica y oral de estas moléculas y extractos proporciona un beneficio para la salud de la piel que es aditiva o sinérgica en comparación con el uso de solo un producto tópico o solo un producto administrado por vía oral.

Ejemplos de los componentes tópicos de la composición incluyen exopolisacárido de *Porphyridium cruentum*, *Porphyridium sp.* Otros componentes de la composición tópica pueden incluir polisacáridos y/o extractos de células de las especies enumeradas en la Tabla I.

Los extractos celulares para administración tópica también pueden incluir homogeneizados celulares de microalgas que se han modificado genéticamente. Por ejemplo, homogeneizados de *Porphyridium sp.* que se han diseñado para expresar un gen exógeno que codifica la superóxido dismutasa se pueden formular para la administración tópica. Otros genes que se pueden expresar incluyen enzimas de biosíntesis de carotenoides y enzimas de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados.

Ejemplos de composiciones para administración oral incluyen uno o más de los siguientes: DHA, EPA, ARA, ácido lineoleico, luteína, licopeno, betacaroteno, braunixantina, zeaxantina, astaxantina, ácido linoleico, alfacaroteno, vitamina C y superóxido dismutasa. Las composiciones para administración oral generalmente incluyen un vehículo tal como los descritos anteriormente. Las composiciones orales se pueden formular en forma de tableta o cápsula. Las composiciones orales también se pueden formular en una forma ingerible tal como un alimento, té, líquido, etc. Las composiciones orales pueden comprender, por ejemplo, al menos 50 microgramos, al menos 100 microgramos, al menos 50 miligramos, al menos 100 miligramos, a al menos 500 miligramos, y al menos un gramo de una molécula pequeña, como un carotenoide o un ácido graso poliinsaturado.

En el presente documento se divulgan composiciones nutraceuticas administradas por vía oral que comprenden uno o más polisacáridos o extracto de células de microalgas u homogeneizado. Una composición nutraceutica sirve como un suplemento nutricional en el momento del consumo. En una descripción, un nutraceutico puede ser bioactivo y servir para afectar, alterar o regular la bioactividad de un organismo.

Un nutraceutico puede estar en forma de una formulación sólida o líquida. En una descripción, una formulación sólida incluye una formulación de cápsula o tableta como se describió anteriormente.

En una divulgación, un nutraceutico sólido puede ser simplemente un extracto de microalgas seco u homogeneizado, así como polisacáridos secos *per se*. Formulaciones líquidas, incluyen suspensiones, así como soluciones acuosas, de polisacáridos, extractos u homogeneizados. En una descripción, el nutraceutico se deriva de microalgas, mientras que en otro ejemplo el nutraceutico se deriva de otras fuentes tales como, por ejemplo, plantas, extractos de plantas y moléculas sintetizadas químicamente. En una realización preferida, una composición tópica y una composición oral contienen al menos una molécula en común.

Los métodos divulgados en este documento incluyen un método para producir una composición nutraceutica. Tal método puede comprender secar un homogeneizado de células de microalgas o extracto de células. El homogeneizado puede producirse por ruptura de microalgas que se ha separado de los medios de cultivo utilizados para propagar (o cultivar) las microalgas. Por lo tanto, en un ejemplo no limitante, un método comprende cultivar microalgas rojas; separar las microalgas de los medios de cultivo; interrumpir las microalgas para producir un homogeneizado; y secar el homogeneizado. En realizaciones similares, un método puede comprender secar uno o más polisacáridos producidos por las microalgas.

En una divulgación, un método comprende secado por secado en bandeja, secado por centrifugado, secado por rotación, secado súbito por centrifugado o liofilización. En otra descripción, los métodos comprenden la ruptura de microalgas mediante un método seleccionado entre ruptura de presión, sonicación y molienda con bolas.

En una descripción adicional, un método comprende además la formulación del homogeneizado, extracto o polisacáridos con un vehículo adecuado para consumo humano. Como se describe en este documento, la formulación puede ser la de la formación de tabletas o la encapsulación del homogeneizado o extracto.

En una divulgación adicional, los métodos comprenden el uso de homogeneizados de microalgas, extractos o polisacáridos en los que las células contienen una secuencia de ácido nucleico exógeno, tal como en el caso de las células modificadas descritas en este documento. La secuencia exógena puede codificar un producto génico capaz de expresarse en las células o ser una secuencia que aumenta la expresión de uno o más productos génicos de microalgas endógenos.

En una divulgación adicional, la composición tópica y la composición oral contienen al menos una molécula en común. Por ejemplo, la composición tópica contiene homogeneizado de *Células de Porphyridium* que contienen zeaxantina, y la composición oral contiene zeaxantina. En otra realización, la composición tópica contiene homogeneizado de *Células de Porphyridium* que contienen polisacáridos, y la composición oral contiene polisacáridos purificados a partir de medios de cultivo de *Porphyridium*.

Algunas de las composiciones descritas en este documento se envasan para la venta como una sola unidad. Por ejemplo, una unidad para la venta comprende un primer contenedor que contiene una composición para administración tópica, un segundo contenedor que contiene dosis individuales de una composición para administración oral y, opcionalmente, instrucciones para la administración conjunta de la composición tópica y oral.

Otras divulgaciones incluyen un producto de combinación que comprende 1) una primera composición que comprende un extracto de microalgas y un vehículo adecuado para aplicación tópica en la piel; y 2) una segunda composición que comprende al menos un compuesto y un vehículo adecuado para el consumo humano; en donde la

primera y la segunda composiciones se empaquetan para la venta como una sola unidad. Por lo tanto, la descripción incluye el empaquetamiento conjunto de las dos composiciones, opcionalmente con unas instrucciones y/o una etiqueta que indica la identidad de los contenidos y/o su uso adecuado.

5 En algunas divulgaciones, la primera composición puede ser una formulación tópica o una formulación no sistémica, opcionalmente una cosmeceútica, como se describe en este documento. Preferiblemente, la primera composición comprende un vehículo adecuado para la aplicación tópica a la piel, tal como la piel humana. Ejemplos no limitantes de la segunda composición incluyen una composición alimenticia o nutracéutica como se describe en este documento. Preferiblemente, la segunda composición comprende al menos un vehículo adecuado para el consumo humano, tal como el presente en un producto o composición alimenticia. Los productos combinados pueden empaquetarse por separado para su uso posterior combinados por un usuario o envasados para facilitar la compra y el uso por parte de un consumidor. El envasado de la primera y la segunda composición puede estar a la venta como una sola unidad.

15 D. Métodos de mejora cosmética

En un aspecto adicional, la descripción incluye un método para mejorar cosméticamente la piel o su apariencia o textura. En algunos casos, la mejora se debe a la elasticidad de la piel aumentada o mejorada. La piel puede ser la de un ser humano, como la piel de la cara, las manos, los pies u otras partes del cuerpo humano. En otras realizaciones, la mejora puede ser en la apariencia o textura de los labios humanos. El método puede comprender la administración de una composición de polisacáridos adecuada para inyección en la piel o tejido del labio para mejorar el aspecto de la misma. La composición puede ser cualquiera como se describe aquí adecuada para el método de administración o aplicación. En algunas realizaciones, la inyección se realiza para aliviar o eliminar arrugas. En otras realizaciones, el tratamiento reduce los signos visibles de envejecimiento y/o arrugas. Como es sabido por el experto, la piel humana, a medida que envejece, pierde gradualmente los componentes de la piel que mantienen la piel dócil y juvenil. Los componentes de la piel incluyen colágeno, elastina y ácido hialurónico, que han sido objeto de interés y uso para mejorar la apariencia de la piel envejecida. La presente descripción incluye composiciones de polisacáridos de microalgas, células de microalgas, extractos y homogeneizados de células de microalgas para su uso de la misma manera que el colágeno y el ácido hialurónico. En algunas realizaciones, los polisacáridos serán los de una especie de *Porphyridium*, como una que ha sido objeto de manipulación genética y/o nutricional para producir polisacáridos con contenido alterado de monosacáridos y/o sulfatación alterada. En algunas realizaciones, los polisacáridos se formulan como un fluido, opcionalmente elástico y/o viscoso, adecuado para inyección. Las composiciones se pueden usar como cargas dérmicas inyectables como un ejemplo no limitante. Las inyecciones se pueden hacer en la piel para rellenar las arrugas y líneas faciales. En otras realizaciones, las inyecciones pueden usarse para mejorar los labios. Estas aplicaciones de polisacáridos son ejemplos no limitantes de métodos terapéuticos no farmacológicos de la divulgación. En realizaciones adicionales, los polisacáridos de microalgas, extractos celulares y homogeneizados celulares de la presente divulgación pueden coformularse con colágeno y/o ácido hialurónico (tales como los productos Restylane® y Hylaform®) y pueden inyectarse en el tejido facial. Ejemplos no limitantes de dicho tejido incluyen debajo de la piel en áreas de arrugas y labios. En una realización preferida, el polisacárido está sustancialmente libre de proteína. Las inyecciones pueden ser repetidas como lo considere apropiado el facultativo experto, tal como con una periodicidad de aproximadamente tres, aproximadamente cuatro, aproximadamente seis, aproximadamente nueve o aproximadamente doce meses. En otra realización preferida, un material de ácido hialurónico se mezcla con un polisacárido del género *Porphyridium* antes de la administración conjunta. La presente descripción en esta realización particular proporciona una vida media más larga para el ácido hialurónico debido a la potente inhibición de la hialuronidasa por parte de polisacáridos aislados de microalgas del género *Porphyridium*. Esto permite menos inyecciones a un paciente. Preferiblemente, el polisacárido del género *Porphyridium* está al menos sustancialmente libre de proteína. Preferiblemente, la mezcla de polisacáridos del género *Porphyridium* y ácido hialurónico es estéril. Por lo tanto, la divulgación incluye un método de mejora cosmética que comprende inyectar un polisacárido producido por microalgas en la piel de los mamíferos. La inyección puede ser de una cantidad efectiva para producir una mejora cosmética, tal como disminución de arrugas o disminución de la apariencia de arrugas como ejemplos no limitantes. Alternativamente, la inyección puede ser de una cantidad que produce alivio en combinación con una serie de inyecciones adicionales. En algunos métodos, el polisacárido es producido por una especie de microalgas, o dos o más especies, enumeradas en la Tabla 1. En un ejemplo no limitante, la especie de microalgas es del género *Porphyridium* y el polisacárido está sustancialmente libre de proteína.

La presente divulgación incluye además un método para inhibir la actividad de hialuronidasa que comprende poner en contacto la hialuronidasa con un polisacárido descrito. En algunas realizaciones, la actividad de hialuronidasa está en la piel o en un tejido de piel de un sujeto humano y el contacto comprende administrar el polisacárido al sujeto. La administración puede comprender la inyección del polisacárido, o una composición que contiene polisacáridos de la presente divulgación, en la piel o el tejido de la piel y/o en los labios o un tejido del labio. La cantidad de polisacárido administrada puede ser cualquiera que sea suficiente o eficaz para inhibir la actividad de hialuronidasa a un nivel tal como lo desee un experto en la materia. El nivel de reducción en la actividad de hialuronidasa se puede determinar por métodos de rutina, que incluyen un método comparativo en donde la actividad en presencia de polisacárido se compara con la actividad en ausencia de la misma. Por lo tanto, la cantidad de reducción puede ser al menos aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%,

aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80% o aproximadamente 90% o más que el observado en la ausencia de polisacárido. En una realización preferida, el polisacárido utilizado para inhibir la hialuronidasa procede de una especie del género *Porphyridium*.

La presente divulgación también incluye un método para estimular la síntesis o producción de procolágeno y/o colágeno en una célula, tal como un fibroblasto humano, poniendo en contacto la célula con un polisacárido divulgado. En algunas realizaciones, la célula está en la piel de un sujeto humano y la puesta en contacto comprende administrar el polisacárido al sujeto. La administración puede comprender la inyección del polisacárido, o una composición que contiene polisacáridos de la presente divulgación, en la piel o un tejido de la piel y/o en los labios o un tejido del labio. La cantidad de polisacárido administrada puede ser cualquiera que sea suficiente o efectiva para estimular la síntesis de procolágeno o colágeno a un nivel deseado por una persona experta, tal como un aumento de al menos aproximadamente 5%, 10%, aproximadamente 20% o aproximadamente 30% o más que el observado en ausencia de polisacárido. De una manera relacionada, el polisacárido puede usarse para inhibir la actividad de collagenasa. La inhibición puede ser suficiente para dar como resultado un aumento de los niveles de procolágeno o colágeno como se describió anteriormente. Adicionalmente, la presente divulgación incluye un método para estimular la síntesis de elastina o producción en una célula, tal como un fibroblasto, poniendo en contacto la célula con un polisacárido revelado. De manera relacionada, el polisacárido también puede inhibir la actividad elastasa producida por una célula, tal como, pero sin limitación, un fibroblasto. En algunas realizaciones, la célula está en la piel de un sujeto humano y el contacto comprende administrar el polisacárido al sujeto. La administración puede comprender la inyección del polisacárido, o una composición que contiene polisacáridos de la presente descripción, en la piel o un tejido de la piel. La cantidad de polisacárido administrada puede ser cualquiera que sea suficiente o efectiva para estimular la síntesis de elastina a un nivel deseado por un experto, tal como un aumento de al menos aproximadamente 50%, 100%, aproximadamente 200% o aproximadamente 300% o más que la observada en ausencia de polisacárido. En una realización preferida, la secreción de elastina estimuladora de polisacáridos contiene al menos 5,0% de azufre en peso. De forma similar, el polisacárido puede disminuir la actividad elastasa en aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, o aproximadamente un 60% o más de lo observado en ausencia de polisacárido. La presente divulgación incluye además el uso de los polisacáridos descritos basándose en su actividad antioxidante observada. Por lo tanto, la descripción incluye un método para proporcionar actividad antioxidante a la piel o a un tejido de la piel, tal como la de un sujeto humano, mediante la administración de un polisacárido. En algunas realizaciones, el método inhibe la formación y/o actividad de especies de oxígeno reactivo (ROS) en la piel. La descripción incluye así un método para prevenir o tratar una enfermedad o afección no deseada asociada con ROS o estrés oxidativo. Ejemplos no limitantes de dicha enfermedad o condición no deseada incluyen la reducción de la inflamación o irritación de piel o labios humanos. En algunas realizaciones, la composición de polisacárido comprende uno o más de otros agentes o compuestos con actividad antioxidante. Ejemplos no limitantes de otros agentes incluyen vitamina A (retinil palmitato), vitamina C (como uno o más de ascorbil palmitato, ascorbil palmitato de sodio y tetrahexildecil ascorbato), vitamina D (colecalfiferol), vitamina E (como tocoferol acetato y tocoferol/D-alfa tocoferol), ácido alfa lipoico, coenzima, L-selenometionina y beta glucano.

De manera relacionada, se usa un polisacárido basado en su antiinflamatorio en la piel o en un tejido de la piel. En algunas realizaciones, el método inhibe los leucocitos polimorfonucleares (PMN) en la quimiotaxis, tal como en los sitios de inflamación en la piel. El nivel de inhibición puede ser de aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, o aproximadamente 50% o más que el observado en ausencia de polisacárido. En otras realizaciones, el método inhibe la síntesis o liberación de una citocina proinflamatoria, tal como interferón-gamma o interleucina-1-alfa. Con interferón-gamma como ejemplo, la inhibición puede ser de al menos aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, o aproximadamente 90% o más que el observado en ausencia de polisacárido. Con interleucina-1-alfa como ejemplo, la inhibición puede ser al menos aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, o aproximadamente 80% o más que la observada en ausencia de polisacárido. En realizaciones adicionales, el método inhibe la proliferación de células mononucleares en sangre periférica, incluidos linfocitos, monocitos y macrófagos. El nivel de inhibición puede ser de aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, o aproximadamente 80% o más que el observado en ausencia de polisacárido.

Los métodos descritos anteriormente pueden ser individualmente parte de un método para reducir los signos de envejecimiento o reducir el aspecto del envejecimiento en la piel humana como se describe en este documento. Los métodos también pueden basarse en la idea de que la biomasa de microalgas y los polisacáridos de la presente divulgación también reducen los efectos de la luz UV o radiación. En algunas realizaciones, el polisacárido reduce la formación del dímero de timidina en el ADN provocado por la exposición a la radiación UVB. La reducción puede ser al menos aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, o aproximadamente 80% o más que la observada en ausencia de polisacárido.

De una manera relacionada, los métodos divulgados se pueden usar para proteger la piel humana o el tejido del labio de la radiación de luz UV. La radiación UV puede comprender UVA y/o UVB. El método puede comprender aplicar una composición de la piel o un tejido de la piel divulgada en una cantidad eficaz o suficiente para proteger, al menos en parte, la piel de la radiación UV. En algunas realizaciones, la cantidad es la que reduce la formación del dímero de timidina y/o quemaduras solares. En una realización alternativa, una composición de la descripción se puede aplicar en una cantidad efectiva o suficiente, tal como la que reduce el daño mediado por UV adicional, para tratar la piel que ha sido dañada por la radiación UV. Un ejemplo adicional no limitante es un método para tratar la piel para reducir el riesgo de cáncer de piel inducido por la luz solar o la radiación UV.

Las composiciones de polisacáridos pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril y/o no pirogénica, por ejemplo, como una suspensión acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran manitol, agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido que incluya mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga tal como Ph. Helv o un alcohol similar.

Las composiciones de polisacáridos inyectables estériles preferiblemente contienen menos de 1% de proteína en función del peso seco de la composición, más preferiblemente menos de 0,1% de proteína, más preferiblemente menos de 0,01% de proteína, menos de 0,001% de proteína, menos de 0,0001% de proteína, más preferiblemente menos de 0,00001% de proteína, más preferiblemente menos de 0,000001% de proteína.

V Expresión génica en microalgas

Los genes pueden expresarse en microalgas proporcionando, por ejemplo, secuencias codificantes en un enlace operable con promotores.

Un diseño de vector de ejemplo para la expresión de un gen en microalgas contiene un primer gen en enlace operable con un promotor activo en algas, codificando el primer gen una proteína que imparte resistencia a un antibiótico o herbicida. Opcionalmente, el primer gen es seguido por una secuencia 3' no traducida que contiene una señal de poliadenilación. El vector también puede contener un segundo promotor activo en algas en enlace operable con un segundo gen. El segundo gen puede codificar cualquier proteína, por ejemplo, una enzima que produce moléculas pequeñas o una hormona de crecimiento de mamífero que puede estar ventajosamente presente en un nutraceutico.

Es preferible utilizar ADNc optimizados para codones: para métodos de recodificación de genes para expresión en microalgas, véase, por ejemplo, Solicitud de patente de los Estados Unidos 20040209256.

Se ha demostrado que muchos promotores en los vectores de expresión son activos en las algas, incluyendo tanto los promotores que son endógenos a las algas transformadas como los promotores que no son endógenos a las algas que se transforman (es decir: promotores de otras algas, promotores de plantas y promotores de virus de plantas o virus de algas). Se han descrito ejemplos de métodos para transformar microalgas, además de los demostrados en la siguiente sección de ejemplos, que incluyen métodos que comprenden el uso de promotores exógenos y/o endógenos que son activos en microalgas y genes de resistencia a antibióticos funcionales en microalgas. Véase por ejemplo; Curr Microbiol. 1997 Dec; 35 (6): 356-62 (*Chlorella vulgaris*); Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan; 4 (1): 63-73 (*Chlorella ellipsoidea*); Mol Gen Genet. 1996 Oct 16; 252 (5): 572-9 (*Phaeodactylum tricornutum*); Plant Mol Biol. 1996 Apr; 31 (1): 1-12 (*Volvox carteri*); Proc Natl Acad Sci USA. 1994, Nov 22; 91 (24): 11562-6 (*Volvox carteri*); Falcatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C, PMID: 10383998, 1999 May; 1 (3): 239-251 (Laboratory of molecular Plant Biology, Stazione Zoologica, Villa Comunale, 1-80121 Nápoles, Italia) (*Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii*); Planta Physiol. 2002 May; 129 (1): 7-12. (*Porphyridium* sp.); Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Jan 21; 100 (2): 438-42. (*Chlamydomonas reinhardtii*); Proc Natl Acad Sci USA. 1990 Feb; 87 (3): 1228-32. (*Chlamydomonas reinhardtii*); Nucleic Acids Res. 1992 Jun 25; 20 (12): 2959-65; Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan; 4 (1): 63-73 (*Chlorella*); Biochem Mol Biol Int. 1995 Aug; 36 (5): 1025-35 (*Chlamydomonas reinhardtii*); J Microbiol. 2005 Aug; 43 (4): 361-5 (*Dunaliella*); Yi Chuan Xue Bao. 2005 Apr; 32 (4): 424-33 (*Dunaliella*); Mar Biotechnol (NY). 1999 May; 1 (3): 239-251. (*Thalassiosira* y *Phaeodactylum*); Koksharova, Appl Microbiol Biotechnol 2002 Feb; 58 (2): 123-37 (varias especies); Mol Genet Genomics. 2004 Feb; 271 (1): 50-9 (*Thermosynechococcus elongates*); J. Bacteriol. (2000), 182, 211-215; FEMS Microbiol Lett. 2003 Apr 25; 221 (2): 155-9; Planta Physiol. 1994 Jun; 105 (2): 635-41; Plant Mol Biol. 1995 Dic; 29 (5): 897-907 (*Synechococcus* PCC 7942); Mar Pollut Bull. 2002; 45 (1-12): 163-7 (*Anabaena* PCC 7120); Proc Natl Acad Sci USA. 1984 Mar; 81 (5): 1561-5 (*Anabaena* (varias cepas)); Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Mar 27; 98 (7): 4243-8 (*Synechocystis*); Wirth, Mol

Gen Genet 1989 Mar; 216 (1): 175-7 (varias especies); Mol Microbiol, 2002 Jun; 44 (6): 1517-31 y Plasmid, 1993 Sep; 30 (2): 90-105 (*Fremyella diplosiphon*); Hall et al. (1993) Gene 124: 75-81 (*Chlamydomonas reinhardtii*); Gruber et al. (1991). Micro actual. 22: 15-20; Jarvis et al. (1991) Genet actual. 19: 317-322 (*Chlorella*); para promotores adicionales véase también la Tabla 1 de la Patente de los Estados Unidos 6,027,900).

Los promotores adecuados pueden usarse para expresar una secuencia de ácido nucleico en microalgas. En algunas realizaciones, la secuencia es la de un gen exógeno o ácido nucleico. En algunas realizaciones, el gen exógeno puede codificar una superóxido dismutasa (SOD) o una fusión de SOD. En casos de una secuencia codificante de ácido nucleico exógeno, el uso del codón puede optimizarse opcionalmente en todo o en parte para facilitar la expresión en microalgas.

La divulgación incluye células del género *Porphyridium* que se han transformado establemente con un vector que contiene un gen marcador seleccionable en un enlace operable con un promotor activo en microalgas. La descripción incluye células del género *Porphyridium* que se han transformado establemente con un vector que contiene un gen marcador seleccionable en un enlace operable con un promotor endógeno a un miembro del orden Rhodophyte. Dichos promotores incluyen SEQ ID NOs: 6, 20 y 21, promotores del genoma de *Chondrus crispus* (número de acceso Genbank Z47547), promotores del genoma de *Cyanidioschyzon merolae* (véase por ejemplo Matsuzaki, M. et al. Nature 428, 653657 (2004)); Plant Physiology 137: 567-585 (2005)); toda la secuencia disponible en <http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/db/chromosome.cgi>). La descripción incluye células del género *Porphyridium* que se han transformado establemente con un vector que contiene un gen marcador seleccionable en un enlace operable con un promotor distinto de un promotor de CMV como el encontrado en la solicitud PCT WO2006013572.

La divulgación proporciona la expresión de una secuencia de proteína que se encuentra estrechamente asociada con polisacáridos de microalgas. Un ejemplo no limitante es la proteína de SEQ ID NO: 15, que se ha demostrado que está estrechamente asociada con, pero no unida covalentemente al polisacárido de *Porphyridium sp.* (véase J. Phycol. 40: 568-580 (2004)). Cuando *Porphyridium* los medios de cultivo se someten a filtración de flujo tangencial utilizando un filtro que contiene un tamaño de poro muy superior al peso molecular de la proteína de la SEQ ID NO: 15, el polisacárido en el retenido contiene cantidades detectables de la proteína, lo que indica su estrecha asociación con el polisacárido. El peso molecular calculado de la proteína es aproximadamente de 58 kD, sin embargo, con la glicosilación, la proteína es de aproximadamente 66 kD.

Dicha proteína se puede expresar directamente de manera que estará presente con los polisacáridos como se describe o se expresa como parte de una fusión o proteína quimérica como se describe en este documento. Como una proteína de fusión, la porción que está estrechamente asociada con un polisacárido de la microalga efectivamente une las otras porciones al polisacárido. Una proteína de fusión puede comprender una segunda proteína o polipéptido, con una secuencia homogénea o heteróloga. Una secuencia homogénea daría como resultado un dímero o multímero de la proteína, mientras que una secuencia heteróloga puede introducir una nueva funcionalidad, que incluye la de una proteína o polipéptido bioactivo.

Ejemplos no limitantes de la segunda proteína incluyen una enzima. En realizaciones opcionales, la enzima es superóxido dismutasa, tal como aquella que tiene al menos aproximadamente 60% de identidad de aminoácidos con la secuencia de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, y proteínas de la Tabla 21 como ejemplos no limitantes. En algunas realizaciones, la superóxido dismutasa tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 98%, o superior, identidad de aminoácidos con la secuencia de SEQ ID NO: 12 o 13 o una proteína de la Tabla 21. En otras realizaciones, la enzima es una fitasa (tal como el número de acceso de GenBank CAB91845 y las Patentes de los Estados Unidos 6,855,365 y 6,110,719). Otros ejemplos de segundas proteínas incluyen proteínas estructurales de la piel de mamíferos como colágeno y elastina. Se pueden usar ensayos tales como inmunoprecipitación Western y ELISA para confirmar la presencia de la segunda proteína en la biomasa y cuando está unida a un polisacárido purificado. Los polisacáridos con proteínas de fusión unidas se pueden purificar como en el Ejemplo 2. Los ensayos de actividad para proteínas tales como fitasas y superóxido dismutasa son bien conocidos en la técnica. Una ventaja de una fusión es que la bioactividad del polisacárido y la bioactividad de la proteína se puede combinar en un producto sin aumentar el coste de fabricación con respecto a solo purificar el polisacárido. Como un ejemplo no limitante, las potentes propiedades antioxidantes de un *Porphyridium* polisacárido se puede combinar con las potentes propiedades antioxidantes de la superóxido dismutasa en una fusión, sin embargo, la combinación de polisacárido:superóxido dismutasa se puede aislar a un alto nivel de pureza usando filtración de flujo tangencial. En otro ejemplo no limitante, las potentes propiedades antivirales de un *Porphyridium* se puede añadir polisacárido a la potente actividad neutralizante de anticuerpos recombinantes fusionados a la proteína (SEQ ID NO: 15) que se asocia estrechamente con el polisacárido.

Los transportadores de carbohidratos preferidos para la expresión en *Porphyridium* son las SEQ ID NOs: 33-35 y 38-40.

En otras realizaciones, el método incluye métodos de expresión genética que comprenden el uso de un vector de expresión. En un método, una célula de microalga, tal como una célula de *Porphyridium*, se transforma con un vector de expresión dual bajo condiciones en las que ocurre la expresión génica mediada por el vector. El vector de expresión puede comprender un casete de resistencia que comprende un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a un antibiótico tal como zeocina, unido operativamente a un promotor activo en microalgas. El vector también puede comprender un segundo casete de expresión que comprende una segunda proteína a un promotor activo en microalgas. Los dos casetes están físicamente vinculados en el vector. Las células transformadas pueden ser opcionalmente seleccionadas con base en la capacidad de crecer en presencia del antibiótico u otro marcador seleccionable en condiciones en las que las células que carecen del casete de resistencia no crecerían, tal como en la oscuridad. El casete de resistencia, así como el casete de expresión, pueden tomarse en su totalidad o en parte de otra molécula de vector.

En un ejemplo no limitante, un método para expresar un gen exógeno en una célula del género *Porphyridium* está provisto. El método puede comprender unir operativamente un gen que codifica una proteína que confiere resistencia al antibiótico zeocina a un promotor activo en microalgas para formar un casete de resistencia; unir operativamente un gen que codifica una segunda proteína a un promotor activo en microalgas para formar un segundo casete de expresión, en donde el casete de resistencia y el segundo casete de expresión están conectados físicamente para formar un vector de expresión dual; transformar la célula con el vector de expresión doble; y seleccionar la capacidad de sobrevivir en presencia de al menos 2,5 ug/ml de zeocina, preferiblemente al menos 3,0 ug/ml de zeocina, y más preferiblemente al menos 3,5 ug/ml de zeocina, más preferiblemente al menos 5,0 ug/ml de zeocina.

En aspectos adicionales, se incluye y describe la expresión de una proteína que produce moléculas pequeñas en microalgas. Algunos genes que pueden expresarse usando los métodos proporcionados en este documento codifican enzimas que producen moléculas pequeñas nutracéuticas tales como luteína, zeaxantina y DHA. Preferiblemente, los genes que codifican las proteínas son sintéticos y se crean usando codones preferidos sobre las microalgas en las que se va a expresar el gen. Por ejemplo, la enzima capaz de convertir EPA en DHA se clona en las microalgas *Porphyridium sp.* al recodificar genes para adaptarlos a codones preferidos de *Porphyridium sp.* Para ejemplos de tales enzimas véase Nat Biotechnol. 2005 Aug; 23 (8): 1013-7. Para ejemplos de enzimas en la ruta de los carotenoides, véanse SEQ ID NOs: 18 y 19 y la Tabla 22. La ventaja de expresar dichos genes es que el valor nutracéutico de las células aumenta sin aumentar el coste de fabricación de las células.

Para la comparación de secuencias para determinar el porcentaje de identidad de nucleótidos o aminoácidos, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia luego calcula el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados.

La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede realizar, *por ejemplo*, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Mates. 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase en general Ausubel. *et al.*, *supra*). Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y otros, J. Mol. Biol. 215: 403 - 410 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias con altos puntajes (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valores positivos T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabras del vecindario (Altschul) *et al.*, *supra*). Estas coincidencias de palabra de vecindad iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Las coincidencias de palabra se amplían en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Los puntajes acumulados se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos coincidentes, siempre > 0) y N (puntaje de penalización para residuos que no coinciden, siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabra en cada dirección se detiene cuando: el puntaje de alineamiento acumulativo cae por la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; el puntaje acumulado va a cero o inferior, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Para identificar si un ácido nucleico o polipéptido es apropiado, son adecuados los parámetros por defecto de los programas BLAST. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como predeterminada una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores por defecto una

longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62. El programa TBLASTN (que usa secuencia de proteínas para la secuencia de nucleótidos) utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y una matriz de puntuación BLOSUM 62. (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. Karlin y Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0.001.

Ejemplos

Ejemplo 1

Crecimiento de *Porphyridium cruentum* y *Porphyridium* sp.

Se inocularon *Porphyridium* sp. (cepa UTEX 637) y *Porphyridium cruentum* (cepa UTEX 161) en matraces Erlenmeyer de 2 litros tratados en autoclave que contenían un medio de agua de mar artificial:

1495 Receta de medio ASW de la American Type Culture Collection (los componentes son por 1 litro de medio)

NaCl	27.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	6.6 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	5.6 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.5 g
KNO ₃	1.0 g
KH ₂ correos ₄	0.07 g
NaHCO ₃	0.04g
regulador Tris-HCl 1.0 M, pH 7.6	20.0 ml
Solución de metales traza (véase a continuación)	1.0 ml
Solución de hierro quelado (véase a continuación)	1.0 ml
Agua destilada	llevar a 1.0 L

Solución de metales traza:

ZnCl ₂	4.0mg
H ₃ BO ₃	60.0mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.5mg
CuCl ₂ · 2H ₂ O	4.0 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	40.0 mg
(NH ₄) ₆ Mes ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	37.0 mg
Agua destilada	100.0 ml

Solución de hierro quelado:

FeCl ₃ · 4H ₂ O	240.0 mg
0.05 M EDTA, pH7.6	100.0 ml

Los medios se esterilizaron en autoclave durante al menos 15 minutos a 121 °C.

Los cultivos inoculados en matraces de 2 litros se mantuvieron a temperatura ambiente en placas de agitación. Se colocaron barras de agitación en los matraces antes de esterilizar en autoclave. Se burbujeó una mezcla de 5% de CO₂ y aire en los matraces. El gas se esterilizó por filtración antes de la entrada. Los matraces tenían iluminación de 24 horas desde arriba por luces fluorescentes estándar (aproximadamente 150 uE/m²/s⁻¹). Las células se cultivaron durante aproximadamente 12 días, en cuyo punto los cultivos contenían aproximadamente 4 X 10⁶ células/mL.

Ejemplo 2

Cultivos densos de *Porphyridium sp.* y *Porphyridium cruentum* fueron centrifugados a 4000 rcf. El sobrenadante se sometió a filtración de flujo tangencial en un dispositivo Millipore Pellicon 2 a través de una membrana de celulosa regenerada de 1000 kD (número de catálogo de filtro P2C01MC01). Aproximadamente 4.1 litros de sobrenadantes *Porphyridium cruentum* y 15 litros de *Porphyridium sp.* se concentraron hasta un volumen de aproximadamente 200 ml en experimentos separados. Las soluciones de exopolisacáridos concentrados se diafiltraron a continuación con 10 litros de Tris 1 mM (pH 7,5). El retenido se lavó a continuación con Tris 1 mM (pH 7,5) y el polisacárido recuperado total se liofilizó hasta su finalización. Los cálculos de rendimiento se realizaron mediante el ensayo de azul de dimetilmetileno (DMMB). El polisacárido liofilizado se resuspendió en agua desionizada y la proteína se midió mediante el método del ácido bicinonínico (BCA). El producto seco total medido después de la liofilización fue de 3,28 g para *Porphyridium sp.* y 2.0 g para *Porphyridium cruentum*. La proteína total calculada como un porcentaje del producto seco total fue del 12.6% para *Porphyridium sp.* y 15.0% para *Porphyridium cruentum*.

Ejemplo 3

Aumento del polisacárido disponible en solvente

Una masa medida (aproximadamente 125 gramos) de células recién recolectadas de *Porphyridium sp.*, resuspendidas en una cantidad mínima de dH₂O suficiente para permitir que las células fluyan como un líquido, se colocó en un contenedor. Las células se sometieron a cantidades crecientes de sonicación a lo largo del tiempo a un nivel de sonicación predeterminado. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo predeterminados, suspendidas en un volumen medido de dH₂O y se diluyó apropiadamente para permitir la observación visual bajo un microscopio y la medición de la concentración de polisacáridos de la suspensión celular usando el ensayo DMMB. Se hizo un gráfico de la cantidad total de tiempo para el que la biomasa se sometió a sonicación y la concentración de polisacáridos de la suspensión de biomasa. Se realizaron dos experimentos con diferentes intervalos de tiempo y el tiempo total en que la muestra se sometió a sonicación. El primer conjunto de datos del experimento de sonicación 1 se obtuvo sometiendo la muestra a sonicación durante un período de tiempo total de 60 minutos en incrementos de 5 minutos. El segundo conjunto de datos del experimento de sonicación 2 se obtuvo sometiendo la muestra a sonicación durante un período de tiempo total de 6 minutos en incrementos de 1 minuto. Los datos, observaciones y detalles experimentales se describen a continuación. Se generaron curvas estándar usando exopolisacárido de *Porphyridium sp.* purificado en TFF, liofilizado, pesado y resuspendido.

Parámetros generales de los experimentos de sonicación 1 y 2

Las células se recogieron y se midió el volumen del cultivo. La biomasa se separó de la solución de cultivo por centrifugación. La centrifuga utilizada fue una centrifuga refrigerada Forma Scientific Centra-GP8R. Los parámetros utilizados para la centrifugación fueron 4200 rpm, 8 minutos, rotor # 218. Después de la centrifugación, la biomasa se lavó con dH₂O. Se descartó el sobrenadante de los lavados y se recogió la biomasa de células en pellas para el experimento.

Se recolectó una muestra de 100µL de la suspensión de biomasa en el punto de tiempo 0 (OTP) y se suspendió en 900µL de dH₂O. La suspensión se diluyó adicionalmente diez veces y se usó para observación visual y ensayo DMMB. La muestra del punto de tiempo 0 representa la concentración de polisacárido disponible en el disolvente en la suspensión celular antes de que las células se sometieran a sonicación. Este fue el valor de referencia de polisacáridos para los experimentos.

Se establecieron los siguientes parámetros de sonicación: nivel de potencia = 8, 20 segundos ON/20 segundos OFF (Sonicador Misonix 3000 con punta de sonda plana). El contenedor con la biomasa se colocó en un baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento y se repuso el hielo según fue necesario. La muestra se preparó de la siguiente manera para la observación visual y el ensayo DMMB: 100 µL de la muestra de biomasa + 900 µL dH₂O se marcó como dilución 1. 100 µL de (i) dilución 1 + 900µL dH₂O para observación celular y ensayo con DMMB.

Experimento de Sonicación 1

En el primer experimento, la muestra se sometió a sonicación durante un período de tiempo total de 60 minutos, en incrementos de 5 minutos (20 segundos ENCENDIDA/20 segundos APAGADA). Los datos se presentan en las Tablas 4, 5 y 6. Los gráficos de los resultados de la absorbancia se presentan en la Figura 4.

TABLA 4: REGISTRO DE SONICACIÓN - EXPERIMENTO 1

Ser #	Punto de tiempo (min)	Observaciones
1	0	Células de color rojo sanos
2	5	El color rojo desapareció, pequeñas partículas circulares verdosas
3	10	Partícula pequeña, más pequeña que TP a 5 minutos
4	15	Partícula pequeña, más pequeña que TP a 10 minutos. La misma observación que a 10 minutos
5	20	Similar a TP a 15 minutos. Partículas pequeñas; cáscaras circulares vacías en el campo de visión
6	25	Similar a TP a 20 minutos
7	30	Similar a TP a 25 minutos, partículas menos numerosas
8	35	Similar a TP a 30 minutos
9	40	Similar a TP a 35 minutos
10	45	Similar a TP a 40 minutos
11	50	Muy pocas cáscaras, en su mayoría partículas finas
12	55	Similar a TP a 50 minutos.
13	60	Partículas finas, casi ninguna concha
TP = punto de tiempo.		

TABLA 5: REGISTRO DE CURVA ESTÁNDAR - - EXPERIMENTO DE SONICACIÓN 1

Absorbancia (AU)	Concentración (µg)
0	Blanco, 0
0.02	0.25
0.03	0.5
0.05	0.75
0.07	1.0
0.09	1.25

5

Tabla 6: Registro de Absorbancia de Muestra versus Puntos de Tiempo - Experimento de Sonicación 1

PUNTO DE TIEMPO DE MUESTRA (MIN)	Solvente-Polisacárido disponible (µg)
0	0.23
5	1.95
10	2.16
15	2.03
20	1.86
25	1.97
30	1.87
35	2.35
40	1.47
45	2.12

PUNTO DE TIEMPO DE MUESTRA (MIN)	Solvente-Polisacárido disponible (µg)
50	1.84
55	2.1
60	2.09

La gráfica de la concentración de polisacáridos frente a los puntos de tiempo de sonicación se muestra arriba y en la Figura 4. La concentración de polisacáridos disponible en disolvente de la suspensión de biomasa (células) alcanza un valor máximo después de 5 minutos de sonicación. La sonicación adicional en incrementos de 5 minutos no dio como resultado una mayor concentración de polisacáridos disponibles en el disolvente.

La homogeneización por sonicación de la biomasa dio como resultado un aumento de aproximadamente 10 veces en la concentración de polisacárido disponible en el disolvente de la suspensión de biomasa, lo que indica que la homogeneización mejora significativamente la cantidad de polisacárido disponible para el disolvente. Estos resultados demuestran que las composiciones físicamente alteradas de *Porphyridium* para administración oral u otra administración, proporcionan niveles nuevos e inesperados de biodisponibilidad de polisacáridos en comparación con composiciones de células intactas. La observación visual de las muestras también indica la ruptura de la pared celular y, por lo tanto, la liberación de polisacáridos insolubles unidos a la pared celular de las células a la solución, lo que se mide como la concentración aumentada de polisacáridos en la suspensión de biomasa.

Experimento de Sonicación 2

En el segundo experimento, la muestra se sometió a sonicación durante un período de tiempo total de 6 minutos en incrementos de 1 minuto. Los datos se presentan en las Tablas 7, 8 y 9. Los gráficos de los resultados de la absorbancia se presentan en la Figura 5.

TABLA 7: EXPERIMENTO DE SONICACIÓN 2

Ser #	Punto de tiempo (min)	Observaciones
1	0	Las células sanas de color marrón rojizo aparecen circulares
2	1	Partículas circulares dispersas en el campo de visión con pocas células sanas. El color rojo ha desaparecido en su mayoría de los cuerpos celulares.
3	2	Observación similar al punto de tiempo de 2 minutos.
4	3	Muy pocas células sanas presentes. El color rojo ha desaparecido y la concentración de partículas de tamaño más cercano a las células completas ha disminuido drásticamente.
5	4	Las células enteras están completamente ausentes. Las partículas son más pequeñas y menos numerosas.
6	5	Observación similar al punto de tiempo de 5 minutos.
7	6	Las células enteras están completamente ausentes. Las partículas grandes están completamente ausentes.

TABLA 8: REGISTRO DE CURVA ESTÁNDAR - EXPERIMENTO DE SONICACIÓN 2

Absorbancia (AU)	Concentración (µg)
- 0.001	Blanco, 0
0.017	0.25
0.031	0.5
0.049	0.75
0.0645	1.0
0.079	1.25

Tabla 9: Registro de Absorbancia de Muestra versus Puntos de Tiempo - Experimento de Sonicación 2

PUNTO DE TIEMPO DE MUESTRA (MIN)	Polisacárido disponible en disolvente (µg)
0	0.063
1	0.6
2	1.04
3	1.41
4	1.59
5	1.74
6	1.78

El valor del polisacárido disponible en disolvente aumenta gradualmente hasta el punto de tiempo de 5 minutos, como se muestra en la Tabla 9 y la Figura 5.

Ejemplo 4

Precipitación con alcohol

Un cultivo de *Porphyridium sp.* se centrifugó a 4000 rcf y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se dividió en seis alícuotas de 30 ml. Tres alícuotas se trataron en autoclave durante 15 min a 121 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se mezcló una alícuota con metanol (58,3% vol/vol), una se mezcló con etanol (47,5% vol/vol) y una se mezcló con isopropanol (50% vol/vol). Se añadieron las mismas concentraciones de estos alcoholes a las tres alícuotas de sobrenadante que no se trataron en autoclave. Los precipitados de polisacáridos de las seis muestras se recogieron inmediatamente por centrifugación a 4000 rcf a 20 °C durante 10 min y los gránulos se lavaron en sus respectivos alcoholes al 20%. Los sedimentos se secaron luego por liofilización y se resuspendieron en 15 ml de agua desionizada mediante la colocación en un baño de agua a 60 °C. Las pellas de polisacáridos de muestras no tratadas en autoclave fueron parcialmente solubles o insolubles. Las pellas de polisacáridos de la precipitación con etanol y metanol en autoclave fueron parcialmente solubles. Las pellas de polisacárido obtenidas de la precipitación con isopropanol del sobrenadante tratado en autoclave fue completamente soluble en agua.

Ejemplo 5

Análisis de monosacáridos

Aproximadamente 10 miligramos de polisacárido purificado de *Porphyridium sp.* y *Porphyridium cruentum* (descrito en el Ejemplo 3) se sometieron a análisis de monosacáridos.

El análisis de monosacáridos se realizó por cromatografía de gases/espectrometría de masas combinada (GC/MS) de los derivados per-O-trimetilsililo (TMS) de los monosacáridos metilglicósidos producidos a partir de la muestra por metanólisis ácida.

Los metilglicósidos se prepararon a partir de 500 µg de la muestra seca proporcionada por el cliente mediante metanólisis en HCl 1 M en metanol a 80 °C (18-22 horas), seguido de re-N-acetilación con piridina y anhídrido acético en metanol (para la detección de aminoazúcares). Las muestras se sometieron después a O-trimetilsililación por tratamiento con Tri-Sil (Pierce) a 80 °C (30 min). Estos procedimientos se llevaron a cabo como se describió anteriormente, en Merkle y Poppe (1994) *Methods Enzymol.* 230: 1-15; York, et al. (1985) *Methods Enzymol.* 118: 3-40. El análisis por GC/MS de los metil-glicósidos TMS se realizó en un HP 5890 GC interconectado a un 5970 MSD, usando una columna capilar de sílice fundida Supelco DB-1 (30m, 0.25 mm ID). Las composiciones de monosacáridos se determinaron de la siguiente manera:

Tabla 10: Análisis de monosacáridos de *Porphyridium sp.*

Residuo glicosilo	Masa (µg)	% mol
Arabinosa (Ara)	N.d.	N.d.
Rhamnosa (Rha)	2.7	1.6
Fucosa (Fuc)	N.d.	N.d.

Residuo glicosilo	Masa (µg)	% mol
Xilosa (Xyl)	70.2	44.2
Ácido Glucurónico (GlcA)	N.d.	N.d.
Ácido Galacturónico (GalA)	N.d.	N.d.
Manosa (Man)	3.5	1.8
Galactosa (Gal)	65.4	34.2
Glucosa (Glc)	34.7	18.2
N-acetil galactosamina (GalNAc)	N.d.	N.d.
N-acetil glucosamina (GlcNAc)	trazas	trazas
	Σ=176.5	

Tabla 11: Análisis de monosacáridos de *Porphyridium cruentum*

Residuo glicosílico	Masa (µg)	% mol
Arabinosa (Ara)	N.d.	N.d.
Rhamnosa (Rha)	N.d.	N.d.
Fucosa (Fuc)	N.d.	N.d.
Xilosa (Xyl)	148.8	53.2
Ácido Glucurónico (GlcA)	14.8	4.1
Manosa (Man)	N.d.	N.d.
Galactosa (Gal)	88.3	26.3
Glucosa (Glc)	55.0	16.4
N-acetil glucosamina (GlcNAc)	trazas	trazas
Ácido N-acetil neuramínico (NANA)	N.d.	N.d.
	Σ= 292.1	
Los valores de% de moles se expresan como porcentaje en moles de carbohidratos totales en la muestra. N.d. = no detectado.		

5 Ejemplo 6

Medición de proteína

10 Se cultivó *Porphyridium sp.* fue cultivado como se describe. 2 litros de sobrenadante del cultivo centrifugado de *Porphyridium sp.* se sometieron a autoclave a 121 °C durante 20 minutos y luego se trataron con isopropanol al 50% para precipitar los polisacáridos. Antes de esterilizar en autoclave, los 2 litros de sobrenadante contenían 90,38 mg de polisacárido. El sedimento se lavó con isopropanol al 20% y se secó mediante liofilización. El material seco se resuspendió en agua desionizada. La solución de polisacárido resuspendida se dializó completamente contra agua desionizada en una membrana de diálisis de éster de celulosa Spectra/Por (25,000 MWCO). El 4,24% del contenido

15 sólido en la solución fueron proteínas medidas por el ensayo BCA.

Ejemplo 7

Generación de polisacáridos libres de proteínas

20 Se cultivó *Porphyridium sp.* como se describe. 1 litro de sobrenadante del cultivo centrifugado de *Porphyridium sp.* se trató en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y luego se trató con 10% de proteasa (número de catálogo Sigma P-5147; cantidad de tratamiento de proteasa relativa al contenido de proteína del sobrenadante según lo determinado por ensayo BCA). La reacción de proteasa continuó durante 4 días a 37 °C. La solución se sometió

25 luego a filtración de flujo tangencial en un sistema de casete Millipore Pellicon® usando una membrana de celulosa

regenerada de 0,1 micrómetros. El producto retenido se diafiltró completamente con agua desionizada. No se detectó proteína en el retenido diafiltrado por el ensayo BCA. Véase la Figura 6.

Opcionalmente, el retenido se puede esterilizar en autoclave para lograr la esterilidad si el sistema de filtración no es estéril. Opcionalmente, el retenido estéril puede mezclarse con vehículos farmacéuticamente aceptables y llenarse en viales para inyección.

Opcionalmente, el polisacárido libre de proteína puede fragmentarse, por ejemplo, por sonicación para reducir la viscosidad para inyección parenteral como, por ejemplo, un compuesto antiviral. Preferiblemente, el polisacárido estéril no se fragmenta cuando se prepara para inyección como un lubricante para articulaciones.

Ejemplo 8

Crecimiento heterotrófico de *Porphyridium*

Se cultivaron cultivos de *Porphyridium sp.* (UTEX 637) y *Porphyridium cruentum* (cepa UTEX 161), a una densidad de 4×10^6 células/ml, como se describe en el Ejemplo 1. Para cada cepa, aproximadamente 2×10^6 células/mL de células por pozo (~500 uL) se transfirieron a 11 pozos de una placa de microtitulación de 24 pozos. Estos pozos contenían medios ATCC 1495 complementados con concentraciones variables de glicerol de la siguiente manera: 0%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1%, 2%, 3%, 5%, 7% y 10%. Las placas de microtitulación duplicadas se agitaron (a) bajo iluminación continua de aproximadamente 2400 lux, según se midió mediante un medidor de luz trazable VWR (cat # 21800-014), y (b) en ausencia de luz. Después de 5 días, el efecto del aumento de las concentraciones de glicerol en la tasa de crecimiento de estas dos especies de *Porphyridium* en la luz se controló usando un hemocitómetro. Los resultados se dan en la Figura 2 e indican que, a la luz, el 0,25 a 0,75 por ciento de glicerol soporta la tasa de crecimiento más alta, con una concentración óptima aparente de 0,5%.

Se observaron las células en la oscuridad después de aproximadamente 3 semanas de crecimiento. Los resultados se dan en la Figura 3 e indican que, en completa oscuridad, el 5,0 al 7,0% de glicerol soporta la mayor tasa de crecimiento, con una concentración óptima aparente del 7,0%.

Ejemplo 9

Composiciones Cosmecéuticas

El *Porphyridium sp.* (UTEX 637) creció a una densidad de aproximadamente 4×10^6 células/ml, como se describe en el Ejemplo 1. Aproximadamente 50 gramos de células lavadas en gránulos y húmedas se homogeneizaron completamente usando aproximadamente 20 minutos de sonicación como se describe. La biomasa homogeneizada se mezcló con vehículos que incluyen, agua, butilenglicol, aceite mineral, vaselina, glicerina, alcohol cetílico, dicaprilato de propilenglicol/dicaprato, estearato de PEG-40, isoparafina C11-13, estearato de glicerilo, tri (PPG-3) éter de miristilo citrato, cera emulsionante, dimeticona, DMDM hidantoína, metilparabeno, carbómero 940, etilparabeno, propilparabeno, dióxido de titanio, EDTA disodio, hidróxido de sodio, butilparabeno y goma de xantano. La mezcla luego se homogeneizó para formar una composición adecuada para administración tópica. La composición se aplicó a la piel humana diariamente durante un período de una semana.

Ejemplo 10

Sensibilidad a los antibióticos

Aproximadamente 4500 células (300ul de 1.5×10^5 células por ml) de cultivos de *Porphyridium sp.* y *Porphyridium cruentum* en medios ATW 1495 ASW líquidos se sembraron en placas de agar ATCC 1495 ASW (agar al 1,5%). Las placas contenían cantidades variables de zeocina, sulfometuron, higromicina y espectinomicina. Las placas se pusieron bajo luz fluorescente artificial constante de aproximadamente 480 lux. Después de 14 días, se verificó el crecimiento de las placas. Los resultados fueron los siguientes:

Zeocina

Conc. (Ug/ml)	Crecimiento
0.0	++++
2.5	+
5.0	-
7.0	-

Higromicina

Conc. (Ug/ml)	Crecimiento
0.0	++++
5.0	++++
10.0	++++
50.0	++++

Especinomicina

Conc. (Ug/ml)	Crecimiento
0.0	++++
100.0	++++
250.0	++++
750.0	++++

5 Después de obtener los resultados iniciales anteriores, se realizó una titulación de zeocina para determinar con mayor precisión los niveles de crecimiento de *Porphyridium* en presencia de zeocina. Las células de *Porphyridium* sp. se sembraron como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 8.

10 Ejemplo 11

Manipulación nutricional para generar nuevos polisacáridos

15 Las células que expresan un transportador monosacárido endógeno, que contiene un transportador de monosacáridos y es capaz de importar glucosa, se cultivan en medio ATCC 1495 a la luz en presencia de glucosa al 1,0% durante aproximadamente 12 días. El exopolisacárido se purifica como se describe en el Ejemplo 2. El análisis de monosacáridos se realiza como se describe en el Ejemplo 5.

20 Las células que expresan un transportador de monosacáridos endógeno, que contienen un transportador de monosacáridos y son capaces de importar xilosa, se cultivan en medio ATCC 1495 a la luz en presencia de xilosa al 1,0% durante aproximadamente 12 días. El exopolisacárido se purifica como se describe en el Ejemplo 2. El análisis de monosacáridos se realiza como se describe en el Ejemplo 5.

25 Las células que expresan un transportador de monosacáridos endógeno, que contienen un transportador de monosacáridos y son capaces de importar galactosa, se cultivan en medio ATCC 1495 a la luz en presencia de galactosa al 1,0% durante aproximadamente 12 días. El exopolisacárido se purifica como se describe en el Ejemplo 2. El análisis de monosacáridos se realiza como se describe en el Ejemplo 5.

30 Las células que expresan un transportador de monosacáridos endógeno, que contienen un transportador de monosacáridos y son capaces de importar ácido glucurónico, se cultivan en medio ATCC 1495 a la luz en presencia de ácido glucurónico al 1,0% durante aproximadamente 12 días. El exopolisacárido se purifica como se describe en el Ejemplo 2. El análisis de monosacáridos se realiza como se describe en el Ejemplo 5.

35 Las células que expresan un transportador de monosacáridos endógeno, que contienen un transportador de monosacáridos y son capaces de importar glucosa, se cultivan en medios ATCC 1495 en la oscuridad en presencia de glucosa al 1,0% durante aproximadamente 12 días. El exopolisacárido se purifica como se describe en el Ejemplo 2. El análisis de monosacáridos se realiza como se describe en el Ejemplo 5.

40 Las células que expresan un transportador de monosacáridos endógeno, que contienen un transportador de monosacáridos y son capaces de importar xilosa, se cultivan en medios ATCC 1495 en la oscuridad en presencia de xilosa al 1,0% durante aproximadamente 12 días. El exopolisacárido se purifica como se describe en el Ejemplo 2. El análisis de monosacáridos se realiza como se describe en el Ejemplo 5.

45 Las células que expresan un transportador monosacárido endógeno, que contiene un transportador de monosacáridos y es capaz de importar galactosa, se cultivan en medios ATCC 1495 en la oscuridad en presencia de galactosa al 1,0% durante aproximadamente 12 días. El exopolisacárido se purifica como se describe en el Ejemplo 2. El análisis de monosacáridos se realiza como se describe en el Ejemplo 5.

Las células que expresan un transportador de monosacáridos endógeno, que contienen un transportador de monosacáridos y son capaces de importar ácido glucurónico, se cultivan en medios ATCC 1495 en la oscuridad en presencia de ácido glucurónico al 1,0% durante aproximadamente 12 días. El exopolisacárido se purifica como se describe en el Ejemplo 2. El análisis de monosacáridos se realiza como se describe en el Ejemplo 5.

Ejemplo 12

Aumento del polisacárido disponible en solvente

Se molieron 128 mg de liofilizado intacto de las células de *Porphyridium sp.* con un mortero/mano de mortero. La muestra colocada en el mortero se molió durante 5 minutos. Se colocaron 9,0 mg de la muestra de células trituradas en un tubo de microcentrífuga y se suspendieron en 1000 µL de dH₂O. La muestra se agitó en vórtex para suspender las células. 3.

Una segunda muestra de 9.0 mg de liofilizado intacto de las células de *Porphyridium sp.* se colocó en un tubo de microcentrífuga y se suspendió en 1000µL de dH₂O. La muestra se agitó en vórtex para suspender las células.

Las suspensiones de ambas células se diluyeron 1:10 y la concentración de polisacáridos de las muestras diluidas se midió mediante ensayo DMMB. Tras la trituración, la suspensión de células trituradas dio como resultado un aumento de aproximadamente 10 veces en el polisacárido accesible al disolvente según se midió mediante el ensayo DMMB sobre la misma cantidad de células intactas.

Tabla 12

Descripción de la muestra	Leer 1 (AU)	Leer 2 (AU)	Promedio Abs (AU)	Conc. (µg/mL)
Blanco	0	-0.004	-0.002	0
50ng/µL Std., 10 µL; 0.5µg	0.03	0.028	0.029	N/A
100ng/µL Std., 10 µL; 1.0µg	0.056	0.055	0.0555	N/A
Suspensión de células enteras	0.009	0.004	0.0065	0.0102
Suspensión de tierra	0.091	0.072	0.0815	0.128

La reducción en el tamaño de partícula de la biomasa liofilizada por homogeneización en un mortero/mano de mortero da como resultado una mejor suspensión y aumento en la concentración de polisacáridos de la suspensión celular disponible en el disolvente.

Ejemplo 13

Decoloración de la biomasa

Un cultivo de *Porphyridium* (UTEX 637) se cultivó como se describe en el Ejemplo 1, excepto que el medio de cultivo no contenía Tris y 0,125 g/l de nitrato de potasio, pH 7,6. El cultivo bajo en nitrato se cultivó en aproximadamente 130 µE m⁻² s⁻¹ hasta que el color cambió de rojo a amarillo-marrón, lo que tomó aproximadamente 3 semanas. Después de esperar otros tres días, las células de color amarillo amarronado se recogieron mediante centrifugación, en lo sucesivo denominada "biomasa decolorada" o "sedimento celular decolorado". También se generó un sedimento de células de color rojo profundo generado a partir de células cultivadas en medio ASW ATCC 1495 normal como se describe en el Ejemplo 1. Los sedimentos celulares se lavaron con 0,5 l de agua destilada, se congelaron en un baño de acetona en hielo seco y se liofilizaron.

Determinación del color

El sedimento celular decolorado tenía un aspecto de color marrón amarillento (a diferencia de las células cultivadas en medios ATW ATCC 1495 ASW que tienen una apariencia de color rojo intenso). Las células decoloradas liofilizadas y las células de color rojo liofilizadas cultivadas en medio ASW AT95 1495 completo se trataron de manera idéntica. Se resuspendieron 100 mg de pellas celulares liofilizadas en 4 ml de regulador Tris 1M pH 7,6 por vórtex vigoroso. Las suspensiones se sometieron a ultrasonido en hielo usando un sonicador Misonix 3000 equipado con un conjunto de sonda de micropunta a un nivel de potencia de 6,5 durante 90 segundos, pulsando durante 30 segundos con 20 segundos de inactividad (3 ciclos). Los residuos celulares se sedimentaron por centrifugación en una microcentrífuga a 14000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se decantó. Este procedimiento se repitió dos veces más con regulador Tris 1M pH 7,6 y finalmente con urea 6M. No se observó color rojo en los sedimentos celulares o el sobrenadante de la biomasa decolorada después de la segunda extracción o de las células cultivadas en medio ASW completo ATCC 1495 después de la cuarta extracción. Los sobrenadantes respectivos se combinaron y se llevaron a un volumen final de 75 ml con agua destilada.

Los espectros de absorbancia de los sobrenadantes del sedimento decolorado y el sedimento de células cultivadas en medio ASW AT95 1495 completo se registraron entre 510 y 600 nm con un espectrofotómetro Pharmacia Ultraspec III y una cubeta de longitud de trayectoria de 1 cm.

- 5 El coeficiente de extinción para la ficoeritrina es de 5,26 ml.mg/cm a 545 nm (véase, por ejemplo, Gantt y Lipschultz, Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*; Biochemistry, 13, 2960, 1974) La concentración de ficoeritrina se calculó a partir de la densidad óptica a 545 nm (después de restar el fondo debido a la dispersión medida a 600 nm) como 46 mg/g de peso seco en células cultivadas en ATCC 1495 ASW y 4,7 mg/g en las células decoloradas.

10 Ejemplo 14

Homogeneización de la biomasa

- 15 Después de que la biomasa de *Porphyridium* cultivada como se describe en el Ejemplo 1 se recuperó por centrifugación y se lavó en agua desionizada, se burbujeó nitrógeno a través de la pasta durante 30 minutos para desplazar el oxígeno disuelto y minimizar la posterior oxidación. A continuación, la pasta se pasó a través de un microfilm Microfluidics® modelo 110Y a 22,000 PSI con enfriamiento, y el proceso se repitió hasta que la rotura de la celda fue de al menos 50% como se determinó por examen microscópico. El nitrógeno se burbujeó una vez más a través de la pasta, que luego se liofilizó después de la congelación de la cubierta en etanolcone hielo seco. La masa celular seca se trituró a un polvo fino con un homogeneizador de cocina Braun®. Este proceso puede realizarse con biomasa decolorada generada como se describe en el presente documento. Opcionalmente, se añaden los conservante y/o vehículos adecuados para administración tópica al material, así como fragancias y otros materiales usados en la técnica de formulación de productos para el cuidado de la piel.

25 Ejemplo 15

Inhibición de Hialuronidasa

- 30 El ácido hialurónico biotilado (bHA) se unió covalentemente a los pozos de una placa de 96 pozos. Las muestras que contienen hialuronidasa y diversos materiales de ensayo se añadieron luego a los pozos. La hialuronidasa degrada el ácido hialurónico unido, dando como resultado una disminución en la cantidad de biotina unida covalentemente a la placa de pozos. Al final del período de incubación, la reacción se detuvo y la placa de pozos se lavó para eliminar la hialuronidasa. El bHA restante se detectó usando una enzima peroxidasa unida a avidina. Cuando se agrega un sustrato apropiado, la enzima peroxidasa genera una señal de color en proporción a la cantidad de bHA. La señal de color se midió espectrofotométricamente, y fue inversamente proporcional a la cantidad de actividad de hialuronidasa en la muestra. Por lo tanto, los materiales que inhibieron la hialuronidasa dieron como resultado una señal de color mayor, ya que más de la bHA permaneció intacta. Véase también Frost, G., I, Stern, R. A Microtiter-Based Assay for Hyaluronidase Activity Not Requiring Specialized Reagents. Analytical Biochemistry. Analytical Biochemistry 251, 263-269: 1997.

40 Preparación de extractos de material de prueba

- 45 El material de prueba A se suministró como material de tipo polvo. Para este estudio, se combinaron 100 mg de este material con 5 ml de etanol o 5 ml de agua ultrapura en tubos de centrifuga de 15 ml. Después de la combinación, las mezclas se agitaron en vórtex, luego se colocaron en una plataforma oscilante durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se centrifugaron a 1.000 RPM durante 5 minutos. Los sobrenadantes se usaron en las concentraciones finales enumeradas en la sección de resultados. El material de prueba B se suministró en forma de soluciones espesas y viscosas (3%).

50 Ensayo de anti-hialuronidasa: inmovilización de bHA en placas de 96 pozos

- Se preparó una solución de sulfo-NHS (0,184 mg/ml) y bHA (0,2 mg/ml) en agua destilada. A continuación, se añadieron 50 µl de esta solución a los pozos de una placa Covalink-NH de 96 pozos. Luego se preparó una solución de EDC (0.123 mg/ml) en agua destilada y se agregaron 50 µl de esta solución a cada pozo (lo que dio como resultado una concentración final de 10 µg/pozo de bHA y 6,15 µg/pozo de EDC). La placa de pozos se incubó durante la noche a 4 ± 2 °C o durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, la placa se lavó tres veces con PBS que contenía NaCl 2 M y MgSO₄ 50 mM.

60 Ensayo anti-hialuronidasa

- Antes del ensayo, la placa de pozos se equilibró con regulador de ensayo (formiato 0,1 M [pH 4,5], NaCl 0,1 M, Triton X-100 al 1%, sacarolactona 5 mM). Los materiales de prueba se prepararon en regulador de ensayo a 2 veces su concentración final (se usó heparina como control positivo, concentración final de 1 mg/ml). Después de eliminar el regulador de ensayo de la placa de pozo utilizada para equilibrar, se añadieron 50 µl de cada uno de los materiales de ensayo preparados a tres pozos en la placa de pozos, seguido de la adición de 50 µl de regulador de ensayo que contiene hialuronidasa que se añadirán a cada pozo (0.1 mg/ml). Tres pozos adicionales se trataron con

100 µl de regulador de ensayo solo (sin materiales de prueba y sin hialuronidasa) y sirvieron como un índice de actividad de hialuronidasa cero. Después de la adición de los materiales de ensayo y la enzima, la placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al final del período de incubación, se añadieron 200 µl de guanidina-HCl 6 M a cada pozo para terminar la reacción. La placa se lavó tres veces con PBS que contenía NaCl 2 M, MgSO₄ 50 mM y 0.05% de Tween 20.

Durante la incubación de 30 minutos, se preparó un complejo de avidina/biotina-peroxidasa en 10,5 ml de PBS que contenía Tween 20 al 0,1% usando un kit ABC. Esta mezcla se incubó durante al menos 30 minutos antes de su uso. Después de lavar la placa, se añadieron 100 µl de la solución de avidina/biotina-peroxidasa a cada pozo y la placa se incubó durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con PBS que contenía NaCl 2 M, MgSO₄ 50 mM y 0.05% de Tween 20. Después del lavado final, 100 µl de solución de sustrato (una tableta de 10 mg de OPD en 10 ml de citrato de regulador de PO₄ 0,1 M suplementado con 7.5 µl de H₂O₂ al 30%) fue agregada a cada pozo. La placa se incubó en la oscuridad durante 10-20 minutos y luego se leyó a 460 nm usando un lector de placas. La solución de sustrato también se añadió a tres pozos que no se trataron con materiales de prueba o la solución de avidina/biotina-peroxidasa y se usaron como blanco para las mediciones de absorbancia.

Tabla 13

Tratamiento	Porcentaje de inhibición
10% Un extracto en agua	86
5% MATERIAL A Extracto en agua	67
1% MATERIAL A Extracto en agua	29
1.5% MATERIAL B	93
0.5% MATERIAL B	81
0.1% MATERIAL B	70
0.1% Heparina	74
Control negativo	0
Identificación del material de prueba:	MATERIAL A: <i>Porphyridium</i> sp. biomasa homogeneizada (Quadro F10); células cultivadas como se describe en el Ejemplo 1
Descripción física:	Polvo rojo/morado
Concentraciones probadas:	10%, 5%, 1% (Extraído en etanol o agua)
Identificación del material de prueba:	3% MATERIAL B: Exopolisacáridos de <i>Porphyridium</i> sp. purificados como se describe en el Ejemplo 2
Descripción física:	Bronceado claro, líquido viscoso
Concentraciones probadas:	1.5%, 1%, 0.5%, 0.1%

Ejemplo 16

Polisacáridos derivados sulfatados

Porphyridium cruentum y *Porphyridium* sp. se cultivaron en un medio de agua de mar artificial esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, excepto que la cantidad de MgSO₄ fue variada. Se cultivaron células de *Porphyridium* sp. en MgSO₄ 17 mM. El *Porphyridium* cruentum se cultivó en 120 mM, 600 mM, 750 mM, 1M y MgSO 2 M₄. La división celular ocurrió en todas las concentraciones. El polisacárido se purificó esencialmente como se describe en el Ejemplo 2 a partir de los cultivos de 120 y 600 mM, hasta el punto en que se eliminaron todas las proteínas solubles y moléculas pequeñas. El contenido de azufre se analizó de acuerdo con US EPA SW846, Método 6010B, Espectrometría de Emisión de Plasma Atómico Acoplado Inductivamente. El polisacárido purificado de los cultivos de 17, 120 y 600 mM contenía 3.57, 4.23 y 5.57% de azufre, respectivamente. Se observó que los polisacáridos con mayor porcentaje en peso de sulfato exhibían propiedades de gelificación más fuertes que los polisacáridos con un porcentaje en peso de sulfato más bajo cuando las dos preparaciones se generaron a la misma concentración de polisacárido. Por ejemplo, a una concentración del 1%, el polisacárido que contiene 5,57% de azufre se mantiene en

forma y se mueve como una unidad gelatinosa, mientras que el polisacárido con un 3,57 por ciento de azufre en peso al 1% fluye como un líquido viscoso. Las propiedades de gelificación aumentadas proporcionan beneficios adicionales para las composiciones para el cuidado de la piel, ya que pueden formar geles en productos a concentraciones más bajas.

5

Ejemplo 17

Análisis de monosacáridos

- 10 *Porphyridium cruentum* se cultivó como se describe en el Ejemplo 1, excepto que (a) la cantidad de KNO₃ por litro de medio fue de aproximadamente 150 g/l; (b) los medios no contenían Tris; y (c) los medios contenían aproximadamente 0.14g/L KH₂PO₄. Las células perdieron toda la coloración roja detectable después de aproximadamente tres semanas de crecimiento, y se convirtieron a un tono amarillo. El exopolisacárido se purificó esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. El análisis de monosacáridos se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 5. La composición de monosacáridos del exopolisacárido fue la siguiente:

15

Residuo glicosilo	Masa (μg)	% mol
Arabinosa (Ara)	N.d.	N.d.
Rhamnosa (Rha)	N.d.	N.d.
Fucosa (Fuc)	N.d.	N.d.
Xilosa (Xyl)	137.8	41.5
Ácido Glucurónico (GlcA)	18.7	4.3
Manosa (Man)	trazas	trazas
Galactosa (Gal)	133.2	33.4
Glucosa (Glc)	83.2	20.8
Azúcar Desconocido	N.d.	N.d.
N-acetil glucosamina (GlcNAc)	N.d.	N.d.
Ácido N-acetil neuramínico (NANA)	N.d.	N.d.
	Σ= 372.9	

- 20 El exopolisacárido contenía una composición de monosacáridos significativamente diferente y más ventajosa que las producidas en condiciones estándar mostradas en el Ejemplo 5. La composición es una composición preferida para productos para el cuidado de la piel. Por ejemplo, la relación de glucosa a xilosa es mayor en el polisacárido de las células blanqueadas.

Ejemplo 18

25

Producción de perlas de polisacáridos

- 30 Dos soluciones de polisacárido de *Porphyridium cruentum* (0,5% p/v) en agua, preparadas como se describe en el Ejemplo 2 excepto enjuagadas con agua destilada en lugar de Tris 1 mM, se secaron bajo flujo de aire a 60°C hasta convertirlas en una película sólida translúcida. Se aisló una muestra de *Porphyridium cruentum* cultivado en medio ATCC 1495, mientras que la otra era de *Porphyridium cruentum* cultivado en medio ATCC 1495 con la excepción de que el KNO₃ era aproximadamente 0,15 g/l (etiquetado como "1495 N bajo"). Las películas resultantes se calentaron luego al vacío (≥ 25 en Hg) a aproximadamente 150°C durante la noche para formar un polisacárido seco. El polisacárido seco se trituró en una mano de mortero. Una tercera muestra de polisacárido (0,5% p/v) en agua, aislada de *Porphyridium cruentum* cultivada en medio ATCC 1495, preparada como se describe en el Ejemplo 2, excepto que se enjuagó con agua destilada en lugar de Tris 1 mM, se liofilizó y no se trituró.

35

- 40 Se resuspendieron 100 mg de polisacárido molido seco de cada muestra en 2,5 ml de agua. Se resuspendieron 100 mg de polisacárido liofilizado en 2,5 ml de agua. Las suspensiones se centrifugaron a 4.400 rpm en una centrifuga refrigerada Forma Scientific Centra-GP8R. Los parámetros utilizados para la centrifugación fueron 4200 rpm, rotor n. ° 218, centrifugado de 20 minutos. Como se muestra en la Figura 16 (c), había una capa de gel hinchable e insoluble y un sobrenadante transparente en las muestras que se secaron a 150 °C, pero no en las muestras que se

lío filizaron o secaron a 105 °C. El polisacárido secado a 150 °C no se disolvió, sino que permaneció insoluble a pesar de una importante hinchazón de tamaño.

El porcentaje de polisacárido insoluble en las muestras secas a 150 °C se midió separando las fracciones insolubles y sobrenadantes, lío filizando las fracciones separadas y pesando el polisacárido residual seco de cada fracción. El porcentaje de polisacárido insoluble se calculó luego como un porcentaje del polisacárido total de ambas fracciones. Mientras que el polisacárido de las muestras que originalmente se secaron por lío filización y secado a 105 °C eran 100% solubles, las muestras de polisacáridos bajos en N y ATCC 1495 secadas a 150 °C eran insolubles en un 75% y 86%, respectivamente. Experimentos independientes demostraron que el material secado a 125 °C era completamente soluble.

Ejemplo 19

Propiedades de perlas de polisacáridos

Las preparaciones de polisacáridos insolubles, preparadas esencialmente como se describe en el Ejemplo 18, se ensayaron para (a) la capacidad de hincharse en tamaño a lo largo del tiempo y (b) la capacidad de unirse al polisacárido soluble y eliminarlo de la solución.

Las muestras se resuspendieron en agua destilada como se describe en el Ejemplo 18. Las muestras se centrifugaron como se describe en el Ejemplo 18 en diversos puntos temporales. Se midió el volumen de la capa de gel insoluble, seguido de la resuspensión del material y la incubación a temperatura ambiente hasta el siguiente punto de centrifugación. Los resultados se muestran en la Figura 17. Los resultados demuestran que las perlas de polisacáridos secados continúan hinchándose en volumen durante al menos 4 horas y hasta 18 horas después de la exposición inicial al agua.

La concentración de polisacárido en solución en el sobrenadante se midió en cada punto de tiempo usando el ensayo de DMMB como se describe en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Figura 17 (b). Los resultados demuestran que las esferas de polisacáridos se unen al polisacárido soluble y lo retiran de la solución durante al menos 4 horas después de la exposición inicial al agua. El hinchamiento y la unión del polisacárido soluble es una propiedad útil para la aplicación tópica en la piel humana y se estimula mediante la pérdida de agua transepidérmica.

Ejemplo 20

Transformación de *Porphyridium* y genotipificado

El promotor de glicoproteína de *Porphyridium*, SEQ ID NO: 21, se clonó en un enlace operable con un ADNc de resistencia a zeocina con pequeñas cantidades de secuencia flanqueante (SEQ ID NO: 37), con la región 5' distante del promotor de glicoproteína directamente adyacente al sitio pBluescript SacI y la región 3' distante de CMV 3' UTR (SEQ ID NO: 32) adyacente al sitio pBluescript KpnI. El CMV 3'UTR también estaba en enlace operable con el cDNA ble. El plásmido se linealizó mediante KpnI, que corta en el promotor, el ADNc ble, o 3'UTR, antes de la transformación.

El sistema de suministro biológico de partículas PDS 1000/He (Bio-Rad, EE. UU.) se usó para la transformación. El cultivo de *Porphyridium sp.* se cultivó a la fase logarítmica ($\sim 2 \times 10^6$ células/ml) en medio líquido ATCC 1495 bajo luz continua (aproximadamente 75 $\mu\text{mol}/\text{fotones}/\text{m}^2$). Las células de este cultivo se cosecharon a 4.000 rpm a temperatura ambiente.

El sedimento celular se lavó dos veces con agua destilada estéril. Las células se resuspendieron en medio ATCC 1495 nuevo a la misma densidad celular, es decir, $\sim 2 \times 10^6$ células/ml y se incubaron en la oscuridad durante 16 horas. Las células adaptadas oscuras se recogieron después a 4000 rpm a temperatura ambiente, se resuspendieron en medio ATCC 1495 nuevo a una densidad de $\sim 2 \times 10^8$ células/mL. Aproximadamente 1×10^8 células se transfirieron a cada placa de agarosa ATCC 1495. El ADN esterilizado por filtración de los plásmidos se revistió sobre partículas de oro de 550 nm (número de catálogo S04e, Seashell Technology, EE. UU.) De acuerdo con el protocolo del fabricante. Para cada uno de los bombardeos de partículas, se usó 1 μg de ADN plasmídico. Los controles negativos se bombardearon de manera idéntica con partículas de oro recubiertas con un plásmido que contiene el promotor de glicoproteína de *Porphyridium*, SEQ ID NO: 21, y CMV 3'UTR, (SEQ ID NO: 32), sin gen de resistencia a zeocina. Cada uno de los bombardeos de partículas se realizó usando discos de ruptura de 1350 psi, a una distancia de bombardeo de 9 cm, y bajo un vacío de 28 in. Hg. Las células bombardeadas se rasparon de las placas, y se transfirieron a 100 ml de medio ATCC 1495 fresco, y se agitaron bajo luz continua (aproximadamente 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) por 3 días. Después de la recuperación, las células se cosecharon a 4.000 rpm a temperatura ambiente y se colocaron en placas ATCC 1495 complementadas con 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) a una densidad celular de 1×10^7 células/placa. Estas placas se incubaron bajo luz (aproximadamente 25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) durante 4-5 semanas. Las colonias resistentes a zeocina que crecen en estas placas se puntuaron como transformantes y se transfirieron a placas ATCC 1495 frescas complementadas con 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) para crecimiento y análisis.

Las colonias resistentes a zeocina aparecieron después de 2-3 semanas. La genotipificación con cebadores específicos del gen de resistencia a zeocina se realizó en ADN genómico aislado de colonias resistentes a zeocina. Los resultados de la genotipificación de una cepa (a la que se hace referencia en este documento y que se etiqueta como "transformante # 2" en la Figura 14) indicaron que el gen de resistencia a zeocina estaba presente. Se amplificó una banda del tamaño correcto. Los resultados se muestran en la Figura 14 y se discuten con más detalle en el Ejemplo 20.

Ejemplo 21

Transformación de *Porphyridium*, Genotipificación y Análisis de inmunoprecipitación Southern

El plásmido de resistencia a zeocina descrito en el Ejemplo 20 y un segundo plásmido que era idéntico con la excepción de que contenía un ADNc para un transportador de glucosa GLUT1 humano (SEQ ID NO: 25) en lugar del ADNc ble, se combinaron en un experimento de cotransformación llevado a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 20, excepto que tanto la resistencia a zeocina como los plásmidos GLUT1 se adhirieron ambos a las perlas de oro. Se seleccionó una colonia resistente a zeocina (denominada aquí transformante # 1) para análisis adicional. El ADN genómico se extrajo de *Porphyridium* sp. tipo salvaje y transformante # 1.

La genotipificación se realizó en ADN genómico extraído de transformante de tipo silvestre, # 1, y transformante de ADN # 2 con ADN de plásmido usado como control positivo de plantilla y agua en lugar de ADN como control negativo de plantilla. Se utilizó un segmento del promotor del gen de la glicoproteína de *Porphyridium* (GLP) como control positivo objetivo. Los siguientes conjuntos de cebadores se usaron para la PCR de genotipificación: Ble-FWD (SEQ ID NO: 26) y Ble-REV (SEQ ID NO: 27), GLP-FWD (SEQ ID NO: 28) y (SEQ ID NO: 29), GLUT1-FWD (SEQ ID NO: 30) y GLUT1-REV (SEQ ID NO: 31). El perfil de PCR utilizado fue el siguiente: desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 51 °C o 60 °C (51 °C para el gen de glicoproteína y GLUT1 y 60 °C para ble) durante 30 segundos, 72 °C durante 2 minutos; 72 °C durante 5 min. Los resultados se muestran en la Figura 14. La Figura 14 (a) demuestra que el gen ble estaba presente en ambos transformantes, ya que se generó el producto esperado de 300 pb. La Figura 14 (b) demuestra que la extracción y amplificación de ADN genómico estaba funcionando, ya que se generó el fragmento del promotor de glicoproteína de 948 pb esperado. La Figura 14 (c) demuestra que el gen GLUT1 estaba presente en el transformante # 1, ya que se generó el producto esperado de 325 pb. La escalera de ADN era de BioNexus, Inc., All-purpose Hi-Lo DNA Marker, # de catálogo: BN2050.

Se pueden amplificar bandas específicas a partir del ADN de plásmido residual adherido al exterior de las células en placas de transformación. Además, los plásmidos que no se han linealizado pueden mantenerse como episomas durante un período de tiempo antes de degradarse y pueden servir como plantilla durante la PCR a pesar de no haberse integrado en un cromosoma de un organismo huésped. En ambos casos, las cepas de microalgas pueden genotipificar en positivo a pesar de la ausencia de integración cromosómica estable del vector. Se sabe que las cepas resistentes a antibióticos surgen debido a la mutagénesis causada por daño cromosómico de partículas biolísticas, condiciones de electroporación y variación genética aleatoria que se sabe que ocurre en organismos microbianos. El análisis de inmunotransferencia Southern se realizó para confirmar de forma concluyente la integración de la construcción GLUT1 en el genoma del transformante # 1.

El análisis de transferencia Southern se realizó en el transformante # 1. Se digirieron individualmente 20 µg de ADN genómico de tipo salvaje y el transformante # 1 con Hinc II, Sac I, Xho I y se separaron en un gel de agarosa al 1%. El ADN se transfirió a membrana de nylon (Hybond N+, Amersham Biosciences). Se usó como sonda un fragmento de 1495 pb que contenía la región codificante completa del gen GLUT1. Se generaron sondas marcadas con DIG para cada fragmento de sonda usando el kit de detección y etiquetado de ADN DIG High Prime de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche). Las bandas de hibridación se detectaron usando los reactivos de detección colorimétrica proporcionados por el fabricante. La Figura 15 demuestra que el plásmido GLUT1 se integró de manera estable en el genoma del transformante # 1 mientras que no se detectó señal del ADN genómico de tipo salvaje. Como sería de esperar para un plásmido que se integra en un cromosoma de un organismo, la banda específica estaba en una posición diferente para cada enzima de restricción utilizada para digerir el ADN genómico. Estos datos demuestran de forma concluyente una especie del género *Porphyridium* que contiene un gen exógeno que codifica un transportador de carbohidratos integrado en un cromosoma del organismo. En esta realización, el gen transportador de carbohidrato está en enlace operable con un promotor endógeno a una especie del género *Porphyridium*. En algunas otras realizaciones, el gen transportador de carbohidrato está en enlace operable con un promotor endógeno a un *Rhodophyte*.

Ejemplo 22

Producción de materiales de microalgas

Se generaron materiales de *Porphyridium* para evaluar su utilidad como componentes de composiciones para el cuidado de la piel. Los materiales BM, LS PS y HS PS se generaron y probaron como se hace referencia en este y los siguientes Ejemplos. BM es biomasa de *Porphyridium* sp., desarrollada esencialmente como se describe en el

Ejemplo 1, que se lavó una vez con agua destilada, se corrió dos veces a través de un microfluidizador (Microfluidics Inc, Newton, MA, EE. UU.) y se liofilizó de la siguiente manera: utilizando un Microfluidics Microfluidizer® (modelo # 110Y) presurizado con nitrógeno, el material de biomasa lavada se bombeó a través de un orificio de 87 μm a 22,000 psi dos veces. El producto se mantuvo en hielo en todo momento. Se burbujeó gas nitrógeno a través del producto final mientras se mezclaba durante 10 minutos. Se aplicó congelación instantánea o congelación en cápsula y liofilización. El material BM se trató entonces como se describe en cada ejemplo.

El LS PS era polisacárido de *Porphyridium* sp. El HS PS era polisacárido de *Porphyridium* cruentum. Ambos se purificaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Las células cultivadas para la preparación de LS PS y HS PS se cultivaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, excepto que el sulfato en el medio fue de 17 mM para el LS PS y 600 mM para el HS PS (también descrito en el Ejemplo 16).

Ejemplo 23

Propiedades de protección a UVB de materiales de microalgas

Ensayo de exposición de dímero TT a UV: El sistema de prueba utilizado para este ensayo fue MatTek EpiDerm®, un modelo de piel que consiste en queratinocitos epidérmicos derivados de humanos normales cultivados para formar un modelo de la epidermis humana de múltiples capas altamente diferenciado. Para este estudio, los tejidos se trataron tópicamente durante la noche con materiales de prueba, Trolox 1 mM (control positivo) o sin tratar (control negativo). Al día siguiente, los tejidos fueron expuestos a UVB (300 mJ/cm^2) Después de las exposiciones, el ADN se extrajo de los tejidos EpiDerm y se analizó el contenido de dímero de timina. Las muestras de ADN se inmovilizaron en un soporte de membrana sólido y se incubaron con un anticuerpo que reconoce dímeros de timidina en ADN de doble cadena. El anticuerpo primario se detectó usando un anticuerpo secundario conjugado con una enzima fosfatasa alcalina seguido de la adición de un sustrato que la enzima fosfatasa alcalina usa para generar una señal quimioluminiscente. La luz generada por esta reacción se capturó utilizando una película con la intensidad de la señal de luz proporcional a la cantidad de dímeros de timina presentes en la muestra.

El material de prueba BM fue biomasa de *Porphyridium* sp. que se había homogeneizado con un Microfluidizer® dos veces y luego se liofilizó. Para este estudio, se combinaron 100 mg de este material con 5 ml de agua ultrapura en tubos de centrifuga de 15 ml. Después de la combinación, la mezcla se agitó en vórtex, luego se colocó en una plataforma oscilante durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se centrifugó a 1.000 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante se usó luego en una concentración final de 10% y 5%. Los dos materiales de prueba restantes, LS PS y HS PS, se suministraron como soluciones espesas y viscosas (3 g/100 ml). LS PS53 se probó a las concentraciones finales de 1,5%, 0,5% y 0,1%, mientras que PS133 se probó a la concentración final de 0,1%.

Antes del uso, los tejidos MatTek EpiDerm® se extrajeron de la bandeja de envío de agarosa y se colocaron en una placa de 6 pozos que contenía 0,9 ml de medio de corte (medio de cultivo MatTek EPI-100) de acuerdo con el fabricante. Los tejidos se dejaron incubar durante al menos 1 hora a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y $5 \pm 1\%$ de CO_2 . Después de esta incubación inicial, el medio de cultivo se reemplazó con medio EPI-100 recién precalentado y se aplicaron 100 μl de material de prueba, Trolox 1 mM o PBS (control negativo). Los tejidos se incubaron durante la noche a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y $5 \pm 1\%$ de CO_2 . Al día siguiente, los tejidos se expusieron a 300 mJ/cm^2 de energía UVB a 300nm. Después de la exposición a UVB, los tejidos se recogieron y el ADN se extrajo inmediatamente.

La extracción de ADN se realizó con el Qiagen, DNEasy Kit. Los tejidos individuales se colocaron en tubos de centrifuga de 1,5 ml que contenían 180 μl de Lysis Buffer One. Después de picar los tejidos con un par de tijeras de punta fina, se añadieron 20 μl de Proteinasa K al tubo y el tubo se incubó durante la noche a $55 \pm 2^\circ\text{C}$ con mezcla/agitación vorticial ocasional. Después de la digestión con Proteinasa K, se añadieron 200 μl de Lysis Buffer Two al tubo y el tubo se incubó a $70 \pm 2^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 10 minutos. A continuación, el ADN se precipitó mediante la adición de 200 μl de etanol al 100%. El ADN precipitado se lavó para eliminar restos celulares aplicando la mezcla a una columna DNEasy Spin y centrifugando la muestra en un tubo de recolección de 2 ml a 8,000 rpm durante 1 minuto. Se desechó el flujo y el tubo de recolección, y se añadieron 500 μl de Wash Buffer One a la columna de centrifugación y se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección y se centrifugó a 8,000 RPM durante 1 minuto. Se desechó nuevamente el flujo y el tubo de recolección, y se añadieron 500 μl de Wash Buffer Two a la columna de centrifugación y la columna se colocó en un nuevo tubo de recolección y se centrifugó a 14.000 RPM durante 3 minutos. La columna de centrifugación se colocó luego en un nuevo tubo de centrifuga de 1,5 ml y se añadieron 110 μl de regulador de elución a la columna. La columna se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 8,000 RPM durante 1 minuto.

El ADN extraído se cuantificó mediante un ensayo fluorométrico. Se mezcló una alícuota de 10 μl de la muestra de ADN con 1,0 ml de regulador de ensayo (NaCl 2 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4) y se transfirieron 100 μl de esta muestra diluida a un pozo en una placa negra de 96 pozos. Una serie de estándares de ADN (0, 100, 200, 300, 400 y 500 ng) también se transfirió a pozos en una placa de 96 pozos (por duplicado). Finalmente, se añadieron 100 μl de colorante Hoechst 33258 diluido (0,006 mg/ml en regulador de ensayo) a cada pozo y se determinó la intensidad

de fluorescencia de cada pozo usando una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 485 nm.

Se cargaron alícuotas de ADN (400 ng en 2x SSC [solución madre 20x SSC: NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M, pH 7,0]) en una membrana mediante transferencia por microfiltración. Después de la carga, la membrana se lavó una vez en 2x SSC y luego se calentó en horno durante 30 minutos a 80°C para reticular el ADN a la membrana. La membrana se incubó luego durante 1 hora en solución bloqueadora (TBS [Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM] suplementada con proteína de leche sin grasa al 5%, 0,2% de polivinilpirrolidona y 0,2% de ficol), y luego se lavó brevemente dos veces. en TBS-T (TBS con 0,1% de proteína de leche sin grasa y 0,1% de Tween 20). La membrana se incubó durante la noche (4 °C) con un anticuerpo que reconoce los dímeros de timina diluidos en TBS-T. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T (20 minutos por lavado) y luego se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a AP durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después de este período de incubación, la membrana se lavó como se describió anteriormente. Cerca del final del lavado final se preparó el reactivo de quimioluminiscencia. Al final del último lavado, todo el TBS-T se drenó de la membrana y el sustrato quimioluminiscente se aplicó a la membrana y se dejó reposar durante aproximadamente 1 minuto. La membrana se envolvió en papel de Saran y se pegó con cinta adhesiva en el interior de un casete de película. En una habitación oscura, se insertó un trozo de película en el casete y se expuso durante varios períodos de tiempo, comenzando con 10 segundos y aumentando o disminuyendo en incrementos apropiados, hasta obtener las exposiciones necesarias. Después de la exposición, las películas se analizaron mediante densitometría. Para cuantificar la cantidad de ADN presente, se generó una curva estándar usando concentraciones conocidas de ADN y su intensidad de fluorescencia respectiva (medida en RFU o unidades de fluorescencia relativas). Se realizó un análisis de regresión para establecer la línea que mejor se ajusta a estos puntos de datos. Las RFU para cada muestra desconocida se usaron para estimar la cantidad de ADN. Se determinaron los valores densitométricos medios, expresados en unidades de densidad óptica, para cada tratamiento.

Los resultados para el ensayo del dímero de timidina se presentan en la Tabla 14 y la Figura 11 (a). Los valores se expresan como unidades de densidad óptica. Los valores se presentan como valores medios $\pm$ desviación estándar.

Tabla 14. Ensayo de dímero de timidina

Tratamiento	Densidad óptica	
10% BM	85 $\pm$	11
5% BM	140 $\pm$	15
1.5% LS PS	140 $\pm$	3
0.5% LS PS	152 $\pm$	16
0.1% LS PS	150 $\pm$	13
0.1% HS PS	160 $\pm$	2
1 mM Trolox	107 $\pm$	1
Sin tratamiento	196 $\pm$	6
No expuesto a los rayos UVB	39 $\pm$	4

Los resultados de este estudio indican que los tres materiales de prueba redujeron significativamente la cantidad de formación de dímeros de TT.

Ejemplo 24

Propiedades estimulantes de síntesis de procolágeno de materiales de microalgas

Se usó un modelo de cultivo de células de fibroblastos para evaluar la capacidad del polisacárido de *Porphyridium* para ejercer un efecto sobre la síntesis de procolágeno. Los fibroblastos son la fuente principal de los péptidos de la matriz extracelular, incluida la proteína estructural colágeno. El procolágeno es un péptido grande sintetizado por fibroblastos en la capa dérmica de la piel y es el precursor del colágeno. A medida que el péptido se procesa para formar una proteína de colágeno madura, la porción de propéptido se escinde (péptido C de tipo I). Tanto la proteína de colágeno madura como el fragmento de péptido C tipo I se liberan luego en el entorno extracelular. A medida que se sintetiza colágeno, el fragmento de péptido C tipo I se acumula en el medio de cultivo tisular. Como hay una relación estequiométrica de 1:1 entre las dos partes del péptido procolágeno, el ensayo del péptido C de tipo I refleja la cantidad de colágeno sintetizado. El péptido C tipo 1 se analizó mediante un método basado en ELISA. El material de prueba LS PS se suministró como una solución viscosa y espesa (3 g/100 ml). Este material se usó a una concentración final de 0,1%. El anticuerpo anti-colágeno utilizado fue Procollagen Tipo I: anticuerpo N-18, número de

catálogo sc-8785, Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-cabra conjugado con el número de catálogo de fosfatasa alcalina sc-2355, Santa Cruz Biotechnology.

Se sembraron fibroblastos en los pozos individuales de una placa de 12 pozos en 1,0 ml de medio de crecimiento de fibroblastos (FGM: DMEM suplementado con FBS al 2%, 5 ng/ml de factor de crecimiento recombinante humano, 5 ug/ml de insulina, 50 ug/ml de gentamicina, y 0,5 µg/ml de anfotericina-B) y se incubaron durante la noche a 37 ± 2 °C y $5 \pm 1\%$ de CO₂. Al día siguiente, los medios se eliminaron mediante aspiración para eliminar cualquier célula no adherente y se reemplazaron con 1,0 ml de MGF fresca. Las células se hicieron crecer hasta confluir con un cambio de medio cada 48 a 72 horas. Al alcanzar la confluencia, las células se trataron durante 24 horas con DMEM suplementado con FBS al 1,5% para eliminar cualquier efecto de los factores de crecimiento incluidos en los medios de cultivo normales. Después de este período de lavado de 24 horas, las células se trataron con LS PS al 0,1% disuelto en FGM con FBS al 1,5%. Se utilizó butirato de sodio 4 mM como control positivo. Las células no tratadas (controles negativos) recibieron MGF con FBS al 1,5%. Las células se incubaron durante 48 horas y al final del período de incubación se recogió el medio de cultivo celular y se almacenó congelado (-75 °C) o se analizó inmediatamente. Los materiales fueron probados por triplicado.

Se preparó una serie de patrones de péptido C de tipo I que variaban de 0 ng/ml a 640 ng/ml. A continuación, se preparó una microplaca ELISA mediante la eliminación de las tiras innecesarias del marco de la placa seguido de la adición de 100 µl de anticuerpo anti-péptido de tipo I-C marcado con peroxidasa para cada pozo utilizado en el ensayo. Luego se agregaron veinte (20) µl de cualquier muestra (medio de cultivo tisular recogido) o estándar a los pozos apropiados y se cubrió la microplaca y se dejó incubar durante $3 \pm 0,25$ horas a 37 °C. Después de la incubación, los pozos se aspiraron y se lavaron tres veces con 400 µl de regulador de lavado. Después de eliminar el último lavado, se añadieron 100 µl de solución de sustrato de peroxidasa (peróxido de hidrógeno + tetrametilbenzidina como cromógeno) a cada pozo y la placa se incubó durante 15 ± 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 1 N) a cada pozo y se leyó la placa usando un lector de microplacas a 450 nm.

Para cuantificar la cantidad de procolágeno presente, se generó una curva estándar usando concentraciones conocidas de procolágeno. Se realizó un análisis de regresión para establecer la línea que mejor se ajusta a los puntos de datos. Los valores de absorbancia para la prueba y las muestras de control positivo se usaron para determinar la cantidad de procolágeno presente. Los valores se presentan en media ng/ml $\pm$ la desviación estándar de la media. Un 0.1% de LS PS aumentó la síntesis de procolágeno en comparación con las células no tratadas, como se ve a continuación en la Tabla 15 y en la Figura 11 (b).

Tabla 15. Ensayo de procolágeno

Tratamiento	Péptido C Tipo I ng/ml	
0.1% LS PS	1448	$\pm$ 113
Butirato de Na 4 mM	1425	$\pm$ 81
Sin tratamiento	1151	$\pm$ 96

Ejemplo 24

Propiedades estimulantes de la síntesis de elastina a partir de materiales de microalgas

Se usó un modelo de cultivo de células de fibroblastos para evaluar la síntesis de elastina. La elastina es el componente principal de una red de fibras elásticas que les da a los tejidos la capacidad de retroceder después de un estiramiento transitorio. Esta proteína es liberada por los fibroblastos (elastina soluble) en el espacio extracelular donde luego se reticula con otras proteínas de elastina para formar una extensa red de fibras y láminas (elastina insoluble). La elastina soluble se puede medir fácilmente a partir del medio de cultivo celular mediante un método competitivo basado en ELISA.

El material de prueba BM se suministró como material de tipo polvo. Se combinaron 100 mg de BM con 5 ml de agua ultrapura en tubos de centrifuga de 15 ml. Después de la combinación, las mezclas se agitaron en vórtex, luego se colocaron en una plataforma oscilante durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se centrifugaron a 1.000 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante para cada mezcla se usó a las concentraciones finales indicadas en la Figura 12 (a). LS PS y HS PS se suministraron como una solución espesa y viscosa (3 g/100 ml). Este material se usó en las concentraciones finales indicadas en la Figura 12 (a).

Los fibroblastos se sembraron en los pozos individuales de una placa de 12 pozos en 1,0 ml de medio de crecimiento de fibroblastos (FGM) y se incubaron durante la noche a 37 ± 2 °C y $5 \pm 1\%$ de CO₂. Al día siguiente, los medios se eliminaron mediante aspiración para eliminar cualquier célula no adherente y se reemplazaron con 1,0 ml de MGF fresca. Las células se cultivaron hasta confluir, con un cambio de medio cada 48 a 72 horas. Al alcanzar la confluencia, las células se trataron durante 24 horas con DMEM suplementado con FBS al 1,5% para eliminar

cualquier efecto de los factores de crecimiento incluidos en los medios de cultivo normales. Después de este período de lavado de 24 horas, las células se trataron con los materiales de prueba a las concentraciones especificadas disueltas en FGM con 1,5% de FBS. Se utilizó butirato de sodio 4 mM como control positivo para la síntesis de elastina. Las células no tratadas (controles negativos) recibieron MGF con FBS al 1,5%. Las células se incubaron durante 48 horas y al final del período de incubación se recogió el medio de cultivo celular y se almacenó congelado (-75 °C) o se analizó inmediatamente. Los materiales fueron probados por triplicado.

La α -elastina soluble se disolvió en carbonato de sodio 0,1 M (pH 9,0) a una concentración de 1,25 μ g/ml. Luego se aplicaron 150 μ l de esta solución a los pozos de una placa Nunc maxisorp de 96 pozos y la placa se incubó durante la noche a 4 °C. Al día siguiente los pozos se saturaron con PBS que contenía 0,25% de BSA y 0,05% de Tween 20. La placa se incubó luego con esta solución de bloqueo durante 1 hora a 37 °C y luego se lavó dos veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%.

Se generó un conjunto de estándares de α -elastina que variaban de 0 a 100 ng/ml. Luego se transfirieron 180 μ l de estándar o muestra a un tubo de microcentrífuga de 650 μ l. El anticuerpo anti-elastina fue el anticuerpo C-21, número de catálogo sc-17581, de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-cabra conjugado con el número de catálogo de fosfatasa alcalina sc-2355, Santa Cruz Biotechnology. Se preparó una solución de anticuerpo anti-elastina (el anticuerpo se diluyó 1:100 en PBS que contenía BSA al 0,25% y Tween 20 al 0,05%) y se añadieron 20 μ l de la solución al tubo. Los tubos se incubaron durante la noche a 4 $\pm$ 2 °C. Al día siguiente, se transfirieron 150 μ l de cada tubo a la placa de ELISA de elastina de 96 pozos, y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%. Después del lavado, se añadieron 200 μ l de una solución que contenía un anticuerpo secundario unido a peroxidasa diluido en PBS que contenía BSA al 0,25% y Tween 20 al 0,05% y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa tres veces como se describió anteriormente, se añadieron 200 μ l de una solución de sustrato y la placa se incubó durante 10 a 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Después de esta incubación final, la placa se leyó a 460 nm usando un lector de placas.

Para cuantificar la cantidad de elastina presente, se generó una curva estándar usando concentraciones conocidas de elastina. Se realizó un análisis de regresión para establecer la línea que mejor se ajusta a estos puntos de datos. Los valores de absorbancia para las muestras de prueba y control se usaron para determinar la cantidad de elastina presente en cada muestra. Ambas concentraciones del 0.5% y 0.1% de LS PS y HS PS indujeron un aumento en la síntesis de elastina.

Ejemplo 25

Propiedades antiinflamatorias de materiales de microalgas

Los materiales de polisacáridos de microalgas se analizaron en cuanto a su capacidad para influir en la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en respuesta a sustancias quimioterapéuticas. La migración de leucocitos es esencial para la acumulación de leucocitos en los sitios de inflamación. Durante la respuesta inflamatoria, los leucocitos migran hacia la fuente de una sustancia quimioterapéutica en un proceso llamado quimiotaxis. Los métodos in vitro para estudiar la quimiotaxis a menudo utilizan una metodología basada en la membrana, donde se coloca un quimioatrayente en un lado de una membrana y se colocan leucocitos PMN en el otro. La quimiotaxis luego se mide al cuantificar el número de leucocitos que luego migran a través del filtro hacia la sustancia quimioterápica.

Para este estudio, los leucocitos de PMN humanos se aislaron mediante centrifugación por densidad a partir de sangre recién extraída. Las células PMN se cargaron con Calcein AM, un colorante fluorescente. Mientras se marcaban las células PMN, la cámara inferior de una cámara de quimiotaxis se llenó con PBS que contenía FMLP, una sustancia quimioterapéutica. Se colocó un filtro de membrana sobre los pozos inferiores, después de lo cual se colocó una parte alícuota pequeña de células PMN marcadas fluorescentemente en la parte superior, junto con los materiales de prueba LS PS y HS PS y los materiales de control positivo. La cámara de quimiotaxis se incubó y al final del período de incubación se leyó la fluorescencia de los pozos del fondo y se usó como un índice de migración de PMN. El material de prueba LS PS y HS PS se suministró en forma de soluciones espesas y viscosas (3 g/100 ml). Estos materiales se usaron a una concentración final de 1.5%, 0.5% y 0.1%.

Se recogió sangre completa heparinizada (20-30 ml) de un donante humano sano, se extendió sobre un gradiente de densidad (Histopaque 1077 e Histopaque 1119) y se centrifugó a 400 g durante 30 minutos. La fracción rica en PMN se eliminó, se lavó dos veces con solución salina regulada con fosfato (PBS) y luego se resuspendió en 5,0 ml de RPMI-1640 sin rojo de fenol suplementado con 10% de suero de ternera fetal tratado térmicamente (RPMI-FCS). Se añadió calceína AM (5 μ g/ml final) a la suspensión celular y luego las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las células PMN se lavaron dos veces con PBS, se contaron y se resuspendieron en RPMI-FCS a $1-5 \times 10^6$ células/ml.

Se usó una cámara desechable de quimiotaxis de 96 pozos para medir la migración de PMN (cámaras de quimiotaxis fabricadas por Neuroprobe Inc., Gaithersburg, MD, número de catálogo 101-5). Para configurar la

cámara de 96 pozos, los pozos de la microplaca (cámara inferior) se llenaron con 29 µl de FMLP (0,1 µM) diluido en PBS con albúmina sérica al 0,1%. Los pozos de control negativo se prepararon con PBS y albúmina (no se añadió FMLP). Se usó anfotericina B (2 µg/ml) como control positivo (inhibe la migración de PMN). Además, 3 pozos se llenaron con 12,5 µl de células PMN marcadas fluorescentemente y 12,5 µl de PBS con 0,1% de albúmina. Estos últimos pozos se usaron como un índice para representar el 100% de migración de las células PMN.

Los materiales de prueba se prepararon en RPMI-FCS a 2x su concentración final deseada. Se utilizó RPMI-FCS sin materiales de prueba como otro control negativo. Se combinaron alícuotas de los materiales de ensayo con un volumen igual de células PMN marcadas fluorescentemente. Luego se colocó una membrana de quimiotaxis sobre los pozos del fondo de la cámara de quimiotaxis y se ancló en su lugar. Se colocaron 25 µl de la combinación de PMN/material de ensayo en la membrana sobre cada uno de los pozos del fondo (los materiales se analizaron por triplicado) y la placa de pozos se incubó durante 1 hora a 37 ± 2 °C y 5% de CO₂. Al final de la incubación, se limpió la parte superior de la membrana de quimiotaxis con un tejido para eliminar las células no migratorias y se leyeron los pozos inferiores de la cámara de quimiotaxis usando un lector de placa fluorescente (excitación a 485 nm, emisión a 530 nm).

La fluorescencia media de los tres pozos llenados directamente con células PMN fluorescentes se determinó y se utilizó para representar el 100% de migración. La fluorescencia media de las células de PMN tratadas con material de ensayo se determinó a continuación (Migración de material de prueba). Los valores de fluorescencia se corrigieron para la migración sin quimiotaxis restando las medidas fluorescentes medias para los pozos donde FMLP no estaba presente como quimioatrayente. El porcentaje de migración de PMN se calculó usando la siguiente ecuación: $((\text{Migración del material de prueba (RFU media)}) / (100\% \text{ de migración (RFU media)})) \times 100$

Los resultados para el ensayo de migración de PMN se presentan en la Tabla 16 y la Figura 12 (b). Los valores se expresan como porcentaje medio de células migratorias máximas (100%) $\pm$ desviación estándar. Las muestras LS PS y HS PS redujeron la migración de PMN a todas las concentraciones probadas.

Tabla 16. Migración de PMN

Tratamiento	Porcentaje de migración máxima		
1.5% LS PS	7.3	$\pm$	1.0
0.5% LS PS	7.7	$\pm$	0.7
0.1% LS PS	11.1	$\pm$	0.6
1.5% HS PS	6.0	$\pm$	0.8
0.5% HS PS	9.0	$\pm$	0.4
0.1% HS PS	10.6	$\pm$	1.3
2 µg/ml Anfotericina B	9.4	$\pm$	0.6
Sin tratamiento	13.5	$\pm$	0.9

Ejemplo 26

Propiedades antiinflamatorias de materiales de microalgas

La citoquina proinflamatoria del interferón gamma, que es liberada por los linfocitos T activados, desempeña un papel en las respuestas inflamatorias humanas. El interferón-gamma también estimula la enzima indoleamina-2,3-dioxigenasa, que degrada el triptófano a kinurenina. Junto con otras citocinas proinflamatorias, el interferón gamma es el desencadenante más importante para la formación y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La interleucina-1 alfa (IL1- α) es una citoquina que también juega un papel importante en las respuestas inflamatorias. Los materiales de microalgas se analizaron en cuanto a su capacidad para suprimir la secreción de interferón gamma e IL1- α por células mononucleares de sangre periférica humana.

Se recogió sangre completa heparinizada (20-30 ml) de un donante humano sano, se extendió sobre un gradiente de densidad (Histopaque 1077 e Histopaque 1119) y se centrifugó a 400 g durante 30 minutos. La fracción rica en PBMC se retiró y se lavó dos veces con 5,0 ml de RPMI-1640 sin rojo de fenol suplementado con 5% de suero de ternera fetal tratado térmicamente (RPMI-FCS). Después del lavado, las células se resuspendieron en RPMI-FCS a una densidad final de 1×10^6 células/ml.

Se añadieron cincuenta microlitros de células PBMC a los pozos en una placa de 96 pozos (cada tratamiento se probó por triplicado). A continuación, se añadieron a los pozos 50 µl de RPMI-FCS suplementado con 2 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) y los respectivos materiales de prueba. Se usó ciclosporina A (2,5 µg/ml) como control positivo, mientras que las células no tratadas sirvieron como control negativo (sin tratamiento). Un conjunto de pozos no fue tratado con PHA (no tratado con PHA). Después de preparar los pozos, las placas se incubaron durante

aproximadamente 68 horas a 37 ± 2 °C y 5% de CO₂. Después de la incubación, se añadieron 20 µl de una solución 20:1 de MTS:PMS (Promega) a cada pozo y la placa de 96 pozos se devolvió a la incubadora durante 4 horas adicionales. La placa se leyó entonces a 490 nm usando un lector de placas. Al final del período de incubación, se analizó el sobrenadante del cultivo celular para IL-1α e interferón gamma.

Antes del ensayo, todos los reguladores y reactivos se prepararon de acuerdo con las instrucciones del kit de ELISA (IL-1α: Cayman Chemicals (número de catálogo 583301); γ-IFN: R & D Systems (número de catálogo DIF50)) y se dejó alcanzar la temperatura ambiente. La placa de 96 pozos se preparó eliminando las tiras de pozos que no se necesitaban y enjuagando la placa una vez con regulador de lavado, seguido de una transferencia seca. A continuación, se preparó una serie de patrones de IL-1α que variaban de 0 a 250 pg/ml y se dispensaron 100 µl de cada uno de estos patrones en dos pozos (duplicados) en la placa de 96 pozos. Posteriormente, se añadieron 50 µl de cada muestra + 50 µl de medio de cultivo a pozos adicionales (las muestras se diluyeron para llevar sus niveles de IL-1α dentro del rango de la curva estándar), seguido de la adición de 100 µl de solución de conjugado acetilcolinesterasa:interleucina-1α FAB'. Después de reservar dos pozos vacíos para servir como blancos, la placa de 96 pozos se incubó durante la noche a 2-8 °C. Al día siguiente, los pozos se aspiraron y se lavaron 5-6 veces con regulador de lavado. Después de eliminar el último lavado, se añadieron 200 µl de reactivo de Ellman nuevo a cada pozo. La placa se incubó a temperatura ambiente con controles periódicos de las lecturas de absorbancia (405 nm) usando un lector de placas.

Se preparó una serie de estándares de interferón gamma que variaban de 15,6 pg/ml a 1000 pg/ml usando interferón gamma humano. A continuación, se preparó una microplaca ELISA mediante la eliminación de las tiras innecesarias del marco de la placa. Se añadieron 100 µl de diluyente de ensayo RD1F a cada pozo, seguido de la adición de 100 µl de muestra (diluida en medio de cultivo si es necesario para llevar los valores de interferón gamma dentro del rango de la curva estándar) o 100 µl de estándar por pozo. La microplaca se cubrió y se dejó incubar durante $2 \pm 0,25$ horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, la placa se aspiró y se lavó tres veces con 400 µl de regulador de lavado. Después de eliminar el último lavado, se añadieron a cada pozo 200 µl de solución de anticuerpo anti-interferón gamma/peroxidasa de rábano picante y la placa se incubó durante $1 \pm 0,25$ horas a temperatura ambiente. Los pozos se aspiraron y lavaron de nuevo como se describió anteriormente. Después de eliminar el último lavado, se añadieron a cada pozo 200 µl de solución de sustrato de peroxidasa de rábano picante (peróxido de hidrógeno + tetrametilbencidina como cromógeno) y la placa se incubó durante 20 ± 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron 50 µl de solución de detención (ácido sulfúrico 2 N) a cada pozo y la placa se leyó usando un lector de microplacas a 450 nm.

Como se demuestra en las Tablas 17 y 18 y en las Figuras 13(a) y 13(b), todos los materiales probados en todas las concentraciones redujeron el interferón gamma e IL-1-a por las células de PBMC humanas.

Tabla 17. Ensayo de IL-1α

Tratamiento	pg/ml		
1.5% LS PS	689	±	69.3
0.5% LS PS	1530	±	79.7
0.1% LS PS	1715	±	69.3
1.5% HS PS	563	±	38.5
0.5% HS PS	1462	±	99.9
0.1% HS PS	1663	±	54.1
2.5 ug/ml Ciclosporina A	1561	±	77.5
Sin tratamiento	2402	±	146.2
Sin tratamiento PHA	1512	±	88.8

Tabla 18. Ensayo de interferón gamma

Tratamiento	pg/ml		
1.5% LS PS	1116	±	109.7
0.5% LS PS	3924	±	425.8
0.1% LS PS	4626	±	305.5
1.5% HS PS	997	±	159.7

Tratamiento	pg/ml		
0.5% HS PS	3509	±	203.0
0.1% HS PS	4125	±	131.4
2.5 ug/ml Ciclosporina A	3259	±	326.8
Sin tratamiento	11078	±	315.0
-PHA sin tratamiento	83	±	7.0

Ejemplo 27

5 Propiedades antiinflamatorias de materiales de microalgas

Cuando se presentan con ciertos antígenos, los linfocitos, que son el tipo de célula principal en PBMC, responden proliferando. Esta reacción de proliferación masiva forma el paso inicial en la respuesta inmune de este tipo de célula. In vitro se utilizaron métodos para estudiar la proliferación de linfocitos humanos utilizando el antígeno fitohemaglutinina (PHA) para estimular una respuesta de proliferación. Se probó la capacidad de los materiales de microalgas para inhibir esta proliferación.

Se recogió sangre completa heparinizada (20-30 ml) de un donante humano sano, se extendió sobre un gradiente de densidad (Histopaque 1077 e Histopaque 1119) y se centrifugó a 400 g durante 30 minutos. La fracción rica en PBMC se retiró y se lavó dos veces con 5,0 ml de RPMI-1640 sin rojo de fenol suplementado con 5% de suero de ternera fetal tratado térmicamente (RPMI-FCS). Después del lavado, las células se resuspendieron en RPMI-FCS a una densidad final de 1×10^6 células/ml.

Se añadieron cincuenta microlitros de células PBMC a los pozos en una placa de 96 pozos (cada tratamiento se probó por triplicado). A continuación, se añadieron a los pozos 50 µl de RPMI-FCS suplementado con 2 µg/ml de PHA y los respectivos materiales de prueba. Se usó ciclosporina A (2,5 µg/ml) como control positivo, mientras que las células no tratadas sirvieron como control negativo (sin tratamiento). Un conjunto de pozos no se trató con PHA y sirvió como un índice de proliferación no estimulada (no tratado con PHA); todas las muestras excepto esta muestra fueron tratadas con PHA. Después de preparar los pozos, las placas se incubaron durante aproximadamente 68 horas a 37 ± 2 °C y 5% de CO₂. Después de la incubación, se añadieron 20 µl de una solución 20: 1 de MTS: PMS (Promega) a cada pozo y la placa de 96 pozos se devolvió a la incubadora durante 4 horas adicionales. La placa se leyó entonces a 490 nm usando un lector de placas.

La absorbancia media de los tres pozos de PBMC no tratadas con PHA se determinó y se utilizó para representar la proliferación no estimulada. Los valores de absorbancia para las PBMC de cada grupo de tratamiento también se determinaron a continuación. Se calculó un índice de proliferación estimulada para cada tratamiento usando las siguientes ecuaciones: $((\text{Absorbancia media del tratamiento con PHA})/(\text{Absorbancia media sin PHA})) \times 100$

Los resultados para el ensayo de proliferación de PBMC se presentan en la Tabla 19 y la Figura 18. Los valores se expresan como un índice de estimulación, usando las PBMC no tratadas no expuestas a PHA para representar el 100%. Como puede verse en la Tabla 19 y en la Figura 18, todos los materiales ensayados redujeron la proliferación de PBMC en comparación con las células estimuladas con PHA que no fueron tratadas con los materiales de prueba.

Tabla 19. Ensayo de proliferación

Tratamiento	Índice de estimulación		
1.5% LS PS	32	±	16.0
0.5% LS PS	106	±	6.9
0.1% LS PS	111	±	12.0
1.5% HS PS	50	±	13.6
0.5% HS PS	117	±	14.4
0.1% HS PS	126	±	34.4

2.5 ug/ml Ciclosporina A	123	±	6.5
Sin tratamiento	183	±	13.9
-PHA sin tratamiento	100	±	5.2

Ejemplo 28

5 Inhibición de elastasa

Se cultivaron los fibroblastos dérmicos humanos y se usaron como fuente de la enzima elastasa. Esta enzima se purificó parcialmente a partir de los fibroblastos al someter a lisis las células en un regulador de elastasa y retener la porción soluble del lisado. Se incubaron luego porciones de este lisado de fibroblastos con materiales de ensayo, un sustrato de elastasa sintética, Suc-(Ala₃)-p-Nitroanilina (STANA). La elastasa actúa sobre este sustrato para liberar p-nitroanilina, que se detecta con un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm. Una inhibición de la enzima elastasa se identifica por una disminución en la cantidad de p-nitroanilina liberada en comparación con la enzima no inhibida.

El material de prueba BM se suministró en forma de polvo. Se combinaron 100 mg de BM con 5 ml de etanol o 5 ml de agua ultrapura en tubos de centrifuga de 15 ml. Después de la combinación, las mezclas se agitaron en vórtex, luego se colocaron en una plataforma oscilante durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se centrifugaron a 1.000 RPM durante 5 minutos. Los sobrenadantes se usaron luego en las concentraciones finales enumeradas en la Tabla 20. Los dos materiales adicionales utilizados en este estudio, PS53 y PS133, se suministraron como soluciones espesas y viscosas (3%). Estos materiales también se usaron en las concentraciones finales enumeradas en la sección de resultados.

Se obtuvieron fibroblastos dérmicos neonatales humanos y se cultivaron según las especificaciones del proveedor usando la técnica estéril en todo momento (Cascade Biologics, catálogo # C-004-5C). Las células fueron sembradas en un 75 cm² matraz y cultivadas en medio de crecimiento de fibroblastos (FGM: DMEM suplementado con FBS al 2%, 5 ng/ml de factor de crecimiento recombinante humano, 5 ug/ml de insulina, 50 ug/ml de gentamicina y 0,5 ug/ml de anfotericina-B) y subcultivadas hasta que había crecido un número suficiente de células.

Después de lavar las células dos veces con PBS, se añadieron aproximadamente 7,5 ml de PBS a cada matraz de cultivo y las células se separaron usando un raspador de células. Las células separadas se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml y el matraz se enjuagó con una segunda aplicación de 7,5 ml de PBS, que también se transfirió al tubo de 15 ml. Después de centrifugar el tubo durante 5 minutos a 1.200 RPM (4 °C), el sobrenadante se retiró y se desechó mientras se resuspendía el sedimento en 2 ml de regulador de elastasa 2x enfriado con hielo (Tris-HCl 400 mM [pH 8,0], Triton al 0,2% X-100) y se somete a sonicación 3 veces durante 10 segundos o hasta que el lisado se volvió transparente. Las células lisadas se centrifugaron a 2.200 RPM durante 10 minutos (4 °C) para eliminar cualquier residuo celular. Los sobrenadantes de todas las preparaciones se agruparon en un único recipiente, se mezclaron y luego se alícuotaron en porciones de 2 ml y se almacenaron a -75 ± 5 °C hasta su uso. Una de las alícuotas se usó para determinar la concentración de proteína (Ensayo de proteína BCA) y el nivel de actividad de elastasa del lote.

Un ensayo de ácido Bicinchoninic (Pierce, Inc., BCA Protein Assay Kit, catálogo n. ° 23227). Cincuenta volúmenes de Reactivo A (ácido bicinonínico BCA se combinó con 1 volumen de Reactivo B (4% (p/v) CuSO₄ - 5 H₂O) en un tubo de centrifuga de 15 ml. Para el ensayo, las proteínas pueden reducir Cu (II) a Cu (I) de una manera dependiente de la concentración. El BCA puede reaccionar con el Cu (I) para formar un complejo de color púrpura con una absorbancia máxima a 562 nm. Doscientos microlitros de este reactivo combinado se dispensaron en una placa de 96 pozos. A continuación, se añadieron 10 µl de cada uno de los patrones a sus respectivos pozos (se prepararon patrones usando 2 mg/ml de albúmina de suero bovino disuelta en PBS, y luego haciendo una serie de diluciones al 50% hasta 0,0078 mg/ml). A continuación, se añadieron 10 µl de regulador elastasa 2x (utilizado como blanco) o muestra de lisado celular. La placa se cubrió y se incubó a 37 ± 2 °C durante 30 ± 5 minutos. Al final de la incubación, se midió la absorbancia de cada pozo a 540 nm usando un lector de microplacas.

Después de medir la concentración de proteína del lisado, se obtuvo una pequeña muestra y se determinó la actividad de elastasa del lisado a concentraciones del 100%, 50% y 25% usando regulador elastasa 2x para realizar las diluciones. Para determinar la actividad, se cargaron 100 µl de las tres concentraciones de lisado diferentes en una placa de 96 pozos (probando cada concentración por triplicado), mientras que se añadieron 100 µl de regulador elastasa 2x a tres pozos adicionales para servir como blancos. A continuación, se añadieron 100 µl de agua desionizada a todos los pozos y la placa de 96 pozos se dejará incubar con las muestras durante 15 minutos a 37 ± 2 °C. A continuación, se añadieron 4 µl de STANA (62.5 mM Suc-(Ala₃)-p-nitroanilina en DMSO) a cada pozo, y la placa de 96 pozos se devolvió a la incubadora durante 1 hora. Después de la incubación, la placa de pozos se leyó a 405 nm usando un lector de microplacas. La absorbancia media para cada concentración del lisado se trazó frente a

su concentración respectiva. Estos valores se usaron para estimar una concentración que producirá una medición espectrofotométrica de 0,4 a 0,5 usando un análisis de regresión lineal de la línea de mejor ajuste a través de los tres puntos de datos (100%, 50% y 25%). Los lisados de fibroblastos almacenados se diluyeron a la concentración apropiada para provocar el nivel deseado de actividad.

Los materiales de ensayo se prepararon a 2x su concentración final deseada en agua desionizada. Si los solventes estaban presentes en los materiales de ensayo, también se prepararon los controles de solvente apropiados. 100 µl de agua destilada sirvieron como control negativo, a la vez que 100 µl de fosforamidón 0,2 mM sirvieron como control positivo. Después de que se habían preparado todos los pozos, la placa de pozos se selló con una cubierta adhesiva y se incubó durante 15 minutos a 37 ± 2 °C para permitir que los inhibidores tuvieran tiempo para interactuar con la elastasa. Después de esta incubación preliminar de 15 minutos, se añadieron 4 µl de STANA; la placa se volvió a sellar y luego se incubó durante 1 hora a 37 ± 2 °C. Al final de la incubación, la placa se leyó a 405 nm usando un lector de microplacas.

Tabla 20. Ensayo de anti-elastasa

Tratamiento	Porcentaje de inhibición
10% Extracción de agua BM	59
5% Extracción de agua BM	40
10% BM Extracción de etanol	28
5% BM Extracción de etanol	16
1% LS PS	29
0.5% LS PS	23
1% LS PS	31
0.5% HS PS	19
100 µM Phosphoramidon	94

Ejemplo 29

Se probaron los materiales de microalgas para evaluar su capacidad para aliviar el enrojecimiento y el dolor asociado con las quemaduras solares. El consentimiento informado se obtuvo de sujetos humanos. Una preparación al 1,5% de polisacárido de *Porphyridium cruentum*, purificada esencialmente como se describe en el ejemplo 2, se formuló con 1% de Germaben II y 0,15% de EDTA de sodio. Un parche de la piel del brazo se expuso a la radiación UV de un simulador Solar Ultraviolet modelo 14S con un sistema de controlador de dosis modelo DCS-1 y una lámpara de arco de xenón de 150 vatios # 1122200 (Hanovia) con un espectro de emisión continua en el rango UV-B de 290-320 nanómetros. La dosis se probó en cada sujeto antes del experimento para determinar la dosis mínima de eritema (MED) necesaria para lograr una respuesta de nivel 2 en cada sujeto. El eritema fue calificado por un evaluador entrenado utilizando la siguiente escala: 0 = sin reacción; + = eritema mínimo; 1 = eritema leve; 2 eritema moderado; 3 = eritema marcado con o sin edema; 4 = eritema severo con o sin edema. Los sujetos fueron expuestos a una dosis de UVB suficiente para generar un eritema de nivel 2 en tres sitios de la piel. Un sitio se trató con el polisacárido antes y después de la irradiación. Un sitio fue tratado con polisacárido solo después de la irradiación. Un sitio se dejó no tratado como control. Después de 4, 24, 48, 72 y 96 horas, se realizó un examen de seguimiento. El polisacárido se aplicó una vez al día a los dos sitios tratados después de los exámenes diarios y también fue tratado una vez al día en casa por cada sujeto.

Las puntuaciones medias de eritema fueron las mismas en los tres sitios analizados a través de los puntos de evaluación de 4 y 24 horas. En la evaluación de 48 horas, la puntuación media del eritema disminuyó un 5% en el sitio tratado antes y después de la irradiación y permaneció igual en los otros dos sitios. En la evaluación de 72 horas, las puntuaciones medias de eritema disminuyeron en un 30% en ambos sitios tratados con el polisacárido y disminuyeron un 13% en el sitio no tratado. En la evaluación de 96 horas, las puntuaciones medias de eritema disminuyeron en un 40% en ambos sitios tratados con el polisacárido y disminuyeron un 22% en el sitio no tratado. No se observó edema en ningún momento en ningún sitio.

Tabla 21: Superóxido dismutasas
Número de acceso de Genbank

CAA42737
CAA43859
AAA29934
BAA02655
NP_ 625295
AH004200
CAC14367
YP_ 001003721
ABM60577
CAM08755
YP 966270
YP 963716
ABM37237
ABM35060
ABM33234
ABM33141
NP_ 407488
NP_ 405922
YP_ 932026
ZP 01641300
ZP 01638301
ZP 01637188
EAX24391
EAX23794
EAX23720
EAX23627
EAX20859
EAX19390
EAX16596
CAL93139
YP_ 914326
YP_ 747424
AB 159459
ZP_ 01610569
ZP 01605216
ZP 01600343
ZP 01584712
ZP_ 01581863
ZP_ 01581157
ZP_ 01575777

Número de acceso de Genbank

ZP_ 01569848

ZP_ 01559998

EAU01367

EAU01065

EAV97274

EAV95856

EAV80568

EAV73624

EAV73531

EAV70130

EAV66456

EAV61854

ZP_ 01532079

ZP_ 01516088

EAV26209

YP_845889

YP_822355

YP_843115

YP_S36186

ABK17454

Tabla 22: Betacarotenohidroxilasas

Número de acceso de Genbank

NP_ 682690

YP_172377

NP_440788

YP_475340

YP_475340

BAB75708

ZP_ 01084736

ZP_ 01080915

ZP_ 01123496

ABB27016

NP_ 895643

NP_ 896386

ABB34062

YP_292794

AAP99312

ZP_01006041

ABB49299

NP_ 848964

Número de acceso de Genbank

ZP_01040435

NP_049051

YP_457405

AAT38625

Listado de secuencias

5 SEQ ID NO 1: RBCS2 Chlamydomonas reinhardtii

cgcttagaagatttcgataaggcgccagaaggagcgcagccaaaccaggatgatgtttgatggggtatttgacacttgcaacccttat
ccggaagccccctggcccaaaaggctaggcgccaatgcaagcagttcgatgcagccccctggagcgggtgcccctctgataaacc
ggccagggggcctatgttctttactttttacaagagaagtcactcaacatcttaaacgggtcttaagaagtctatccgg

10 SEQ ID NO 2: β -2 tubulina Chlamydomonas reinhardtii

Ctttcttgcgctatgacacttcagcaaaaaggtagggcgggctgcgagacgggtcccggcgctgcagcaacaccgatgatgcttcg
acccccgaagctccttcggggctgcagggcgctccgatgccgctccagggcgagcgtgtttaaatagccaggcccccgattgca
aagacattatagcgagctacaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgatcgactcc
gctaagggggcgctcttctcttctgtttcagtcacaccccgcaaac

15 SEQ ID NO 3: promotor del virus Chlorella #1

cggggatcgagggcatgggcattaaaagaactttatggaatcaaaaatcttagtgaattccaccacaggtatatagtcttcaggacgc
taacgatgatatcaacgattgatcaaaagggtatcggttgaggcactcatatcaggtagtttctacacagaaactgaacaacgcctggga
aaagatcctgagcatagtaacttatatactagcagatgttgtaacgatgctttatataatgaattagcacaacgacaactacaaaaac
aactgatgaattgacgaagatgggtatgatttttcaggcacgtataatacattagatccgtcgacctgcagccaagctt

20 SEQ ID NO 4: promotor del virus Chlorella #2

cccggggatcatcgaaagcaactgccgcattcgaaacttcgactgcctcgttataaagggttagtgaaagccattgtatgttattactgagt
tatttaatttagcttgcttaaatgcttatcgtgttgatataataatgacaaatgatacgtgtatcaacatctcaaaagattaatacgaagatc
cgtcgacctgcagccaagctt

25 SEQ ID NO 5: promotor del virus Chlorella #3

cccggggatctgcgtattgcgggacttttgacattttccagaacggattgccgggacgtatactgaacctccagtcctttgctcgtcgt
atttccataatatacatatacactattttaattattacaccgggttggtgctgagtgatacaatgcaaatccctccaccgaggaggtatcgcg
aactgtccaaatgtcttcttctgcagctccatacggagtcgttaggaacattcacttaattataggatccgtcgacctgcagccaagctt

30 SEQ ID NO 6: promotor de la subunidad beta de ficoeritrina Rhodella reticulata de AF114823

ttttatagatcatccaattatttttcattagatattgtatatcaataatttggcatatgtttttagtatacgggttatgatattgcaatatatgtac
aacatttgtaatttttgacttacatataatcaattatcaatgacaatgtaatatattggttgatagatcaataaacatcttaataagatctg
tfaaaattcaaatatagactttctgtattataagtagttttcttatattactatagacgtagaacgatcaaaaaaaaaataaatatggacatgactt
gattcaatatggaagacggggtatgagaaatcgtgttgactcaatatagaattgacgtatttttaatagcagtgcctgttatattgctg
aacaaagattaaaagtattatataataactagtagaccagcaaatataaaattatgctgaaacaataataccctttaagtttaagg
agccttttc

SEQ ID NO 7: promotor AHAS de *Porphyridium* de AJ224709

attatttaacaattggaacttagttaattagggtaaattatattaacccttatgaacccaaataatttgggttcaaaaaaactaacttatgaat
taaaattgaaatattttctacatcataataattttaattctaaatagaatttagataaggatctaagataacaaaaaaatcaatttaagtaata
aagaaatgtgattacaaaattttgatattaaactatagatttacaaattattatcaaaaattacttatccatttgaggaaaagactgaacctt
taacatatttgttatgcgatttagatcatcaagtagcgagctgtatgaaatgaaagttagtatacagttcttaagtagagatgtatatat
gttaatagaaatattttgcatcgactataatcaattctgaagacttcaaaaataaaacctgttatcgtgtatactagagatggttgatgaa
ataaatcaaccaggtattattacagactgaactgaactaaaaaaattcatataatttagcgtact

SEQ ID NO 8: promotor pca2 de la anhidrasa carbónica AB040136 de *Porphyridium purpureum*

5 gaaaagactggtgcaggagaggattttgcaggagaggaaggagagggagagggcgtgtcgtgcttgcactgcgatagtcacc

SEQ ID NO 9: promotor de peal anhidrasa carbónica AB040135 de *Porphyridium purpureum*

10

SEQ ID NO 10: resistencia a sulfometurón - acetohidroxiácido sintasa [*Porphyridium* sp.]

15 SEQ ID NO 11: proteína ble resistente a la zeocina

CH 100

20

CONCLUSIONS

SEQ ID NO 13: Superóxido Dismutasa de NP_000445

10

SEQ ID NO 14: fusión de la proteína de unión superóxido dismutasa-polisacárido AAV48590-NP_000445

marmvvaavavmavlsvalaqfipdvdtwkvpmtiltvqnlsiftgpnqfgrgipspsaigggngldivggggslyisptggqv
qysrgsnfnqvafrvrknngnesdfatvfvvggttspfvivgdstenevswttnkvvnssqgfppngnsaggnsqytfvng
itgtagapvggtvirqvsawreifntagncvksfglvvrgrtnqglvqgveydyvaidnsngsfaisgyspavnnapgfknfaa
artgnffavssesgvi vmsipvdnagctlsfsvayititpgagrsvgsiaqdnefyaaavgipgagpgevriyrlldgggattlvqtlsp
pddipelpivanqrfgemvrfgansetnyvavgspgyaaeglaifytaepgltpndpdeglltllaysnsseipangglgefntasn
crqfvfgepsvds vvtflasigayyedictcerenifdqgimfpvpnpfgespttcrssiye frnclmegapsictyserptyewte
evvdpdntpcelvsriqrrlsqsnfcqdyvtlqvvgagagmatkavcvlkgdgpvqgiinfeqkesngpvkvwgsikglteglh
ghfhvhefgdntagtsagphfnplsrkhggpkdeerhvgdlgnvtadkdgvadvsiedsvislsgdhciigrtlvvhekaddlgk
ggneestktgnagsrlacgvigiaq

5 SEQ ID NO 15: Proteína asociada con polisacárido de *Porphyridium* de AAV48590

marmvvaavavmavlsvalaqfipdvdtwkvpmtiltvqnlsiftgpnqfgrgipspsaigggngldivggggslyisptggqv
qysrgsnfnqvafrvrknngnesdfatvfvvggttspfvivgdstenevswttnkvvnssqgfppngnsaggnsqytfvng
itgtagapvggtvirqvsawreifntagncvksfglvvrgrtnqglvqgveydyvaidnsngsfaisgyspavnnapgfknfaa
artgnffavssesgvi vmsipvdnagctlsfsvayititpgagrsvgsiaqdnefyaaavgipgagpgevriyrlldgggattlvqtlsp
pddipelpivanqrfgemvrfgansetnyvavgspgyaaeglaifytaepgltpndpdeglltllaysnsseipangglgefntasn
crqfvfgepsvds vvtflasigayyedictcerenifdqgimfpvpnpfgespttcrssiye frnclmegapsictyserptyewte
evvdpdntpcelvsriqrrlsqsnfcqdyvtlqv

SEQ ID NO: 16 Promotor RBCS2 de *Chlamydomonas reinhardtii*

10

Gccagaaggagcgcagccaaaccaggatgatgtttgatggggtatttgagcacttgcaacccttatccggaagccccctggccaca
aaggctaggcgccaatgcaagcagttcgcatgcagccctggagcgggtgccctcctgataaacggccagggggcctatgttctta
ctttttacaagagaagtcactcaacatcttaa

SEQ ID NO 17 Fusión de proteína de unión a superóxido dismutasa-polisacárido AAV48590-NP_000445

matkavcvlkgdgpvqgiinfeqkesngpvkvwgsikglteglhghfhvhefgdntagtsagphfnplsrkhggpkdeerhvg
dlgnvtadkdgvadvsiedsvislsgdhciigrtlvvhekaddlgkggneestktgnagsrlacgvigiaq marmvvaavavma
vlsvalaqfipdvdtwkvpmtiltvqnlsiftgpnqfgrgipspsaigggngldivggggslyisptggqvqysrgsnfnqvafr
vrknngnesdfatvfvvggttspfvivgdstenevswttnkvvnssqgfppngnsaggnsqytfvngitgtagapvggtvirq
vsawreifntagncvksfglvvrgrtnqglvqgveydyvaidnsngsfaisgyspavnnapgfknfaaartgnffavssesgvi
vmsipvdnagctlsfsvayititpgagrsvgsiaqdnefyaaavgipgagpgevriyrlldgggattlvqtlspddipelpivanqr
gemvrfgansetnyvavgspgyaaeglaifytaepgltpndpdeglltllaysnsseipangglgefntasn crqfvfgepsvds
vvtflasigayyedictcerenifdqgimfpvpnpfgespttcrssiye frnclmegapsictyserptyewte evvdpdntpcel
vsriqrrlsqsnfcqdyvtlqv

15

SEQ ID NO 18: Zeaxantina epoxidasa de AAO34404

mlastytpcgvrqvagrtvavpsslvapvavarslglapyvpvcepsaalpacqpsgrrhvqtaatlradnpssvaqlvhqngk
gmkviiagagigglvavallkqgfqvqverdltairgegkyrgpiqvsnalaaleaidpevaaevlregcitgdringlcdglg
ewyvkfdtthpavskglpvtvisrltlqqilakaveryggpgtiqngcnvtefterndttgnnevtvqledgrtfaadvlgadgi
wskirkqligetkanysgtyctygtisdfpadidivgyrvflgnqgyfvsdvngknqwygfhkepsggtdpegsrkarlqif
ghwvndnvvdlkatpeedvlrddifdrppi ftwskgrvallgdsahamqpnlgqggcmaiedayelaidlsravsdkagnaaav
dvegvlrsyqdsriilrvsaihgmagmaafmastykcyllgegwskwvveglriphgrvgrlvmlttmpsvlewvlggntdhv
aphrtsycslgdkpkafpesrfpfe mnnndasiirsshadwllvaerdaataaaanvnaatgssaaaaaadvnsscqcckgiymad
saalvgrcgatsrpalavddvhvaeshaqvvr glaglpssssastaaasasaasastatlgsssegylrdlsgsgrgtwvngk
rlpdgatvqlwpgdavefgrhpshevfkvkmqhvtlrsdelsgqayttlmvgkirndyvmpesrpdggsqppgrlvta

20

SEQ ID NO 19: licopeno épsilon ciclasa de BAA97033

mecvgarnfaamavstfpswscrrkfpvkvksymirfglcsvrasggsgssescvavredfadeedfvkaggseilfvqm
qnkdmdeqsklvdklppisigdgaldlvviagcpaglaaesaaklglkvgligpdlpftnnygvwedefndlgkciehv
tivyldddkipitigraygrvsrrllheellrrcvesgvssylsskvsitesadglrvacddnnvipcrlatvasgaasgkllqyevg
rvvcqtaygveevenspydpdqmvfmdyrdytnekvrsleaeypftlyampmtksrlffeetclaskdvmpfdlltklmlrl
dtlgrilrkyeeewsyipvggslpnteqknlafgaaasmvhpattgysvvrslseapkyasviaeilreettkqinsnisr
qawdtlw pperkrqrafflfglalivqfdtegrsffrtffrlpkwmwqgflgstltsgdlvlfalymfvispnnlrk
glinhlisdptgatmiktylk
v

5 SEQ ID NO 20: promotor *Porphyra* EF1

aagcttcgctgccaggctctccatcagcgacttgcggctgctgttggggaccggcgggaagcgcaccagaatgtgggggagacaggca
gggctcagagacacgagtgagagcattgalcagtaacagtcgcacgtcagactgggtctgctggggccacgaaagcgcaaaatgggccta
gcaggcggcgtcaaccttctcaagctcagagcgccgccaggctgcacacccccgagggcgcggccagtagcacctgcggcacggaagacacgg
tctcctgtaacatacgggtgttcgtccgccatcgagaacagctaggtacagaataccacgagggaagggaagaaaagccttgaatggcaaaagggt

ggctgaaggcaagccagagaggggacgttctacatgcaccaaagccagtaggagcgcactacgcggtaagcggctgccgaaagggggggg
gaccacgctcgtcactgcagggtgtattgtccgggtccgcaactgccactggcggtgtttgtcaagcgccaccacgagctcgcagggtcagca
attgcaccgctggcagcgagaatgtggccttccccgaggtttacagtggtcctttccccgaaagcatccctaaaaaagggaattgagcgacggcga
cgccgaccgacgtccgcggcgccgacagggagggacggaggaccacggccttttaaatggcgctcgaagaccacgtgctcggcaca
ccaccccgctgcacatcgctatcgtaaccggtcttccccggcgttgcagcttgcagttacgttgcacctagcctttcatc

10 SEQ ID NO 21: promotor de glicoproteína de *Porphyridium* sp.

cgtcattagcgaagcgtccgcttcacagcgttcgatggaggtggcagggacaatgatggaggcctcttcgcacctcagcgcggcatacacca
caaaaccaccgtctaaactcagaggagacgcgcctggcgacgttggatttcagggtcgcgtaccgcggcagggtcaaatggatcttaccgaccagt
tttctgttgcactgtagccgggtcaccgacttggcaggtctgtgtgttacagctgcagcagggcaagcgctggtggcgatcttcaaggttccg
gtccgatgcgcgtctcgcagaggcgcgaggaacgtgaaaggtctcgtccacacggccacgttgggctgtaggtcgaaactgacgaatgcgcttg
gtttcgtcccgccggtccgagcactgctggtcctccatcgcgagtcgaaagcgatacgtgccatccacttcatcggggtcacttctccacttcg
agcgtaaatatgaacgtatgcgagcagaggtgccaccgcacctcacttgcgtggtgtagcgcacattcgtcggccatgacgaggaagaga
gcaagacgacgtttccagccctgctcgcgacttgcgtcgcggacgacgcggacgccttgcgtcacactggaggagtttgggcgttggacgc
gcgcacgctggactctcgttccactagcaagccactcccgtcgcgacgagcgcggcgcgagcgcggccttccactctcactgcgcgacgag
gcggctcagtgagcgcgactcactggttaagcgtctcgcgtcatgacgcgcttgacgagcaccttgcgagtagccagccgacctctacccg
cgcatgccaaacctcactccagtgtctcgaagcaaccaogatgctcctccagtcgaatgcgacacgcgaccacgttcggcgcaacttttttc
caccgcagaaattggcgccgacgaagtacagctgaccgcaccaacgggtacagtcagcttgaactgccacttgcacttttgaactataaa
ataacgatacaaagggtggattaattatttcatttttcatgttccagatgtttcaagctctcatgcttgtgagtggttttggatgtgtagccgcaacccact
tgttccgggcaacgaaacagattgttgcgtggtggcggttgacgcggttgatgacaactggatgacgaaaccagtgcgcaagaaggggggg
gggggttaagtatagtgtgttagtcaacgaacggcgtgtgaatttaaatgctttgggggtgtagtcaaacgggtgtggtttacaaggcgtgccaagc
agcgggagtagacgcgtgtacgccggcgtttcaaaaggagacacgcgcgagcaaaaaatcacgaatcgggtggattttgcgtggtgcgttcgt
tgggggtgtgtgtggcgctggcggttggacacgcgtaacaaatgcaggctgttttactataaagtcggcgagaaagcggatggctggtgcggtgt
gatggcgcgacgacgccacgcagtgccctctatgaatcgagaggagatgcgaaaaaaaggggcggtctgggtataaagtgcgcgggcac
gtcgtaggtagcttaaatgctgtggggacgggtgaaaagagtgctgagtgaggtgtgtggacgaaagggaagggaaggagggaggtgggtggcg
ctgtagagaacacggctcgggtgcagtaacgaa

15

SEQ ID NO 22: fusión de glucoproteína y colágeno AAV48590-CAA34683

marmvvaavmavlsvalaqfipdvdtwkvpmtltvqnlsiftgnpqfgrgipspsaigggngldivggggslyisptggqv
qysrgsnfnqvastrvrknngnesdfatvfvvggttspfvvgdstenevswfwnnkvvvnsqgfippngnsaggnsqytfvng
itgtagapvggtvirqvsawreifntagnvcvksfglvvrgrtnqglvqgvdydgyvaidsngsfaisgyspavnnapfgknaaa
artgmffavssesgviymsipvdnagctlsfsvayitipgagrsvgsvlaqdnfyaavgipgagpggevriyrlidgggattlvqtlsp
pddipelpivanqrfgemvrfgansetnyvavgspgyaaeglaftytaepgltpndpdeglitlilaysnsseipangglgefntasn
crqfvfgepsvdsvvtfilasigayyedictcerenifdqgimfvpvnpfgespttcrssiyeifrncmegapsictyserptyewte
evvdpdntpcelvsriqrllsqsnfcqdyvtlqvvmirlgapqslvlltlvaavlrcoqgdvrrqpgpkgqkgepgdikdivgpkp
ppgpqgpageqgprgdrgdkgkgekgapgrgrdgepgtgnppppppppppglggnfaaqqmaggfdekaggaqlgv
mqgpmgpmgprgpppagapgpqfgqgnpegpegpegvsgpmgprgppppgpkpgddgeagkpgekagerppgpqg
argfpgtplpgvkgghrgypldgakgeagapgvkgesgspgengspgpmgprglpgergrtgpagaagargndgqpgpag
ppgpvpgagpgfpgapgakgeagptgarpegagqprgepgtpgspgpagasgnpgtdgipgakgsagapgiagapgfpg
prgpppgqgatgplgpkgqgtgepggiagfkgeqgpkgepgpagppqgapgpapeegkrgarpegpgvgpihppgergapnrg
fpgqdglagpkgapgergpsglagpkgangdpgprgepglpgargltgrpdagapqgkvgpsgapgedgrpgpppgqgar
qpgvmgfpgpkgangepgkakekgplpaghlrglpgkdgetgaagppgpapagergeqgapgpsgfglpgpppppgg
gkpgdqgvppgeagapglvgprgergfpgergspgaqlgprglpgtptgdgpkgasgpagppgaqgppglqgmpgergaa
giagpkgdrgdvgekgepegapgkdgggltgpihpppagangekgevpppgpagsagargapgergetpppgpagfagpp
gadgqpkgakgeqgeagqkgdagapgpqgpsgapgpqptgtvtpkpgargagqgppqgflpggaagrvpppgsnngpppg
ppgpsgkdgpkgargsdpppragepglgpagppgekgepgddgpsgaeqgflagqrvglpgqrgergfpglpg
psgepgkqgapgasgdrgppprvpppgltgpagepgrqgspgddgppgrdgaaagvkgdrgetgavagtpgppgspga
gptgkqgdrgaagaqgpmgpsgpagargiqgpqgprgdkggeagepgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpags
gprgppgpvgpskkgdangipgpihppprgrsgetgpagppgnppppppppgidmsafaglgpr

5 SEQ ID NO 23: fusión de glicoproteína-elastina AAV48590-NP 000492

marmvvaavvmavlsvalaqfpdvditwkvpmtiltvqnlsiftgnpqfgrgipspsaigggngldivggggslisptggqv
qysrgsnfngqvaftvrknngnesdfatvfvggttspfvivedstenevswfwnnkvvvnsqgfipnngnsaggnsqytfvng

itgtagapvggtvirqvsawreifntagncvksfglvrrgtgnqglvqgvaydgyvaidnsgsfaisgyspavnnapgfgnkfaa
artgnffavssesgvivmsipvdnagctlsfsvayitpgagrvgvsiaqdnefyaaavgipgagpggevriyrlgggattlvqtlsp
pddipelpivanqrfgemvrfgansetnyvavgspgyaaeglalfytaepltpndpdeglltlfaysnsseipangglgefntasn
crqvfgepsvdsvtflasigayyedictcerenifdqgimfpvpnpfgespttcrssiyeffnclmegapsictyserptyewte
evvdpdntpcelvsriqrslsqsnfcqdyvtlqvvmagltaaaprgvlllllsilhsprpggvpgaipggvpggvfyfpgaglgalg
ggalgpggkplkpvpvgglagaglgaglgafpavtffgalvpggvadaaaaykaakagaglggvpgvgglgvsagavvpqpga
gvkpgkvpvgvlpgvvpvgvlpgarfpgvgvlpvptgagvkpkapgvggafagipgvvgfpggpqgvplgypikapklp
ggylpyttgklpygygpggvagaagkagyptgtvgvpqaaaaaaakaaakfgagaagvlpgvggagvpgvpgaipgiggia
gvgtpaaaaaaaaaakaakygaaaglvpggpgfpgvgvgvpgagvpgvgvpgagipvvpagagipgaavpgvvspeaaaka
aakaakygarpgvgvggiptygvagaggfpgfvgvgggipgvagvpsvggvpgvggvpgvgispcaaaaaaakaakygvgt
paaaaaakaakaqaqfglvpvgvapgvgvapgvgvapgvgglapgvvapgvgvapgvgvapgvgpggvaakaakaakva
akaqlraaaglgagipglvgvgvpglgvgagvpglgvgagvpgfagadegvrrslspelregdpssqhlpstpsprvpgal
aaakaakygaavpgvlgglgalgvgvgipggvvgagpaaaaaaakaakaqaqfglvgaaglgglvgglgvpgvgglggippa
aaakaakygaaglgvlggagqfplggvaarpgfelpifpggaclgkacgrkrk

10

SEQ ID NO: 24: gen de resistencia a zeocina

atggccaaagttgaccagtgccgttccgggtgctcaccgcgcgcgacgtcgccggagcggtcagattctggaccgaccggctcggtt
ctcccgggacttcgtggaggacgacttcgccggtgtggtccgggacgacgtgaccctgttcacagcgggtccaggaccaggtggt
gccggacaacaccttgccctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtacgccgagtggtcggaggtcgtgtccacgaattcc
gggacgcctccgggccgccatgaccgagatcggcgagcagccgtgggggcgggagttcgccctgcgcgacccggccggcaa
ctgcgtgcacttcgtggccgaggagcaggactga

15

SEQ ID NO: 25 Proteína GLUT1 humana en codones de *Porphyridium*

atggagccgagcagcaagaagctgaccggccgctgatgctggcgggtggcggcgggttctgggcagcctccagttcggctacaa
caccggcgtgattaacgccccacagaaggtgatcgaggagttctacaaccagacctgggtccaccgctacggcgagagcattctgc
cgaccaccctgaccacgctgtggagcctgagcgtggcgattttcagcgtggcgggcatgattggcagcttctcggtggcctgttctgt
gaaccgcttcggccgcccgaacagcatgctgatgatgaacctgctggccttctgtcggcggtgctgatgggcttcagcaagctggg
caagagcttcgagatgctgattctggcgcccttcattattggcgtgtactcggcctgaccaccggcttctgcccgatgtacgtggcg
aggtgtcggcaacggcgttccggcgcgctgggcacccctccatcagctgggcattgtgtgggcattctgattgccaggtgttcgg
cctggacagcattatgggcaacaaggacctgtggccgctgctgctgctgattatttccatccggcgctgctocagtgattgtgctgcc
gttctgccagagagcccacgcttctgctgattaaccgcaacgaggagaaacggcggaagagcgtgctgaagaagctgcgcggc
acggcgggacgttaccacgacctccaggagatgaaggaggagagccggcagatgatgcgcgagaagaaggtgaccattctggag
ctgttcgctgccagcgtaccgccagccgattctgctgcctgtggtgctccagctgtccagcagctgtcgggcattaacgccgtgtt
ctactacagcaccagcattttcgagaaggcggcggtcca gacgccagtgatgccaccattggcagcggcattgtgaacaccgcctt
caccgtggtgctgctgttctgtggtgagcgcgcggggccgcccacgctccatctgattggcctggcgggcatggcggggtgcgcgat
tctgatgaccattgccctggcgtgctggaagcagctgccgtggatgagctacctgagcattgtggcgatcttcggcttcgtggcggttctt
cgaggttggcccaggcccattccgtggttcattgtggcgagctgttcagccaggggcccacgccagcggcgattgccgttgccgg
cttctcgaactggaccagcaacttcattgtggcgatgtgttccagctacgtcgagcagctgtcggccccgtacgtgttcattatcttacc
gtgctgctggtctcttcttcttccactactcaaggtgcccggagaccaagggccgcaccttcgacgagattgccagcggcttcgcg
caggcgggcgccagccagagcgacaagaccccgaggagctgttccatccactgggcgccgacgccaggtgtaa

5 SEQ ID NO: 26 GCCAAGTTGACCAAGTGCCGTTCCGGTG

SEQ ID NO: 27 CGGCTGCTCGCCGATCTCGGTCATGG

SEQ ID NO: 28 ATACGCGAGTCGAAAGC

10

SEQ ID NO: 29 ACAGCGCTGTACTCCC

SEQ ID NO: 30 TGCTGATGATGAACCTGCTGGCC

15

SEQ ID NO: 31 AGCACAATGCACTGGAGCAGCG

SEQ ID NO: 32 CMV 3' UTR

tttctccataataatgtgtgagtagtccagataaggggaattaggggttcctataggggttcgctcatgtgttgagcatataagaaacctta
gtatgtattgtattgtataaatacttctatcaataaaatttctaattcctaaaacccaaatccagtactaaaatccagatccccgaatta

20

SEQ ID NO: 33 Cyanidioschyzon merolae transportador Na⁺/glucosa c05f0001

mastapantavalntldwvlvivysálvialwlrksragsgtqskpasemfflagrsttffavgaslfmsnigsehfialaaagatsgiavasf
ewmasifvgvvlgrvfapfyrlnslhtvpkflerlyaaagarryhalatimmailtkvsatlysgailrvllgwpvwfslmilvittlytslgglrav
iwtevlqafvllagglalavrsllqavgsllaglsellaqnrrqmldllqwpsttpwveypwpgiifglpalevfycwtdqvvvqrvlsakseah
arggsllcgflktlvpfmmvipglcafilfpevaanpnqayptavarilphgllgmvmsamlaalmsslstfnststvvvydfvieccglrslsd
ktlrvllgrianivlcaflawipivegmgeelyfyiqsvisyiappiavvfvgiawrrratatgalctllvggalglvrvfvevalrlahreaplgalg
kiffqsnflyfaifswvfsslllvtvslfteppseqqlglfqeagasgshvrtagnqigeasskqvvgasryvadeppssdpaarqqtleiesfs
gtensdeafsvdpehtapsmkrrvasrdtllageaasqepflspqgefssaaqetfssaaapsrltsaaldvlsvvlvaeilafyiqfr

25

SEQ ID NO: 34 Cyanidioschyzon merolae arabinosa permeasa CMK066C

metvtvrwkrflstfgarpcllscllggllfyghlavfstvtffrsfqdwfgswpsgeqvlgsyfvgaavgcllyqrvlpflahagtaawrrylwl
rwssvffclsglplfikrermrltgrfqmgafvlilhrliligagivnvlgpalclevapstsrgefvllyqlaitigilmanlvnlatghedvhrq
dpvagagidmrgnflrplyrplvpailmcigllryqssmgvsayrdatadmltqkpmssqrkerekhsrmvasaralrpdacaghsfnvis
rpslqneslslkdesfamyavlargssptarsasvlllrdprijicmilqlqltginvvlvygvqileqvqssamgssrrlarlsgplygavl
lsvmnviatlvavgiidrtcrkllyfstpvlaachlalaratraengsssvafigflalmfvaavfavshgplavlvanelfsparasansigmvv
navattavsigfpllqrelfigiagtfiffalilmggyewlwrylpetrqtsadss

SEQ ID NO: 35 Galdieria sulphuraria myo-inositol transportador EAL84263

mvekssdpevpshhessisiekqgdaatarewaqdvnstntklknplagltreqllndveafakekdlehlldlrkgalvaqdprefeq
mdaltesekellrrekthrwspqfmmyfntsessrypptefgfnpacqssvldllscrewirllstvrssmyssithlsyakqsrifyfaefnvt
wmqgllngapylcsavigcwtaplwrwfgrrgcifiscfissfswmaahtwvwnlllgrfllgfvagksttpvygaecspanirgalvm
mwqmwtafgimlgyiasvafmdvthptipgfnwrlmlgstaippffvciqvvyfcpsprwymmrnyhdaykalckfrpstfqaadly
yihaalkveeklregkhlfremftipmrnaaqssffvmfmqfcgvnaimyysmfreagfdtrmalitslgcgitnwifalpaavytidtfggr
nllltfplmciflltfgsfyidpqrtaacvatgiylfmivyspggeppvftysaeafplyirdigmsfatattwgfntfvsllwpslnksftptgaf
gwyaawnffgwifcyfclpetkalsleeldqvsvpttkhvnhyramlpwyvkkylrrdvppqnqlydy

5 SEQ ID NO: 36 promotor de glp – fusión de glp-SOD -CMV 3'UTR

cgtcattagcgaagcgtccgcgttcacagcgttcgatggaggtggcagggaacaatgatggaggcctcttcgcacctcagcgcggcatacacca
caaaaccacgcttaactcagaggacagcgcctggcgacgttgatttcagggtcgcgtaccgcgcaggtcaaatggatcttaccgaccagt
ttttcgttgctactgtagccgcgggtcaccgactttgccgagctctgtgtgtgtagcagctgcagcacggcaagcgtggtggcgtatctcaaatgttcg
gtccgatgagcgtctcgacaggcgcgcgaagcgtgaaggtctcgttcacacggccacgttggggtgatggtcgaaactgacgaatgcgcttg
gtttcgtccccgggcccgtccgagcactgctggtctccatacgcgagctgaagcgatacgtgccatccactttcatcggggtcactttccacttcg
agcgtaaatatgaacgtatgcgagcagaggtgccaccgcacacgttcgtgcccgtgtcgcacgccattcgtcgccatgacgagggaagaga
gcaagacgacgtttccagccctgctcgcgacttgctctgcgcgacgacgcgcgacgcctgcgtcacactggaggtggttggcgttggacgc
gcgcacgtggactctcgttcactagcaagccactcccgtcgcgatcgagcgacggcgagcgagcccttcactctcactgcgcgacgag
gcgggtcgagtcgagcgactcacctggcttaagcgtctcgtcgtcatgagcgcttgacgagcaccttgagtagccagccgacactctaccg
cgcatgccaacctcaactcagtgctcgcgaagcaaccagatgctccttccagtcgaatgcgacacgcgaccacgttcgccgcgaacttttttc
caccgcagaaattggcgcgagcgaagtacagctgacccgcaccaacgggtacagtcagcttgaactgccacttcgacttttgaactgataaaa
ataacgatacaaaaggtggattaatttttcaatttttcatgttccagatgtttcaagctctcatgcttctgtgagtggttttggatgtgtagccggcaaccctact
tgttcgggcaacgaacagattgttcgtgcgggtggcgcggttgacgcggttgatgacaactggatgacgaaaaccagtgccgaagaagggggg
gggggttaagtatagtgtgttttagtcaacgaacggcgtgtgaatttaaatgctttggggtgtagtcaaacgggtgtgtgtttacaaggcgtgccaagc
agcgggagtagacagcgtgtacgccgccgatttcaaaaaggagacacgcgcgagcaaaaaatcacgaatcgggtggttttgcgtggtgcgttcgt
tggggtgtgtgtgtggtgcgtggttgacacgcgtaacaaatgcaggctgttttactataaagtcgggcgagaagcggatggctgggtgcggtgt
gatggcgcgacgacgccagcagtgccctctatgcaatcgagagggagatgcgaaaaaaaggggcggtctggtataaagtgcgcgggcac
gtcgtaggtacttaaatgctgtggggacggtgaaaagagtgctgagtgagtggtgtgtggacgaaaggagaggggaagagggagtggtggccg
ctgtagagaacacggtcgggtgcagtaacgaaATGGCCCGCATGGTGGTGGCCGCCGTGGCCGTGATG
GCCGTGCTGTGCGGTGGCCCTGGCCCAGTTTCATTCCGGACGTGGACATTACGTGGA
AGGTGCCGATGACGCTGACGGTGCAGAACCTGTTCGATTTTCACGGGCCCCGAACC
AGTTCGGCCGCGGCATTCCGTGCGCGTCCGCCATTGGCGGCGGCAACGGCCTGG
ACATTGTGGGCGGCGGCGGCTCGCTGTACATTTCCGCCGACGGGCGGCCAGGTGC
AGTACTCGCGCGGCTCGAACAACTTCGGCAACCAGGTGGCCTTCACGCGCGTGC
GCAAGAACGGCAACAACGAGTCGGACTTCGCCACGCTGTTTCGTGGGCGGCACGA
CGCCGTCTGTTTCGTGATTGTGGGCGACTCGACGGAGAACGAGGTGTCGTTCTGGAC
GAACAACAAGGTGGTGGTGAACCTCGCAGGGCTTCATTCCGCCGAACGGCAACTC

GGCCGGCGGCAACTCGCAGTACACGTTTCGTGAACGGCATTACGGGCACGGCCGG
CGCCCCGGTGGGCGGCACGGTGATTCGCCAGGTGTCGGCCTGGCGCGAGATTTTC
AACACGGCCGGCAACTGCGTGAAGTCGTTTCGGCCTGGTGGTGCGCGGCACGGGC
AACCAGGGCCTGGTGCAGGGCGTGGAGTACGACGGCTACGTGGCCATTGACTCG
AACGGCTCGTTTCGCCATTTTCGGGCTACTCGCCGGCCGTGAACAACGCCCCGGGCT
TCGGCAAGAACTTCGCCGCCGCCGCACGGGCAACTTCTTCGCCGTGTCGTGCGA
GTCGGGCGTGATTGTGATGTCGATTCCGGTGGACAACGCCGGCTGCACGCTGTCG
TTCTCGGTGGCCTACACGATTACGCCGGGCGCCGGCCGCGTGTGCGGCGTGTCG
TGGCCCAGGACAACGAGTTCTACGCCGCCGTGGGCATTCCGGGCGCCGGCCCCGG
GCGAGGTGCGCATTTACCGCCTGGACGGCGGGCGGCCACGACGCTGGTGCAGA
CGCTGTCGCCGCCGGACGACATTCCGGAGCTGCCGATTGTGGCCAACCAGCGCTT
CGGCGAGATGGTGCCTTCGGCGCCAACCTCGGAGACGAACTACGTGGCCGTGGG
CTCGCCGGGCTACGCCGCCGAGGGCCTGGCCCTGTTCTACACGGCCGAGCCGGG
CCTGACGCCGAACGACCCGGACGAGGGCCTGCTGACGCTGCTGGCCTACTCGAA
CTCGTTCGGAGATTCCGGCCAACGGCGGCCTGGGCGAGTTCATGACGGCCTCGAA
CTGCCGCCAGTTTCGTGTTTCGGCGAGCCGTGCGGTGGACTCGGTGGTGACGTTCTG
GCCTCGATTGGCGCCTACTACGAGGACTACTGCACGTGCGAGCGCGAGAACATTT
TCGACCAGGGCATTATGTTCCCGGTGCCGAACCTTCCCGGGCGAGTCCCGGACGAC
GTGCCGCTCGTCGATTTACGAGTTCCGCTTCAACTGCCTGATGGAGGGCGCCCCG
TCGATTTGCACGTACTCGGAGCGCCCGACGTACGAGTGGACGGAGGAGGTGGTG
GACCCGGACAACACGCCGTGCGAGCTGGTGTGCGCGATTACGCGCCGCCTGTG
CAGTCGAACTGCTTCCAGGACTACGTGACGCTGCAGGTGGTGGGCGCCGGCGCC
GGCATGGCCACGAAGGCCGTGTGCGTGCTGAAGGGCGACGGCCCGGTGCAGGGC
ATTATTAACCTTCGAGCAGAAGGAGTCGAACGGCCCGGTGAAGGTGTGGGGCTCG
ATTAAGGGCCTGACGGAGGGCCTGCACGGCTTCCACGTGCACGAGTTCGGCGAC
AACACGGCCCGGTGCACGTGCGCCGGCCCGCACTTCAACCCGCTGTGCGCAAG
CACGGCGGCCCGAAGGACGAGGAGCGCCACGTGGGCGACCTGGGCAACGTGAC
GGCCGACAAGGACGGCGTGGCCGACGTGTGATTGAGGACTCGGTGATTTTCGT
GTGCGGCGACACTGCATTATTGGCCGCACGCTGGTGGTGCACGAGAAGGCCGA
CGACCTGGGCAAGGGCGGCAACGAGGAGTCGACGAAGACGGGCAACGCCGGCT
CGCGCCTGGCCTGCGGCGTGATTGGCATTGCCAGTAAtttccataataatgtgtgagtagtccc
agataagggaattagggttcctatagggttcgctcatgtgtgagcatataagaaaccctagtatgtattgtatgttaaatacttctatc
aataaaatttctaattcctaaaacaaatccagtactaaatccagatccccgaatta

SEQ ID NO: 37 ADNc ble con pequeñas regiones flanqueantes en ambos lados

atcagacaaggtgaggaactaaaccatggccaagttaccagtgcggttcgggtgctcaccgcgcgcgacgtcggcgagcggtcgagttctgg
accgaccgctcgggttctccgggacttcgtggaggacgacttcgccgtgtggtccgggacgacgtgaccctgttcacgagcggtccagg
accaggtggtgcgggacaacacctggcctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtacgccgagtggtcggaggtcgtgtccacgaactt
ccgggacgctccggcgccggccatgaccgagatcgccgagcagcgtggggcgagggttcgacctgcgcgacccggccggcaactgcgtg
cacttcgtggccgaggagcaggactgacacggacc

SEQ ID NO 38: transportador de hexosa de chlorella de Q39525 Parachlorella kessleri

maggaiwasgasrsseyqggltayvllvalvaacggmllgydngvtggvasmeqferkffpdvyeckkqivetspyctydnplqlfvssl
flagliscifsawitrnwgrkasmgiggiffiaagglvnafaqdiamlivgrvllgfgvlgsgvvpqylsevafshrgmlnigyqlfvtilgilia
glvnygvrnwdngwrlslglaavpigliillgaivlpespnflvekgtrtdqgrileklrgtshveafadivaaveiarpitmrqswrslftrmp
qltstfviqffqftginaifypvlfsslgssassaallntvvvgavnvgtstmiavllsdkgfrrfllieggitccamlaaigtlgvefgqygtedlp
hpvsagvlavicifiagfawsbgpmgwliipseifiletrpagtavavmgnflsfvigqafvsmcamkfvgflffagwlvimvlcaifllpet
kgvpiervqalyarhfwfkvmgpaaeiaedekrvaasqaimkeerisqtmk

SEQ ID NO 39: levadura hxt2 de Saccharomyces cerevisiae P23585

msefatsrvesgsqqtstihstpiqvketdespiqtksaynaelpakpiaaywtviclclmiafggfvfgwdtgtisgfvnqtdfkrrfgqmks
dgyylsdvrtglivgfnigcafggltlgrlgdmygrriglmcvvlviyivgiviqiassdkwyqyfigriisgmvggiavlspstlisetapkhir

gtcvsfyqlmitlglfgyctnygtkdysnsqvwrp lgl nfa faifmiagmlmvpesprflvekgyedakrslaksnkvtiedpsivaemdt
 imanveterlagnaswgelfsnkgailprvimgimiqslqqltgnnyffyygttifnavgmkd sfqtsivlgivnfastfvalytvdkgfgrkcll
 ggsasmaicfvfstvgvtslp ngkdqpsskaagnvmivftclffiffaiswapiayvivaesyplrvknramaiavganw iwgfligfft pfi
 tsaigfsygyvfmgclv fssffvffvcetkgltleevnem yvegvkpwksgswiskekrvsee

SEQ ID NO 40: GLUT1 humano de AAA52571 Homo sapiens

mepsskkl tgrlmlavggavlgslqfgyntgv inapqkvieefynqtwwhrygesilptlttlwslsvaifsvggmigsfsvglfvnrfgrrns
 mllmmnllafvsavlm gfsklgksfemlilgrfiigvycglttgfvpm yvevsptafrgalgtlhqlg ivvgiliaqvfgldsimgnkd lwp lll
 siiifipallqcivlpfc pesprfl linneenraks vllklrgtadvthdlqemkeesrqmmrek kvtilelfrspayrqpiliavvlqlsqqlsgina
 vfyystsifekagvqqpv yatigsgivntaftvvs lfvveragrtllhliglagmagcailmtialalleqlpwmsylsivaifgfva ffevgpgpi
 pwfivaelfsqgprpaaiavagfsnwt snfivgmcfqyveqlcgpyvf iiftvllv lffiftyfkvp etkgtrtfdeiasgfrqggasqsdktpeelf
 hplgadsqv

5

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un polisacárido de microalgas, producida la composición al:

a) aislar un polisacárido de microalgas;

b) secar el polisacárido aislado para formar una película que ha sido total o parcialmente insoluble en agua por calentamiento; y

c) homogeneizar la película para generar partículas, en donde las partículas aumentan de volumen al contacto con el agua en comparación con su volumen anhidro o parcialmente hidratado,

en donde la etapa b) se lleva a cabo mediante (i) calentamiento en dos partes en donde el segundo calentamiento es a una temperatura de 148°C a 160°C, o (ii) calentamiento a una temperatura de 135°C a 152°C.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde la etapa b) se lleva a cabo calentando en dos partes y la primera parte comprende calentamiento a una temperatura de 60°C a 100°C.

3. La composición de la reivindicación 1, en donde las partículas de polisacárido son menos de 70%, menos de 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, menos de 5% , o menos de 2% soluble en agua.

4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las partículas tienen un tamaño promedio de entre 400 y 0.1 micras.

5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las partículas se formulan con un aceite adecuado para administración tópica.

6. La composición de la reivindicación 5, en donde el aceite es ácido hexadecanoico.

7. La composición de la reivindicación 5, en donde el aceite está contenido en una emulsión.

8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polisacárido contiene una cantidad de azufre en peso de al menos 3%.

9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polisacárido está sustancialmente libre de proteína.

10. La composición de cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente ácido hialurónico.

11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polisacárido es producido por una microalga seleccionada de la Tabla 1.

12. Un método de fabricación de una composición, que comprende:

a) aislar un polisacárido de microalgas;

b) secar el polisacárido aislado hasta una película sólida que se ha hecho total o parcialmente insoluble en agua por calentamiento;

c) homogeneizar la película en partículas, en donde las partículas aumentan de volumen al contacto con agua en comparación con su volumen anhidro o parcialmente hidratado; y

d) formular las partículas en un material no acuoso,

en donde la etapa b) se lleva a cabo mediante (i) calentamiento en dos partes en donde el segundo calentamiento está a una temperatura de 148°C a 160°C, o (ii) calentamiento a una temperatura de 135°C a 152°C.

13. El método de la reivindicación 12, en donde la etapa b) se lleva a cabo calentando en dos partes y la primera parte comprende calentamiento a una temperatura de 60°C a 100°C.

14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde las partículas se formulan en la fase oleosa de una emulsión de aceite en agua.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde el polisacárido es producido por una microalga seleccionada de la Tabla 1.

5 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde las partículas se homogeneizan mediante molienda.

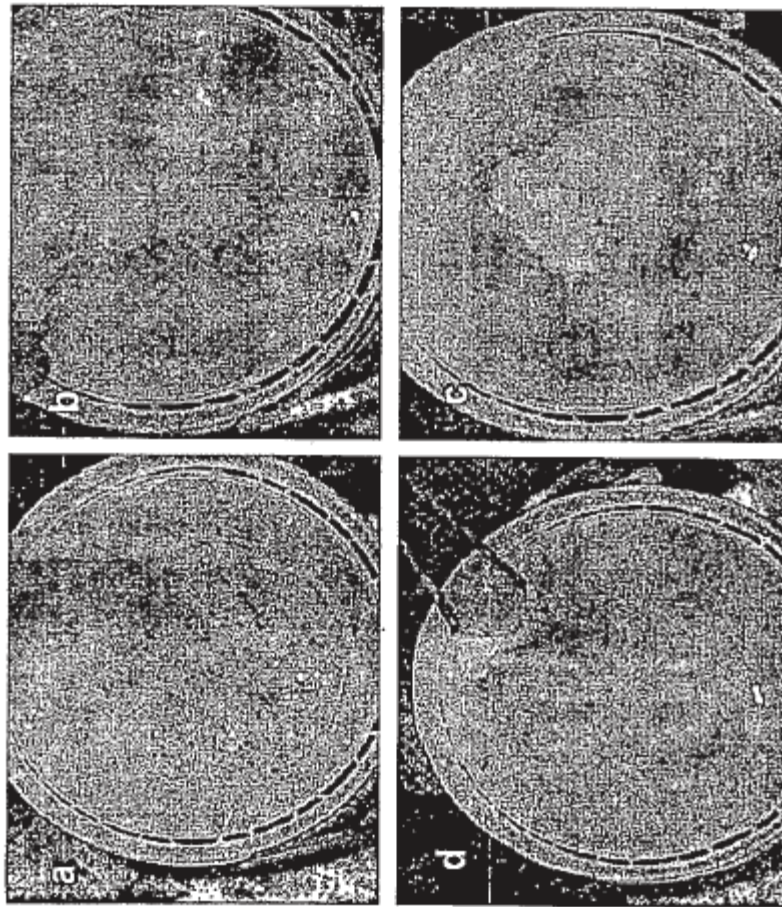
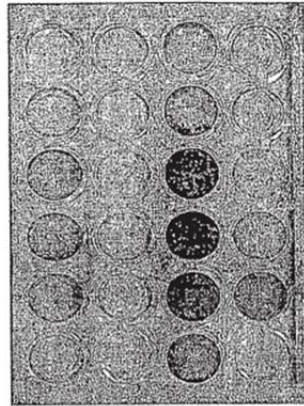


Figura 1

Figura 2

Crecimiento en luz

Porphyridium cruentum ATCC 1495 + 0.0% glycerol	Porphyridium cruentum ATCC 1495 + 0.1% glycerol	Porphyridium cruentum ATCC 1495 + 0.25% glycerol	Porphyridium cruentum ATCC 1495 + 0.5% glycerol	Porphyridium cruentum ATCC 1495 + 0.75% glycerol	Porphyridium cruentum ATCC 1495 + 1.0% glycerol
blanco	Porphyridium cruentum ATCC 1495 + 2.0% glycerol	Porphyridium cruentum ATCC 1495 + 3.0% glycerol	Porphyridium cruentum ATCC 1495 + 5.0% glycerol	Porphyridium cruentum ATCC 1495 + 7.0% glycerol	Porphyridium cruentum ATCC 1495 + 10.0% glycerol
Porphyridium sp. ATCC 1495 + 0.0% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 0.1% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 0.25% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 0.5% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 0.75% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 1.0% glycerol
blanco	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 2.0% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 3.0% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 5.0% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 7.0% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 10.0% glycerol



Porphyridium cruentum

Concentración de Glicerol	Recuento celular	% de cambio	Concentración de Glicerol	Recuento celular	% de cambio
0.00	6.0	0.0	0.00	15	0.0
0.10	6.0	0.0	0.10	15	0.0
0.25	8.0	25.0	0.25	20	25.0
0.50	6.8	11.8	0.50	24	37.5
0.75	4.3	-39.5	0.75	17	11.8
1.00	0.6	-900.0	1.00	6.5	-130.8
2.00	0.8	-650.0	2.00	12	-25.0
3.00	1.1	-445.5	3.00	0.6	-2400.0
5.00	1.1	-445.5	5.00	0.3	-4800.0
7.00	0.8	-850.0	7.00	0.4	-3650.0
10.00	0.8	-520.0	10.00	0.8	-1775.0

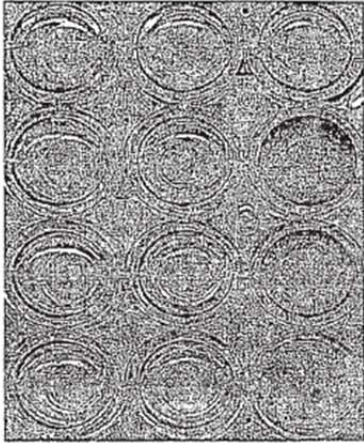
Porphyridium sp.

Concentración de Glicerol	Recuento celular	% de cambio	Concentración de Glicerol	Recuento celular	% de cambio
0.00	6.0	0.0	0.00	15	0.0
0.10	6.0	0.0	0.10	15	0.0
0.25	8.0	25.0	0.25	20	25.0
0.50	6.8	11.8	0.50	24	37.5
0.75	4.3	-39.5	0.75	17	11.8
1.00	0.6	-900.0	1.00	6.5	-130.8
2.00	0.8	-650.0	2.00	12	-25.0
3.00	1.1	-445.5	3.00	0.6	-2400.0
5.00	1.1	-445.5	5.00	0.3	-4800.0
7.00	0.8	-850.0	7.00	0.4	-3650.0
10.00	0.8	-520.0	10.00	0.8	-1775.0

Las concentraciones de glicerol en la tabla indica los medios ATCC 1495 complementados con el porcentaje dado de glicerol. Los recuentos celulares en la tabla son 10⁶ células/mL. El porcentaje de cambio fue calculado como la diferencia en el número de células/mL en una concentración de glicerol dada comparada al número de células/mL en una concentración de glicerol de cero.

Figura 3 **Crecimiento en Oscuro**

Porphyridium sp. ATCC 1495 + 0.0% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 0.1% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 0.25% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 0.5% glycerol
Porphyridium sp. ATCC 1495 + 0.75% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 1.0% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 2.0% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 3.0% glycerol
	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 5.0% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 7.0% glycerol	Porphyridium sp. ATCC 1495 + 10.0% glycerol



Concentración del inóculo = 1 x10⁶ células/mL

Concentración de Glicerol	Recuento celular (x10 ⁵ células/mL)	Cambio plegamiento	% de cambio
0.00		.900	-90.00
1.00	1.6	-0.840	-84.00
5.00	14.0	0.400	40.00
7.00	30.0	2.000	200.00
10.00	0.4	-0.960	-96.00

Figura 4

Experimento 1 de sonicación

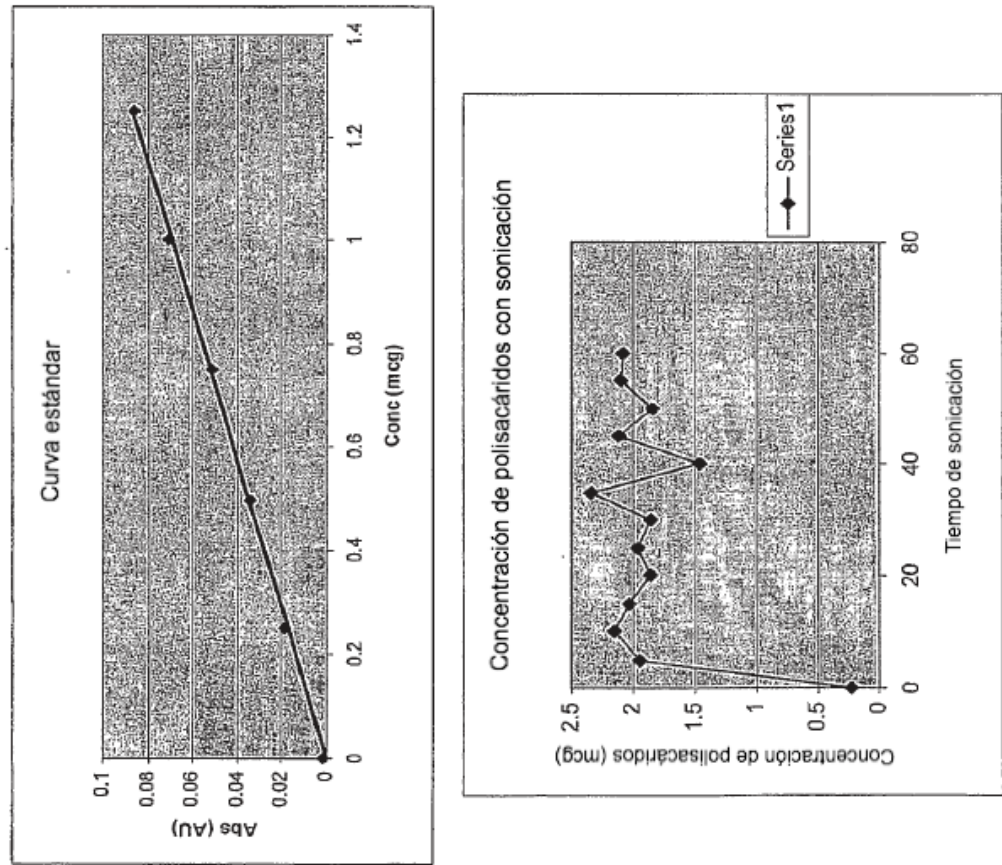


Figura 5

Experimento 2 de sonicación

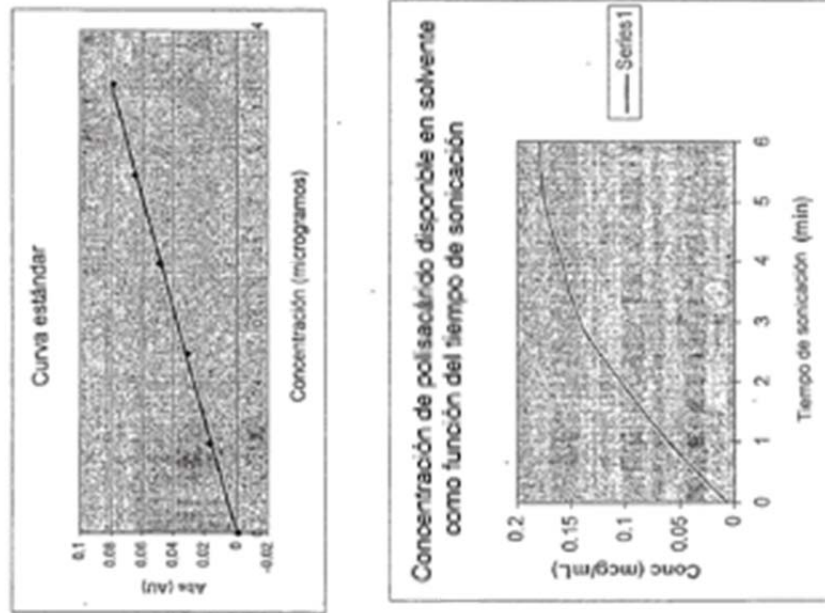
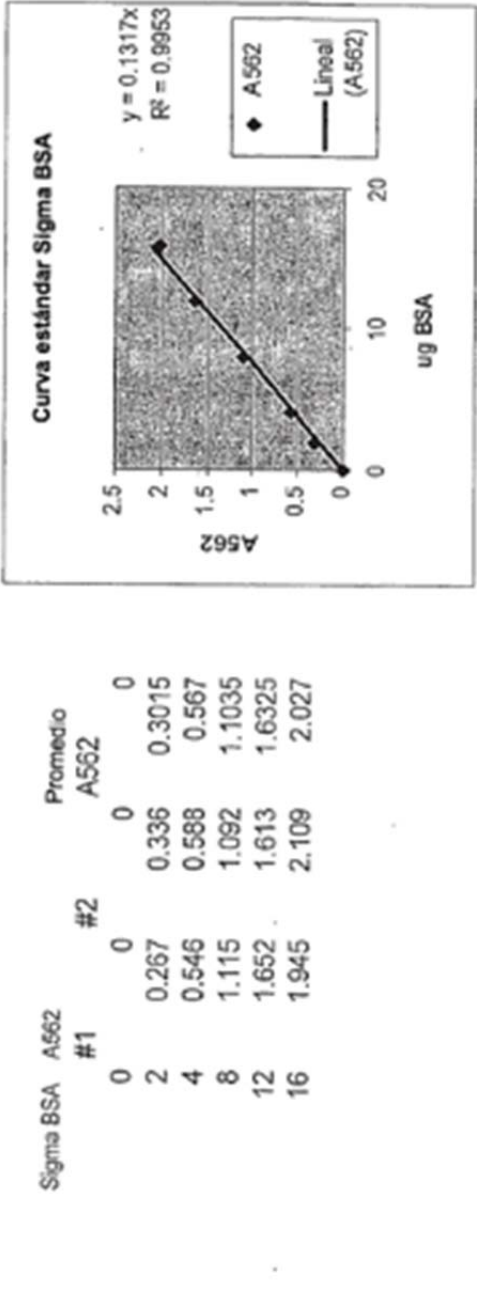


Figura 6

Proteasa tratada, en autoclave, Polisacárido filtrado TFF



Muestra	A562	Promedio	Proteína	Polisacárido
Iniciando	1L	0.073	(mg/ml)	(mg/ml)
Permeado	0.025	0.02533333	0.055429	0.15
Retenido	-0.018	-0.01366667	0.0192358	0.08

Figura 7

Molécula	% de biomasa seca	Especies	Referencia
Lípidos totales	10%	Porph. sp.	J. Applied Phycology 12:325-330 (2000)
Lípidos totales	6.53%	Porph. cruentum	Food Chemistry 70:345-353 (2000)
Ácido araquidónico C20:4	0.854%	Porph. sp.	J. Applied Phycology 12:325-330 (2000)
Ficoeritrina	2.02 g/100 g	Porph. cruentum	Food Chemistry 70:345-353 (2000)
Clorofila a	213 mg/100g	Porph. cruentum	Food Chemistry 70:345-353 (2000)
Carotenoides	102 mg/100 g	Porph. cruentum	Food Chemistry 70:345-353 (2000)
Ficocianina	262 mg/100 g	Porph. cruentum	Food Chemistry 70:345-353 (2000)
Ácido linoleico C18:2	0.45%	Porph. sp.	J. Applied Phycology 12:325-330 (2000)
Proteína	15%	Porph. sp.	J. Applied Phycology 12:325-330 (2000)

Figura 8

Porphyridium sp. (UTEX 637)

# de placa	zeocina ug/ml	crecimiento
1	0	++++
2	2.5	+
3	5	-
4	7	-
5	8	-

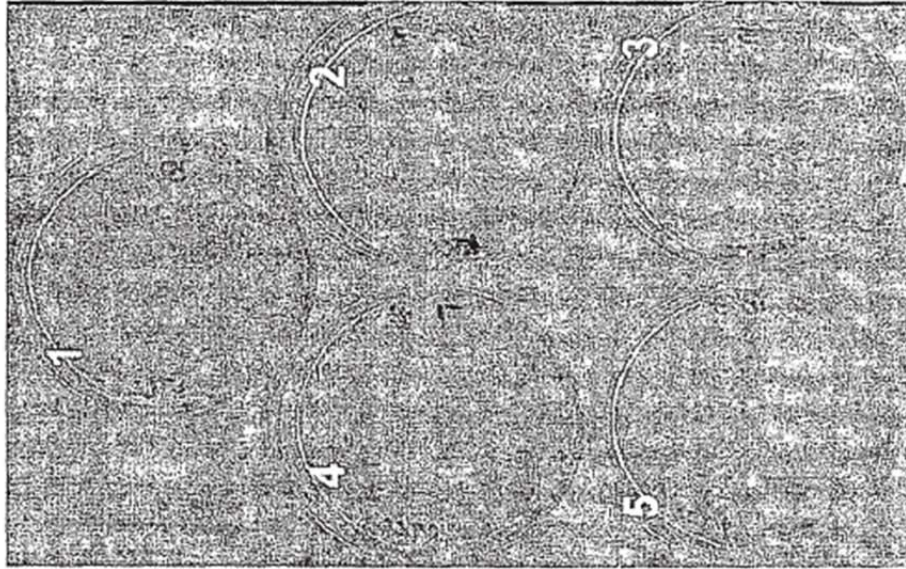


Figura 9

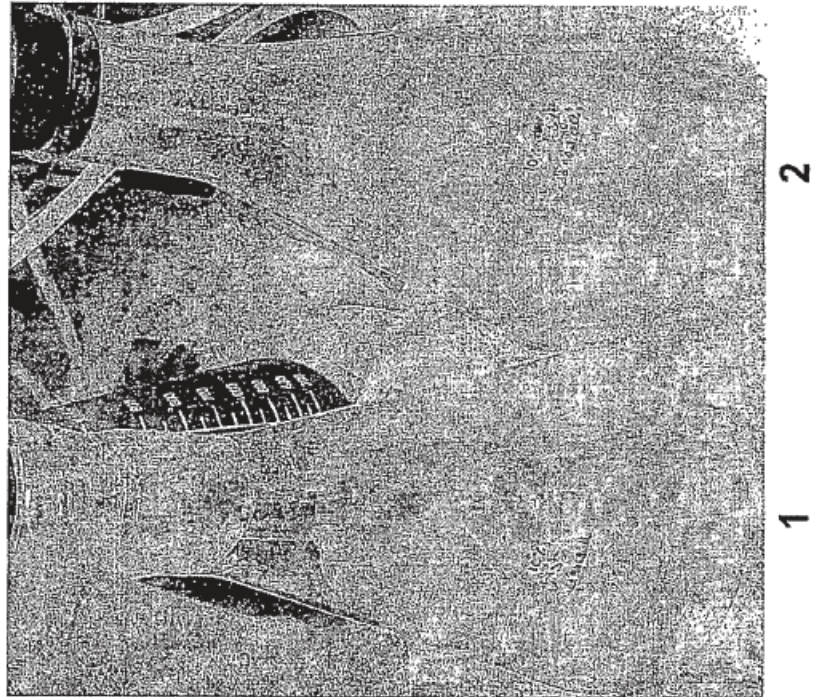


Figura 10

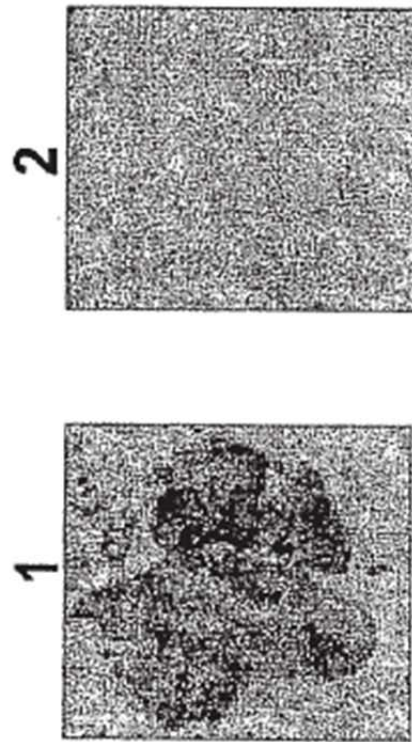


Figura 11

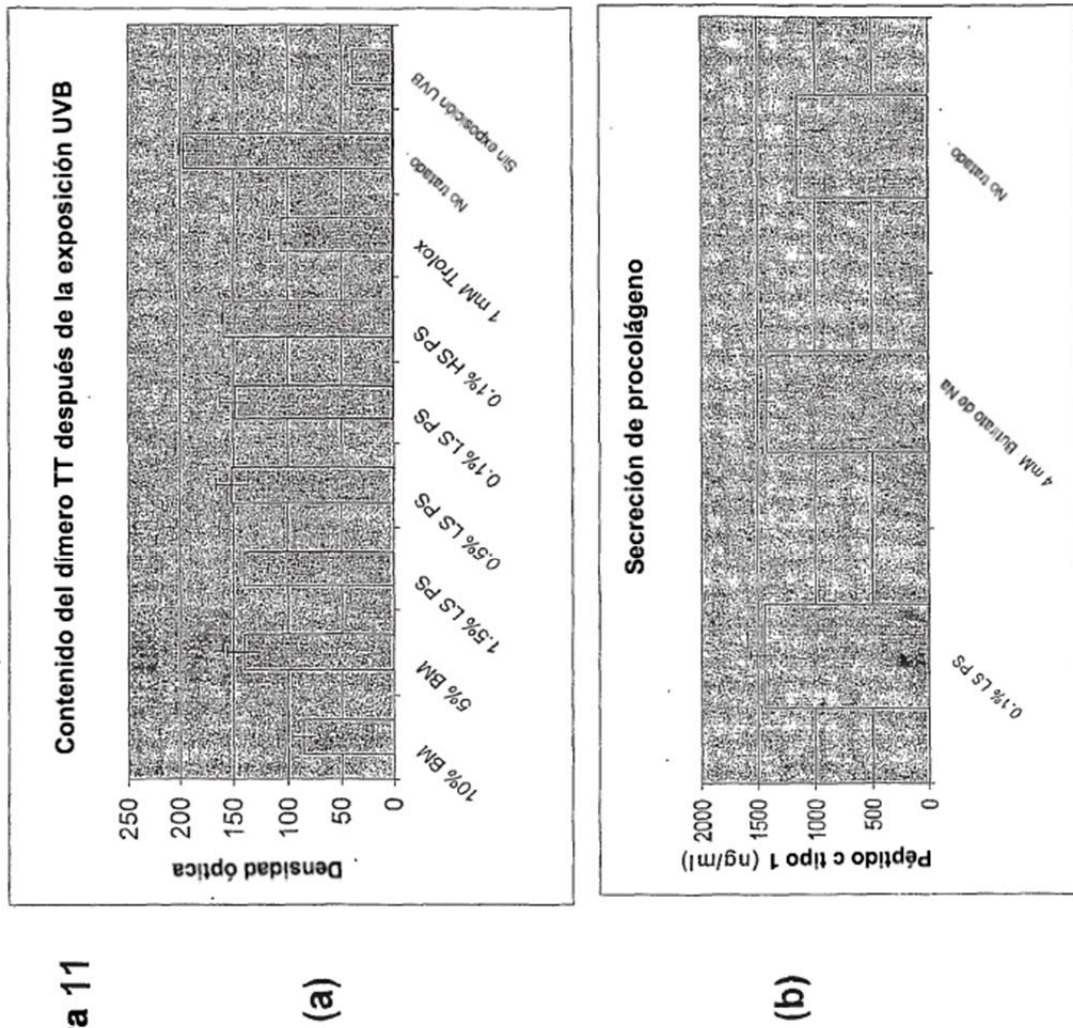
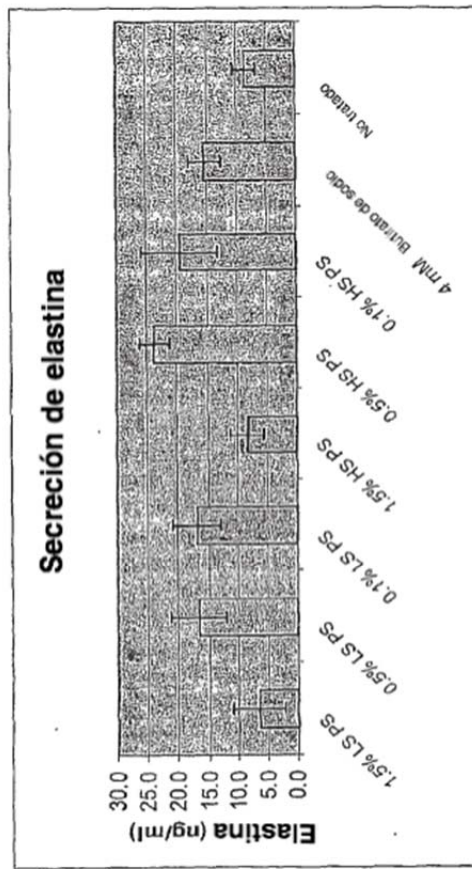
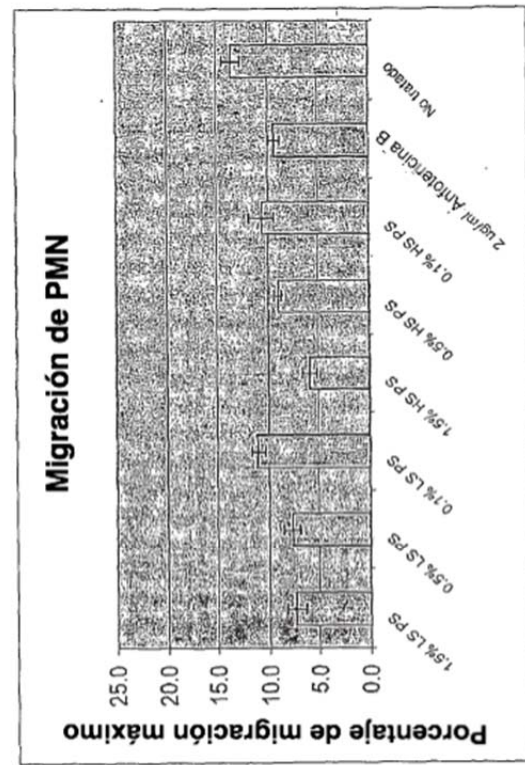


Figura 12

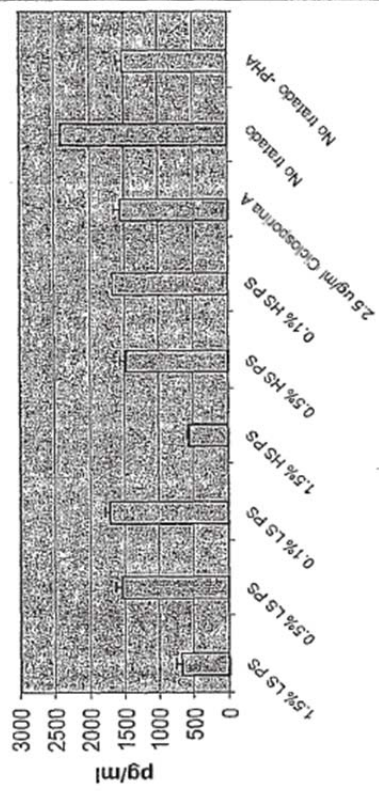


(a)



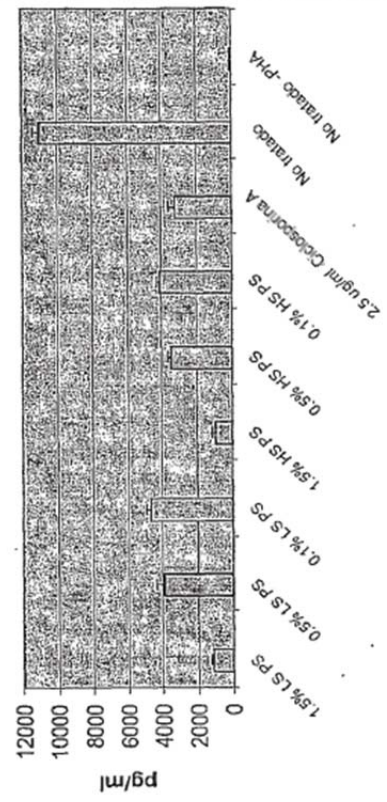
(b)

Concentración de IL-1a



(a)

Concentración de Interferón Gamma



(b)

Figura 13

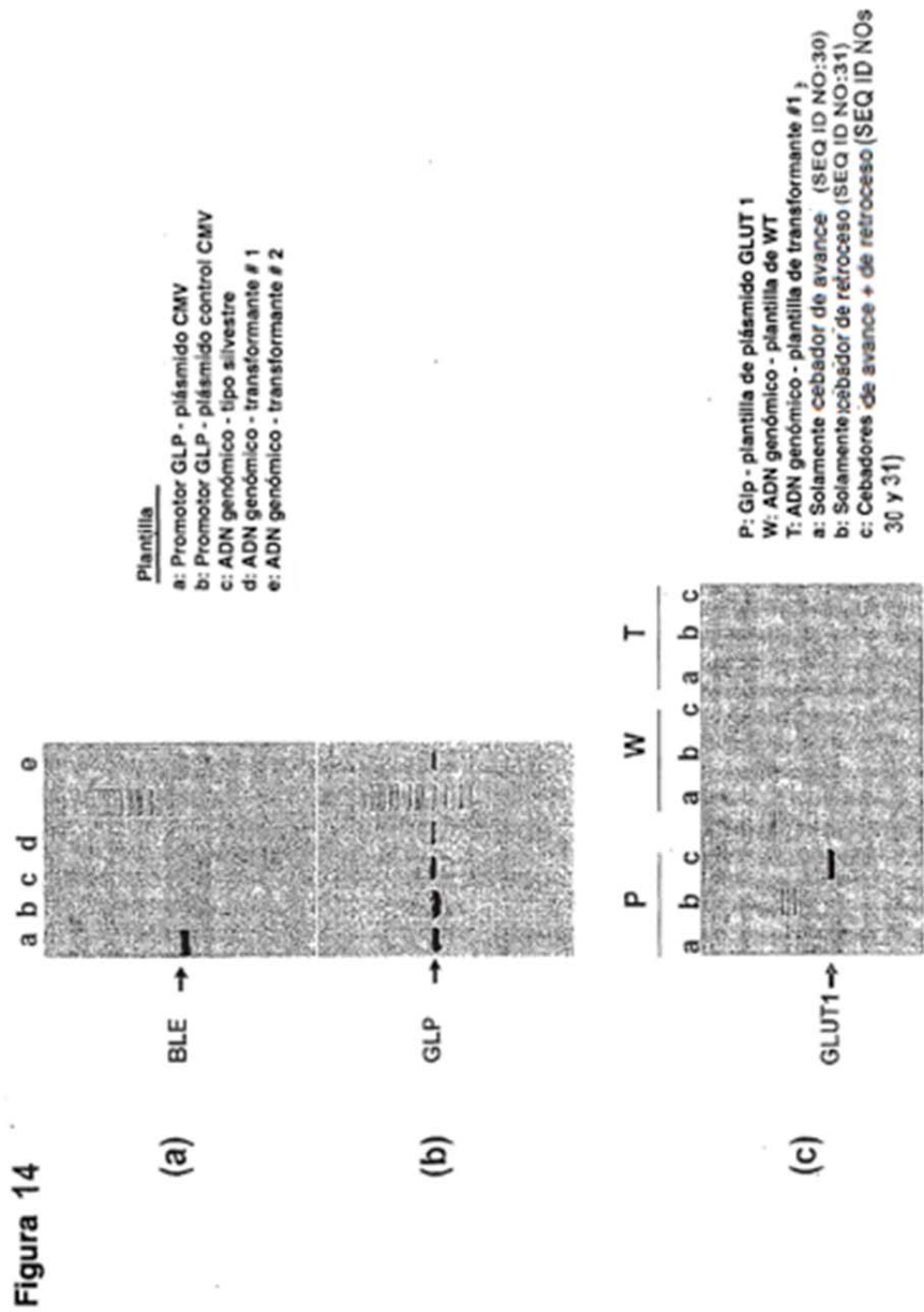
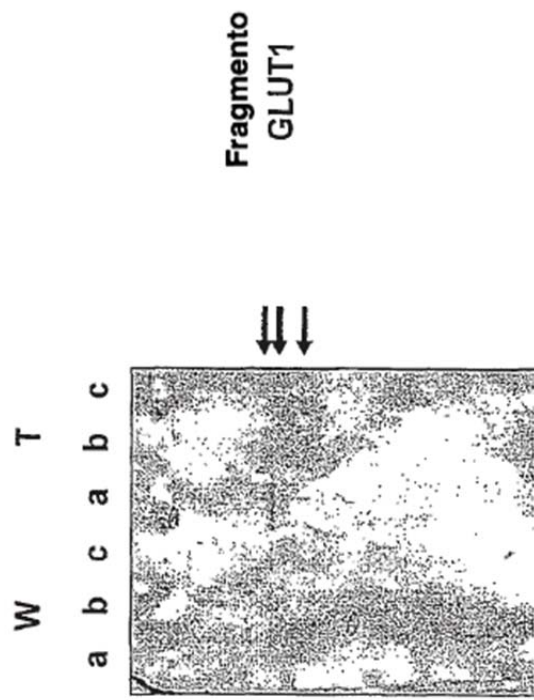


Figura 15



W: ADN genómico Wt
 T: ADN genómico transformante Glp
 a: digerido con Hinc II
 b: digerido con Sac I
 c: digerido con Xho I

Figura 16

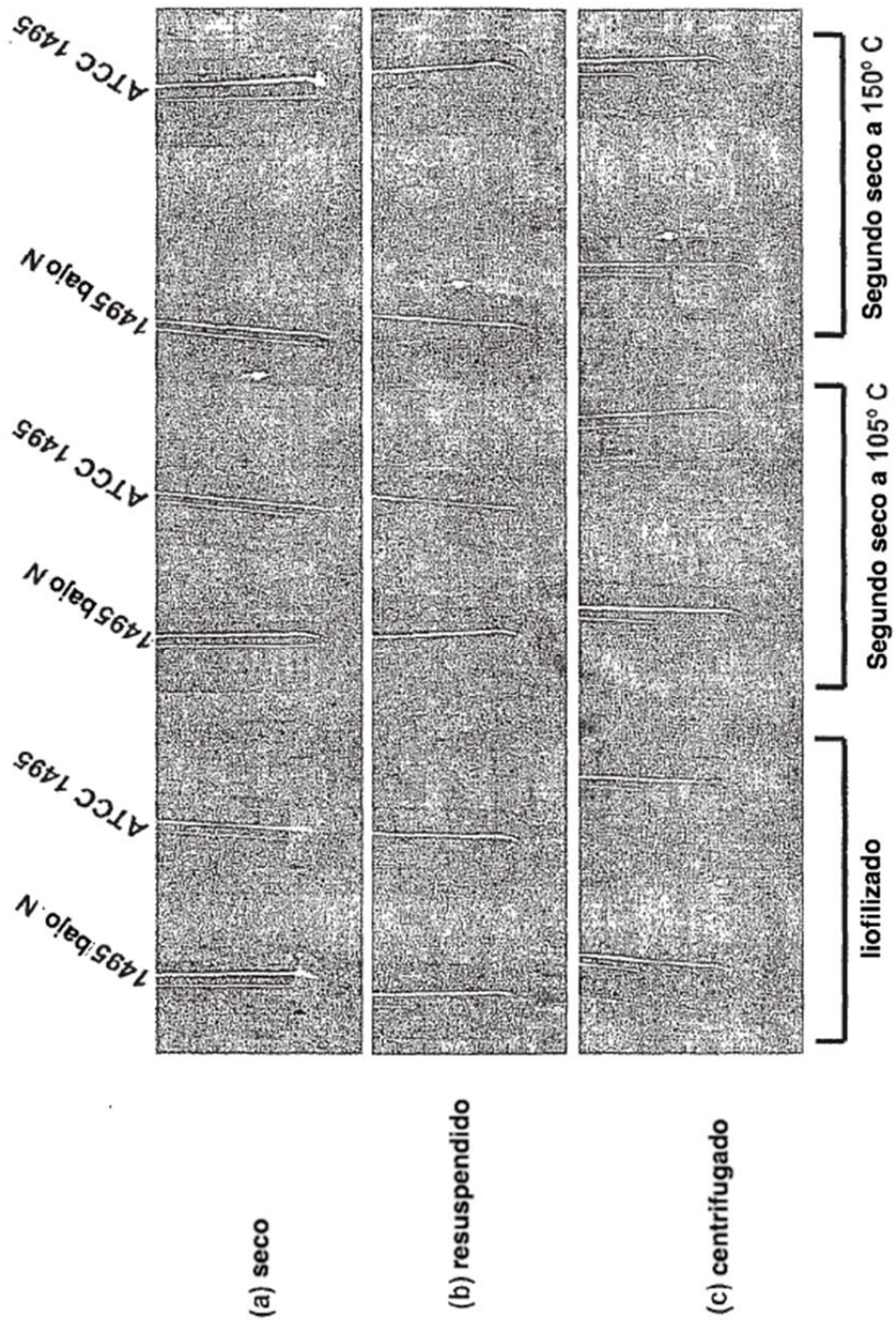
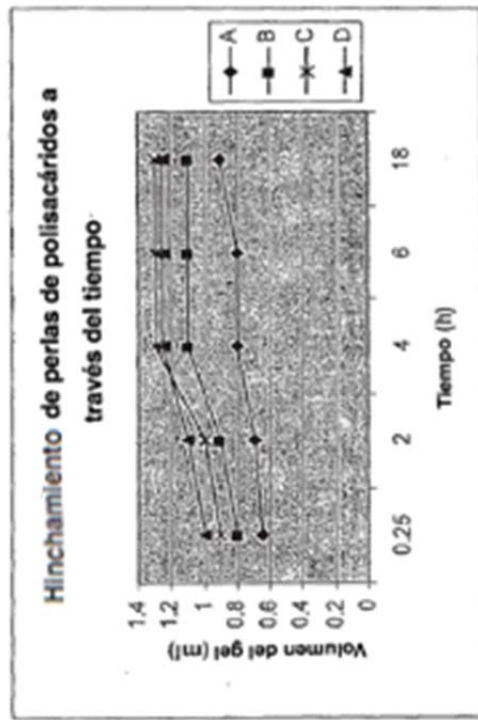
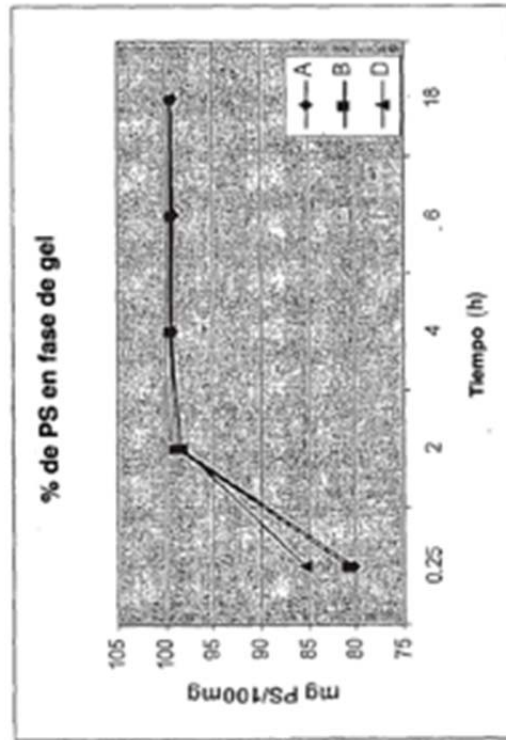


Figura 17



(a)



(b)

Figura 18

