

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 275**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/175** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2010 PCT/US2010/029081**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10111710**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010 E 10756997 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2411002**

54 Título: **Composiciones de polisacáridos de microalgas**

30 Prioridad:

**27.03.2009 US 164312 P**  
**14.10.2009 WO PCT/US2009/060692**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.06.2019**

73 Titular/es:

**ALGENIST HOLDINGS, INC (100.0%)**  
**801 N Brand Boulevard**  
**Glendale, CA 91203, US**

72 Inventor/es:

**CORAGLIOTTI, ANNA;**  
**FRANKLIN, SCOTT;**  
**DAY, ANTHONY, G. y**  
**DECKER, STEPHEN, M.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 718 275 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 de polisacáridos de microalgas

## 5 Campo de la invención

La invención reside en los campos de la salud y la belleza, los ingredientes cosméticos y la acuicultura.

Antecedentes de la invención

10

Los carbohidratos tienen la fórmula molecular general  $\text{CH}_2\text{O}$  y, por lo tanto, una vez se pensó que representaban "carbono hidratado". Sin embargo, la disposición de los átomos en carbohidratos tiene poco que véase con las moléculas de agua. El almidón y la celulosa son dos carbohidratos comunes. Ambas son macromoléculas con pesos moleculares en los cientos de miles. Ambos son polímeros; es decir, cada uno se construye a partir de unidades repetidas, monómeros, similar a como una cadena se construye a partir de sus eslabones.

15

20

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 fórmulas estructurales diferentes, se conocen como isómeros estructurales. La glucosa, galactosa y fructosa son azúcares "simples" o monosacáridos.

25

30

Dos monosacáridos se pueden unir para formar un azúcar o disacárido "doble". Tres disacáridos comunes son la sacarosa, el azúcar común de mesa (glucosa + fructosa); la lactosa, el azúcar principal 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. La unión 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. Polisacáridos, por ejemplo, de fuentes de microalgas, tales como especies de *Porphyridium*, se pueden usar en composiciones para el cuidado de la piel como en el documento US 2009/0069213.

35

Sumario de la invención

40

La presente invención se relaciona con una composición que comprende exopolisacárido aislado de microalgas cultivadas heterotróficamente seleccionadas de *Parachlorella kessleri*, *Parachlorella beijerinckii* o *Chlorella sorokiniana*, en donde el contenido de monosacáridos del exopolisacárido comprende 15-55 por ciento de moles de ramnosa, 3-30 por ciento de moles de xilosa, 1-25 por ciento de moles de manosa, 1-45 por ciento de moles de galactosa, 0,5-10 por ciento de moles de glucosa y 0,1-15 por ciento de moles de ácido glucurónico.

45

La presente invención también se relaciona con un método no terapéutico para mejorar la apariencia de la piel que comprende aplicar a la piel humana una composición como la descrita anteriormente, en donde las partículas de exopolisacáridos se formulan con al menos un excipiente adecuado para la administración tópica.

50

La presente divulgación se relaciona con polisacáridos y biomasa producidos a partir de microalgas u otros microorganismos desarrollados bajo condiciones heterotróficas. Los polisacáridos representativos incluyen aquellos presentes en la pared celular de microalgas así como polisacáridos secretados, o exopolisacáridos. Además de los propios polisacáridos, como en una forma aislada, purificada o semipurificada, la divulgación incluye una diversidad de composiciones que contienen uno o más polisacáridos de microalgas como se divulga aquí. Las composiciones incluyen composiciones nutracéuticas, cosmecéuticas, industriales y farmacéuticas que pueden usarse para una diversidad de indicaciones y usos como se describe aquí. Otras composiciones incluyen aquellas que contienen uno o más polisacáridos de microalgas y un portador o excipiente adecuado para administración tópica u oral.

55

60

La presente divulgación también se relaciona con microalgas para formulación en productos para el cuidado de la piel como una composición de la invención divulgada. Por lo tanto, la divulgación proporciona composiciones altamente deseables de células de microalgas que proporcionan la administración de ingredientes cosmecéuticos de alto valor tales como carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos hidratantes, superóxido dismutasa y otros componentes.

65

La divulgación proporciona la idea de que diversas especies de microalgas *Parachlorella* y *Chlorella*, cuando se cultivan bajo condiciones heterótrofas, permiten la producción de biomasa con un alto valor en cosmecéutico/nutracéutico como productos e ingredientes de una formulación para el cuidado de la piel. Además, los polisacáridos humectantes y antioxidantes se producen a un alto nivel durante el cultivo y se pueden purificar a partir del medio de cultivo.

La divulgación se relaciona además con 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 microalgas que no incorporan azúcares exógenos.

5 La divulgación se relaciona además con métodos de crecimiento, producción y preparación de biomasa de microalgas. En algunos métodos divulgados, las microalgas pueden producir rápidamente los polisacáridos cuando se cultivan bajo condiciones heterótrofas.

10 En otro aspecto, la divulgación se relaciona con composiciones para aplicación tópica, tales como una composición para aplicación a piel humana que comprende un polisacárido aislado de células del género *Parachlorella* o *Chlorella*. En algunos ejemplos, la composición comprende un polisacárido que es parte de una célula de microalga, o un homogenado de esta. En otras realizaciones, el polisacárido está contenido dentro de células de microalgas, o un homogenado de estas.

15 En realizaciones adicionales, la composición como se reivindica es la de un producto cosmético u otro producto para el cuidado de la piel. Los productos de la divulgación pueden contener uno o más polisacáridos de microalgas, o un homogenado de células de microalgas, un portador tópico y/o un conservante. En algunas realizaciones, el portador puede ser cualquier portador adecuado para aplicación tópica, tal como, pero sin limitarse a, uso en piel humana o tejido de mucosa humana. En otras realizaciones, la composición puede contener un polisacárido de microalga purificado, tal como un exopolisacárido y un portador tópico. Los ejemplos de portadores incluyen la formulación de liposomas, microcápsulas biodegradables, loción, aspersion, aerosol, polvo espolvoreado, polímero biodegradable, aceite mineral, petróleo líquido, petróleo blanco, propilenglicol, compuesto de polioxietileno polioxipropileno, cera emulsionante, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de cetil éster, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico, ciclometicona, ciclopentasiloxano y agua. Los ejemplos de conservantes incluyen diyodometil-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, germabeno II y EDTA disódico.

20 Como cosmecéutico, la composición puede contener un polisacárido u homogenado de microalga y otro material componente que se encuentra en 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.

30 En otros aspectos, la divulgación 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 algunos ejemplos, la separación incluye la eliminación de las células de microalgas del medio de cultivo que contiene el exopolisacárido, después de que las microalgas se hayan cultivado durante un período de tiempo. Por supuesto, los métodos pueden practicarse con polisacáridos de microalgas distintos de los exopolisacáridos. En otros ejemplos, los métodos incluyen aquellos donde las microalgas se cultivaron en un biorreactor bajo condiciones heterótrofas.

40 En un ejemplo, la divulgación incluye un método para producir un exopolisacárido, en donde el método comprende cultivar microalgas en un biorreactor bajo condiciones heterótrofas, separar las células de microalgas de medios de cultivo, en donde el medio de cultivo contiene el exopolisacárido y separar el exopolisacárido de otras moléculas presentes en los medios de cultivo. En otros ejemplos, el exopolisacárido se desprende o se secreta de las células de microalgas al medio de cultivo circundante.

50 Las microalgas de la divulgación pueden ser la de cualquier especie de microalgas que sea capaz de producir exopolisacárido (polisacárido de alto peso molecular que se secreta en el medio de cultivo) cuando se cultiva bajo condiciones heterótrofas. En algunos casos, las microalgas son de los géneros *Chlorella* o *Parachlorella*. Se ha descubierto que algunas especies de estos géneros secretan grandes cantidades de polisacáridos en sus medios de crecimiento circundantes. Ejemplos de especies dentro de un género de microalgas de la divulgación incluyen *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella fusca* var. *vacuolata*, *Chlorella* sp., *Chlorella kessleri*, *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijerinckii*.

55 Otros ejemplos del método incluyen la separación de un exopolisacárido de otras moléculas presentes en los medios de cultivo por filtración de flujo tangencial. Alternativamente, los métodos se pueden practicar separando un exopolisacárido de otras moléculas presentes en los medios de cultivo mediante precipitación con alcohol. Los ejemplos de alcoholes a usar incluyen etanol, isopropanol y metanol.

60 En otros ejemplos, un método puede comprender además tratar un polisacárido o exopolisacárido con una proteasa para degradar el material polipeptídico (o proteico) unido a, o encontrado con, el polisacárido o exopolisacárido. Los métodos pueden comprender opcionalmente separar el polisacárido o el exopolisacárido de las proteínas, péptidos y aminoácidos después del tratamiento con proteasa.

65

En otros ejemplos, se divulga un método para formular una composición cosmeceútica. Como un ejemplo, la composición puede prepararse 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 bajo condiciones que dejan o permiten la división celular. El medio de cultivo que contiene los polisacáridos se separa luego de las células de microalgas seguido de (1) separación de los polisacáridos de otras moléculas en el medio y, opcionalmente, (2) homogeneización de las células.

Otras composiciones de la divulgación pueden formularse 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 proteólisis de los polipéptidos presentes con el polisacárido. El polisacárido y cualquier polipéptido contaminante puede ser el de un medio de cultivo separado de células de microalgas en un cultivo de este. En algunos ejemplos, las células son del género *Parachlorella*.

En un aspecto adicional, la invención y la divulgación incluyen una composición que comprende polisacáridos en partículas. Los polisacáridos de la divulgación pueden ser de cualquier fuente de microalgas, y los polisacáridos de la invención o la divulgación pueden ser con cualquier nivel de sulfatación, como se describe aquí. La composición puede ser estéril o sustancialmente libre de endotoxinas y/o proteínas en algunas realizaciones. En otras realizaciones, 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 moliendo la película en partículas más pequeñas. En realizaciones alternativas, el polisacárido puede concentrarse usando precipitación con isopropanol antes o después de que el polisacárido se haya separado de las células.

En algunas realizaciones, los polisacáridos están en forma de un material purificado que se secó para ser total 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 dicha forma purificada, el polisacárido es al menos 50% en peso de polisacárido, y más preferiblemente por encima del 75% en peso de polisacárido. En algunas realizaciones, las partículas de polisacárido secas se mezclan con un disolvente o material no acuoso. En otras realizaciones, las partículas de polisacárido secas 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 polisacárido aumentan en volumen, o se hinchan, en contacto con agua o vapor de agua. Así, el volumen de las partículas de polisacárido 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 5.000%.

En algunas realizaciones, las composiciones de polisacáridos descritas aquí comprenden además al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en betacaroteno, luteína, astaxantina, vitamina C, vitamina E, vitamina A, coenzima Q10, un péptido, un péptido acilado, aceite soluble en  $\alpha$ -hidroxiácido, un alquilo lactato y ácido salicílico. En algunos casos, las composiciones comprenden partículas micronizadas que contienen el polisacárido y el al menos otro ingrediente. En algunos casos, las partículas son de un tamaño sustancialmente uniforme. En algunas realizaciones, el polisacárido de algas y el al menos un ingrediente se han sometido a calentamiento, secado y homogeneización para formar partículas que comprenden tanto polisacáridos de algas como el al menos un ingrediente. En algunos casos, las partículas que comprenden tanto polisacáridos de algas como el al menos un ingrediente se han procesado a un tamaño sustancialmente uniforme.

En otras realizaciones, las composiciones de polisacáridos descritas aquí comprenden además al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en agua, hialuronato de sodio, betaína, EDTA trisódico, glicerina, butilenglicol, anfisol K, manteca de karité, aceite de macadamia, estearato de isocetilo, aceite de oliva, diestearato de PEG 150, grancil VX401, monoestearato de glicerilo, polietileno, Granpowder USQ, Gransil PSQ, diocida y fragancia. En algunos casos, las composiciones comprenden partículas micronizadas que contienen el polisacárido y el al menos otro ingrediente. En algunos casos, la composición de polisacárido se formula para administración tópica.

La divulgación incluye además métodos para la preparación o fabricación de las partículas de polisacárido secas. En algunos ejemplos, el método comprende formular partículas de material de polisacárido en un material no acuoso. Las partículas pueden formarse a partir de una película de material 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 partículas.

En algunos casos, la película se forma calentando una suspensión de material de polisacárido hasta que toda 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 aquí. 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.

Por lo tanto, la divulgación incluye 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 una proporción 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 algunos ejemplos, la homogeneización se realiza a través de un método seleccionado de molienda por chorro, molienda por bolas, molienda Retsch®, molienda por páas y molienda en un dispositivo Quadro®. Opcionalmente, la formulación de las partículas se realiza en la fase no acuosa de una emulsión de aceite en agua, como una emulsión adecuada para la aplicación tópica. La fase no acuosa puede comprender un aceite adecuado para aplicación tópica, tal como ácido hexadecanoico como un ejemplo no limitante. En otros casos, la formulación de las partículas se realiza en un portador adecuado para la administración tópica como se describe aquí. 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 se puede realizar mediante calentamiento entre aproximadamente 40 y aproximadamente 180 grados Celsius. En otros ejemplos, el calentamiento se realiza en dos partes. La primera parte puede comprender calentar una suspensión, opcionalmente acuosa, de material de 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) que se encuentra en al menos un vacío parcial o en un alto vacío. Por supuesto, el segundo calentamiento bajo presión reducida puede usarse independientemente del primer calentamiento en la presencia de aire. En otros ejemplos, el calentamiento se realiza en una sola etapa, ya sea en presencia de aire o en presencia de un vacío parcial o total.

En algunos ejemplos alternativos, un método para hacer que el material de polisacárido sea insoluble se selecciona de entrecruzamiento químico, deshidratación química por desplazamiento de agua enlazada por un alcohol, precipitación de la solución usando un alcohol o una cetona o pH, y recubrimiento de partículas por microencapsulación.

En un aspecto adicional, la divulgación incluye un método para aplicar tópicamente una composición que comprende polisacáridos en partículas. En algunos ejemplos, la aplicación es a la piel, como a la piel de mamíferos o humanos. Alternativamente, la aplicación es para labios o arrugas en la piel humana, o por inyección en la piel o en un tejido de la piel. En realizaciones de la invención como se reivindica, la solicitud es mejorar la apariencia de la piel.

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

En ejemplos adicionales, se divulga un método para tratar la piel, tal como piel de mamífero o humana. En algunos ejemplos, el método es para el tratamiento de la piel facial humana o un tejido de esta. Tales métodos incluyen un método para estimular la síntesis de elastina en la piel aplicando una composición divulgada de la divulgación a la piel. Los métodos adicionales incluyen un método para reducir los signos del envejecimiento o reducir la apariencia del envejecimiento en la piel humana aplicando una composición de la invención o divulgación a la piel. Los ejemplos de un signo de envejecimiento o una apariencia de envejecimiento incluyen arrugas, como las de la frente o alrededor de los ojos y/o labios, y manchas hepáticas (manchas planas de color marrón amarillento que aparecen como grandes pecas). Los métodos que caen dentro del alcance de las reivindicaciones son métodos no terapéuticos.

Los ejemplos adicionales incluyen el uso de una composición que contiene polisacáridos en un método para reducir los efectos de la luz ultravioleta (UV) o la radiación, como la que se presenta en la luz solar, sobre la piel o un tejido de la piel. Un ejemplo es un método para proteger la piel de mamíferos de la luz UV. El método puede comprender aplicar una composición de la divulgación 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 otro ejemplo, una composición de la invención puede ser eficaz en la prevención de dímeros de timina (dímeros TT) en células de la piel tras la exposición a radiación UV. En un ejemplo alternativo, una composición de la invención puede aplicarse en una cantidad eficaz o suficiente para tratar la piel que ha sido dañada por la radiación UV. Un ejemplo adicional 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 divulgación en una cantidad eficaz o suficiente para reducir el riesgo de cáncer de piel inducido por UV o luz solar.

Un ejemplo adicional es un método para tratar la piel para reducir el riesgo de cáncer de piel inducido por la luz solar o la radiación UV que causa eritema. El eritema es el enrojecimiento de la piel causado por el aumento del flujo sanguíneo 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 divulgación a la piel humana se puede usar en un método para reducir especies reactivas de oxígeno (ROS) en la piel o en un tejido de la piel. Esto se basa en parte en la idea de que los polisacáridos divulgados poseen actividad antioxidante. En algunos ejemplos, el método se usa para prevenir o tratar una enfermedad o condición no deseada asociada con ROS o estrés oxidativo. Los ejemplos de dicha enfermedad o condición no deseada incluyen reducir la inflamación o irritación de la piel. En otro ejemplo, una composición de la divulgación puede reducir la inflamación al reducir la proliferación de linfocitos que está asociada con la inflamación. En otro ejemplo más, una composición de la divulgación puede reducir la inflamación al reducir el nivel de secreción de citoquinas que está asociada con la inflamación. En algunos ejemplos, la composición de polisacárido comprende uno o más agentes o compuestos con actividad antioxidante. En otros ejemplos, 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 en 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.

En otros aspectos, la presente divulgación está dirigida a un método para reducir las líneas finas y/o arrugas en la piel humana, un método para inducir una sensación de tensión en la piel humana, un método para reducir la pérdida de agua transepidérmica en la piel humana, un método para humectar la piel humana, y/o un método para aumentar la elasticidad de la piel humana. Cada método comprende la administración de una composición, como se divulga aquí, a la piel humana en una cantidad y con una frecuencia suficiente para impartir las características deseadas. Los diversos métodos y/o composiciones pueden combinarse para proporcionar métodos o composiciones adecuadas para impartir múltiples características simultáneamente.

Los detalles de ejemplos adicionales de la divulgación se exponen en los dibujos adjuntos y en 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

Las Figuras 1A-C muestran perlas de polisacárido purificadas producidas a partir de *Parachlorella beijerinckii* cultivada heterotróficamente en medios que contienen NH<sub>4</sub> (A) y medios que contienen NO<sub>3</sub> (B) como una fuente de nitrógeno. Se pusieron en contacto 100 mg de perlas de polisacárido secas (C) de cada condición de medio con 10 ml de agua y se dejaron hinchar.

La Figura 2 muestra una comparación de Cladogramas de secuencias genómicas de ARNr 23S de *Parachlorella kessleri* (SAG 27.87), *Parachlorella beijerinckii* (SAG 2046) y *Chlorella sorokiniana* (UTEX 1810).

Las Figuras 3A y 3B muestran trazas de cromatografía de permeación de gel para determinar los pesos moleculares del polisacárido de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijerinckii* usando un detector de índice de refracción.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el significado comúnmente entendido por una persona experimentada en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a las personas experimentadas una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (2nd ed. 1994); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker ed., 1988); *The Glossary of Genetics*, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991). Como se usa aquí, los siguientes términos tienen los significados que se les asigna a menos que se especifique lo contrario.

"ARA" significa ácido araquidónico.

"Asociados con" significa, dentro del contexto de una proteína de fusión de enlace a polisacárido, una molécula que se enlaza a otra molécula. La afinidad y la selectividad del enlace pueden variar cuando un polisacárido y una proteína de enlace al polisacárido están asociados entre sí.

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

El término "biomasa" se refiere al material producido por el crecimiento y/o propagación de células. La biomasa puede contener células y/o contenido intracelular, así como material extracelular. El material extracelular incluye, pero no se limita a, compuestos secretados por una célula.

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

"Portador adecuado para administración tópica" significa un compuesto que puede administrarse junto con uno o más compuestos de la presente invención, y que no destruye su actividad y es no tóxico cuando se administra en concentraciones y cantidades suficientes para administrar el compuesto a la piel o tejido mucoso.

5 El término "cocultivo", y variantes de este como "cocultivar", se refieren a la presencia de dos o más tipos de células en el mismo biorreactor. Los dos o más tipos de células pueden ser microorganismos, como microalgas, o pueden ser células de microalgas cultivadas con un tipo de célula diferente. Las condiciones de cultivo pueden ser aquellas que fomentan el crecimiento y/o la propagación de los dos o más tipos de células o aquellas que facilitan el crecimiento y/o la proliferación de una, o un subconjunto, de las dos o más células mientras se mantiene el crecimiento celular para el resto.

15 "Producto de combinación" significa un producto que comprende al menos dos composiciones distintas destinadas a la administración humana a través de rutas distintas, como una ruta tópica y una ruta oral. En algunas realizaciones, el mismo agente activo está contenido tanto en los componentes tópicos como en los orales del producto de combinación.

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

25 El término "cultivado", y sus variantes, se refieren al fomento intencional del crecimiento (aumentos en el tamaño celular, contenido celular y/o actividad celular) y/o propagación (aumentos en el número de células a través de la mitosis) de una o más células por uso de las condiciones de cultivo previstas. La combinación de crecimiento y propagación puede denominarse proliferación. La una o más células pueden ser las de un microorganismo, como las microalgas. Los ejemplos de condiciones previstas incluyen el uso de un medio definido (con características conocidas como pH, fuerza iónica y fuente de carbono), temperatura especificada, tensión de oxígeno, niveles de dióxido de carbono y crecimiento en un biorreactor. El término no se refiere al crecimiento o propagación de microorganismos en la naturaleza o de otra manera sin intervención humana directa.

30 "DHA" significa ácido docosahexaenoico.

"Endopolisacárido" significa un polisacárido que se retiene intracelularmente.

35 "EPA" significa ácido eicosapentaenoico.

El término "proporcionado de manera exógena" describe una molécula proporcionada al medio de cultivo de un cultivo celular.

40 "Exopolisacárido" significa un polisacárido que se secreta de una célula al ambiente extracelular. Algunos exopolisacáridos son secretados por la célula y se vuelven solubles en los medios de cultivo, perdiendo cualquier asociación física con las células y se conocen como "exopolisacáridos solubles". Otros exopolisacáridos permanecen asociados con la pared celular y se denominan "polisacáridos de la pared celular". Los exopolisacáridos son generalmente un polímero de unidades de monosacáridos y tienen pesos moleculares altos, generalmente con un promedio de 2 millones de Daltons o más, aunque los fragmentos pueden tener un tamaño más pequeño.

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

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

55 "Alimento", "composición del alimento", "producto alimenticio" y "alimento" se refiere a cualquier composición destinada a ser ingerida por los humanos como fuente de nutrición y/o calorías. Las composiciones alimenticias están compuestas principalmente de carbohidratos y grasas, agua y/o proteínas y constituyen sustancialmente la totalidad de la ingesta calórica diaria de una persona.

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

60 "Homogenado" significa biomasa celular que se ha interrumpido. Un homogenado no es necesariamente homogéneo.

Como se usa aquí, el término "lisado" se refiere a una solución que contiene los contenidos de células lisadas.

65 Como se usa aquí, el término "lisis" se refiere a la rotura de la membrana plasmática y, opcionalmente, la pared celular de un organismo biológico suficiente para liberar al menos algo de contenido intracelular, a menudo por mecanismos mecánicos, virales u osmóticos que comprometen su integridad.

Como se usa aquí, el término "lisar" se refiere a interrumpir la membrana celular y opcionalmente, la pared celular de un organismo biológico o célula lo suficiente para liberar al menos algo de contenido intracelular.

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

10 "Microalgas" significa un organismo microbiano eucariota que contiene un cloroplasto y, opcionalmente, que es capaz de realizar fotosíntesis, o un organismo microbiano procariota capaz de realizar 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 una fuente de carbono fija. Las microalgas pueden referirse a organismos unicelulares que se separan de las células hermanas poco después de la división celular, como Chlamydomonas, y también pueden referirse a microbios tales como, por ejemplo, Volvox, que es un simple microbio fotosintético multicelular de dos tipos de células distintas. "Microalgas" también puede referirse a células como Chlorella, Parachlorella y Dunaliella. "Microalgas" también incluye otros organismos fotosintéticos microbianos que exhiben adherencia célula-célula, como Agmenellum, Anabaena y Pyrobotrys. "Microalgas" también incluye microorganismos heterótrofos obligados que han perdido la capacidad de realizar la fotosíntesis, como ciertas especies de algas dinoflageladas.

20 El término "extracto de microalgas" significa cualquier componente que pueda extraerse de microalgas. Estos componentes pueden incluir, pero no están limitados a, aceite de microalgas, proteínas, lípidos, carbohidratos, fosfolípidos, polisacáridos, macromoléculas, minerales, pared celular, elementos traza, carotenoides y esteroides.

25 Los términos "microorganismo" y "microbio" se usan de manera intercambiable aquí para referirse a organismos microscópicos unicelulares.

"Producido naturalmente" describe un compuesto que es producido por un organismo de tipo salvaje.

30 "Péptido" significa un polipéptido de 50 o menos aminoácidos. En algunos contextos, un péptido está conectado a una proteína mucho más grande como una proteína de fusión y se conoce como un péptido para denotar su dominio independiente como parte de la proteína de fusión.

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

40 "Polisacárido" significa un compuesto o preparación que contiene una o más moléculas que contienen al menos treinta moléculas de sacárido unidas covalentemente. Un "polisacárido", "endopolisacárido" o "exopolisacárido" puede ser una preparación de moléculas de polímero que tienen unidades de repetición similares o idénticas pero diferentes pesos moleculares dentro de la población. Una "especie predominante" del polisacárido es una especie de polímero que constituye al menos el 70% de la población de polisacáridos.

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

"Molécula pequeña" significa una molécula que tiene un peso molecular inferior a 2.000 daltons, en algunos casos menos de 1.000 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 "Substancialmente libre de proteínas" significa composiciones que son preferiblemente de alta pureza y están substancialmente libres de contaminantes potencialmente dañinos, incluidas las proteínas (por ejemplo, al menos grado Nacional de Comida (NF), generalmente al menos de grado analítico, y más típicamente al menos de grado farmacéutico). Las composiciones son al menos 80, al menos 90, al menos 98%, al menos 99 o al menos 99,9% p/p libres de contaminantes no deseados tales como proteínas que están substancialmente libres de proteínas. En la medida en que un compuesto dado debe sintetizarse antes de su uso, el producto resultante está típicamente de manera substancial libre de cualquier agente potencialmente tóxico, en particular cualquier endotoxina, que pueda estar presente durante el proceso de síntesis o purificación. Las composiciones se hacen generalmente bajo condiciones GMP. Las composiciones para administración parenteral son usualmente estériles y substancialmente isotónicas.

60 Para que la comparación de secuencias determine el porcentaje de identidad de nucleótidos o aminoácidos, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y referencia se ingresan en una computadora, las coordenadas de la subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula luego el porcentaje de

identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros de programa designados.

La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), por el método de búsqueda 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 de genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (véase en general Ausubel et al., *supra*).

Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El software para realizar los análisis de BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (en la dirección de la red [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Este algoritmo involucra primero la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al., *supra*). Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largos que los contengan. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se puede aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos emparejados; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no emparejados; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada cae en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Para identificar si un ácido nucleico o polipéptido está dentro del alcance de la invención, los parámetros estándar de los programas BLAST son adecuados. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como estándar una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como estándar una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62. El programa TBLASTN (que utiliza la secuencia de proteínas para la secuencia de nucleótidos) utiliza como estándar una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y una matriz de puntuación BLOSUM 62. (Véase Henikoff & Henikoff, *Proc. Nat'l. 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, por ejemplo, Karlin & 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 un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la 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. En una realización, los polisacáridos que son adecuados para uso en la presente invención se producen por una microalga que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia genómica de ARNr 23S con la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:4.

## II. 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. Las uniones glicosídicas pueden ubicarse entre el C<sub>1</sub> (o C<sub>2</sub>) de un residuo de azúcar y el C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> o C<sub>6</sub> del segundo residuo. Se produce un azúcar ramificado si hay más de dos tipos de unión presentes en una sola molécula de monosacárido.

Los monosacáridos son azúcares simples (sacáridos) con uno o más grupos hidroxilo. En función del número de carbonos (por ejemplo, 3, 4, 5 o 6), un monosacárido es una triosa, tetrosa, pentosa o hexosa. Las pentosas y hexosas pueden ser ciclizadas, cuando el grupo aldehído o ceto reacciona con un hidroxilo en uno de los carbonos distales. Ejemplos de monosacáridos son galactosa, glucosa y ramnosa.

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, como 10 o menos, a veces se denominan oligosacáridos. El extremo del polisacárido con un carbono anomérico (C<sub>i</sub>) que no está involucrado en un enlace glicosídico se denomina extremo reductor. Un polisacárido puede consistir en un tipo de monosacárido, conocido como homopolímero, o dos o más tipos de monosacáridos, conocido como heteropolímero. Ejemplos de homopolisacáridos son celulosa, amilosa, inulina, quitina, quitosán, amilopeptina, glucógeno y pectina. La amilosa es un polímero de glucosa con uniones glicosídicas α(1→4). La amilopeptina es un polímero de glucosa con uniones α(1→4) y ramificaciones formadas por uniones α(1→6). Ejemplos de

heteropolisacáridos son glucomanano, galactoglucomanano, xiloglucano, 4-0-metilglucuronoxilano, arabinoxilano y 4-O-metilglucuronarabinoxilano.

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

10 Los glicosaminoglicanos son polisacáridos de disacáridos que se repiten. Dentro de los disacáridos, los azúcares tienden a ser modificados, con grupos ácidos, grupos amino, hidroxilo sulfatado 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.

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

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

### 25 III. Métodos de producción de polisacáridos

#### A. Métodos de cultivo celular: microalgas

30 Los polisacáridos se pueden producir cultivando microalgas. Las especies de microalgas para uso en la divulgación pueden identificarse mediante la amplificación de ciertas regiones objetivo del genoma. Las personas experimentadas en la técnica pueden usar métodos bien establecidos de análisis filogenético, como la amplificación y secuenciación del espaciador interno ribosomal (ADNr ITS1 e ITS2), ARNr 23S, ARNr 18S y otras regiones genómicas conservadas para identificar especies que producen polisacáridos que son adecuados para uso en los métodos aquí divulgados. Para ejemplos de métodos de identificación y clasificación de algas, véase, por ejemplo, Genetics, 2005 Aug; 35 170(4):1601-10 y RNA, 2005 Apr; 11(4):361-4.

40 La comparación de ADN genómico se puede usar para identificar especies adecuadas de microalgas para usar en la presente divulgación. Las regiones de ADN genómico conservado, tales como pero no limitadas a ADN que codifica el ARNr 23S, pueden amplificarse a partir de especies de microalgas y compararse con secuencias de consenso con el fin de cribar para especies de microalgas que estén relacionadas taxonómicamente con las especies de microalgas preferidas que se utilizan en la presente invención. Los ejemplos de dicha comparación de secuencia de ADN para especies dentro del género *Parachlorella* se muestran a continuación.

45 La comparación del ADN genómico también puede ser útil para identificar especies de microalgas que han sido identificadas erróneamente en una colección de cepas. A menudo, una colección de cepas identificará especies de microalgas con base en características fenotípicas y morfológicas. El uso de estas características puede llevar a una mala categorización de la especie o género de una microalga. El uso de la comparación del ADN genómico puede ser un mejor método para categorizar las especies de microalgas en función de su relación filogenética.

50 En algunos casos, las microalgas preferidas para uso en la presente divulgación tienen secuencias de ADN genómico que codifican el ARNr 23S que tienen al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 89%, al menos 88%, al menos 87%, al menos 86% de identidad de nucleótidos con al menos una de las secuencias enumeradas en las SEQ ID NOs:3-4. En otros casos, las microalgas que son preferidas para uso en la presente divulgación tienen secuencias de 55 ADN genómico que codifican el ARNr 23S que tienen al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, o al menos 60% de identidad de nucleótidos con al menos una de las secuencias enumeradas en las SEQ ID NOs:3-4.

60 Las microalgas se cultivan preferiblemente en medios líquidos para la producción de polisacáridos. Los parámetros de condición de cultivo pueden manipularse para optimizar la producción total de polisacáridos, así como para alterar la estructura de los polisacáridos producidos por microalgas.

65 Los medios de cultivo de microalgas generalmente contienen componentes tales como una fuente de nitrógeno fija, elementos traza, un regulador para el mantenimiento del pH y fosfato. Otros componentes pueden incluir una fuente de carbono fija, como acetato o glucosa, y sales como el cloruro de sodio, particularmente para las microalgas de agua

de mar. Los 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  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ .

5 Algunas especies de microalgas pueden crecer utilizando una fuente de carbono fija, como glucosa o acetato. Estas microalgas se pueden cultivar en biorreactores que no permiten que la luz entre. Alternativamente, dichas microalgas también pueden cultivarse en fotobiorreactores que contienen la fuente de carbono fija y permiten que la luz incida en las células. Tal crecimiento se conoce como crecimiento heterótrofo.

10 Las microalgas contienen maquinaria fotosintética capaz de metabolizar fotones y transferir la energía recolectada de fotones a fuentes de energía químicas fijas como monosacárido. La glucosa es un monosacárido común producido por las 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 de carbono fija que se proporciona exógenamente (por ejemplo, véase *Plant Physiol.* 2005 Feb;137(2):460-74). Además de ser una fuente de energía química, los monosacáridos como la glucosa también son un sustrato para la producción de polisacáridos. La divulgación  
15 proporciona métodos para producir polisacáridos con innovadoras composiciones de monosacáridos. Por ejemplo, las microalgas se cultivan en presencia de medios de cultivo que contienen monosacáridos proporcionados de forma exógena, como la glucosa. La célula capta el monosacárido mediante transporte activo o pasivo y se incorpora a moléculas de polisacárido producidas por la célula.

20 En algunos ejemplos, la fuente de carbono fija es una o más seleccionadas de glucosa, galactosa, xilosa, manosa, ramnosa, N-acetilglucosamina, glicerol, floridosido y ácido glucurónico. Los métodos pueden ser crecimiento celular practicado en presencia de al menos aproximadamente 5,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 10  $\mu M$ , al menos aproximadamente 15,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 20,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 25,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 30,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 35,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 40,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 45,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 50,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 55,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 60,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 75,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 80,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 85,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 90,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 95,0  $\mu M$ , al menos aproximadamente 100,0  $\mu M$ , o al menos aproximadamente 150,0  $\mu M$ , de una o más fuentes de carbono fijas proporcionadas de forma exógena.

30 En algunos ejemplos que usan células de los géneros *Chlorella* o *Parachlorella*, los métodos incluyen el uso de aproximadamente 1-7% de glucosa como fuente de carbono fija en donde las células se cultivan en la oscuridad.

35 B. Métodos de cultivo celular: crecimiento heterótrofo

Como alternativa al crecimiento fotosintético de microorganismos, como se describió anteriormente, algunos microorganismos pueden cultivarse bajo condiciones de crecimiento heterótrofas en las que una fuente de carbono fija proporciona energía para el crecimiento y la producción de polisacáridos.

40 Para la producción de polisacáridos, las células de tipo salvaje o recombinantes se cultivan o fermentan preferiblemente en grandes cantidades. El cultivo puede estar en grandes volúmenes de líquidos, como en cultivos en suspensión como ejemplo. Otros ejemplos incluyen comenzar con un pequeño cultivo de células que se expanden en una gran biomasa en combinación con el crecimiento y propagación celular, así como con la producción de polisacáridos. Se pueden usar biorreactores o fermentadores de acero para acomodar grandes volúmenes de cultivo.  
45 Un fermentador similar a los utilizados en la producción de cerveza y/o vino es adecuado, al igual que los fermentadores extremadamente grandes utilizados en la producción de etanol.

Se proporcionan fuentes de nutrientes apropiadas para el cultivo en un fermentador. Estos incluyen materias primas tales como uno o más de los siguientes: una fuente de carbono fija como glucosa, almidón de maíz, material celulósico despolimerizado, sacarosa, caña de azúcar, remolacha azucarera, lactosa, suero de leche o melaza; una fuente de grasa, como grasas o aceites vegetales; una fuente de nitrógeno, como proteína, harina de soja, licor de remojo de maíz, amoníaco (puro o en forma de sal), nitrato o sal de nitrato o nitrógeno molecular; y una fuente de fósforo, tal como sales de fosfato. Además, un fermentador permite el control de condiciones de cultivo tales como temperatura, pH, tensión de oxígeno y niveles de dióxido de carbono. Opcionalmente, los componentes gaseosos, como el oxígeno o el nitrógeno, pueden burbujearse a través de un cultivo líquido. Otras fuentes de almidón (glucosa) como el trigo, patata, arroz y sorgo. Otras fuentes de carbono incluyen flujos de proceso como glicerol de grado técnico, licor negro, ácidos orgánicos como acetato y melaza. Las fuentes de carbono también se pueden proporcionar como una mezcla, como una mezcla de sacarosa y pulpa de remolacha azucarada despolimerizada. Los medios adecuados para el cultivo heterótrofo de células de microalgas de la presente invención se describen en detalle en el Ejemplo 1 a  
60 continuación. En algunos ejemplos, las células de microalgas son del género *Parachlorella*. En algunas realizaciones preferidas, la célula de microalgas es *Parachlorella kessleri* o *Parachlorella beijerinckii*.

Se puede usar un fermentador para permitir que las células experimenten las diversas fases de su ciclo de crecimiento. Como ejemplo, puede introducirse un inóculo de células productoras de polisacáridos en un medio seguido de un período de retraso (fase de retraso) antes de que las células comiencen a crecer. Después del período de retraso, la  
65 rata de crecimiento aumenta de manera constante y entra en la fase logarítmica o exponencial. La fase exponencial a

su vez es seguida por una desaceleración del crecimiento debido a la disminución de nutrientes y/o aumentos en sustancias tóxicas. Después de esta desaceleración, el crecimiento se detiene y las células entran una fase estacionaria o en estado estable, dependiendo del entorno particular proporcionado a las células.

5 En un método de crecimiento heterótrofo alternativo de acuerdo con la presente invención, los microorganismos pueden cultivarse usando biomasa celulósica despolimerizada como materia prima. La biomasa celulósica (por ejemplo, rastrojo, tales como rastrojo de maíz) no es costosa y está disponible fácilmente; sin embargo, los intentos de usar este material como materia prima para la levadura han fracasado. En particular, se ha encontrado que tal materia prima es inhibidora del crecimiento de la levadura, y la levadura no puede usar los azúcares de 5 carbonos  
10 producidos a partir de materiales celulósicos (por ejemplo, xilosa de hemicelulosa). Por el contrario, las microalgas pueden crecer en material celulósico procesado. Por consiguiente, la divulgación proporciona un método para cultivar una microalga en presencia de un material celulósico y/o un azúcar de 5 carbonos. Los materiales celulósicos generalmente incluyen:

Componente	Porcentaje de peso seco
Celulosa	40-60%
Hemicelulosa	20-40%
Lignina	10-30%

15 Los materiales celulósicos adecuados incluyen residuos de cultivos energéticos herbáceos y leñosos, así como cultivos agrícolas, es decir, las partes de la planta, principalmente tallos y hojas, que no se eliminan de los campos con el alimento primario o el producto de fibra. Los ejemplos incluyen desechos agrícolas como el bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz, fibra de maíz (incluyendo tallos, hojas, cáscaras y mazorcas), paja de trigo, paja de arroz,  
20 pulpa de remolacha azucarera, pulpa de cítricos, cáscaras de cítricos; desechos forestales, tales como aclarado de madera dura y blanda, y residuos de madera dura y blanda de operaciones de madera; desechos de madera tales como desechos de aserradero (astillas de madera, aserrín) y desechos de molinos de pulpa; residuos urbanos, como fracciones de papel de residuos sólidos municipales, residuos urbanos de madera y residuos urbanos verdes, como recortes de pasto municipal; y residuos de construcción de madera. Los productos celulósicos adicionales incluyen cultivos celulósicos dedicados, como pasto varilla, madera híbrida de álamo y miscanthus, fibra de caña y sorgo fibroso. Los azúcares de cinco carbonos que se producen a partir de dichos materiales incluyen la xilosa.

En otro método de crecimiento heterótrofo alternativo de acuerdo con la presente invención, que a su vez se puede usar opcionalmente en combinación con los métodos descritos anteriormente, se usa sacarosa, producida por ejemplo  
30 a partir de caña de azúcar o remolacha azucarera, como materia prima. Las microalgas pueden manipularse para utilizar sacarosa como una fuente de carbono. Por ejemplo, la expresión de un transportador de sacarosa y una invertasa de sacarosa permite que las microalgas, por ejemplo, *Chlorella protothecoides*, transporten la sacarosa a la célula desde el medio de cultivo e hidrolizar la sacarosa para producir glucosa y fructosa. Opcionalmente, una fructoquinasa puede expresarse también en casos donde la actividad de la hexoquinasa endógena es insuficiente para  
35 la fosforilación máxima de la fructosa. Ejemplos de transportadores de sacarosa adecuados son los números de acceso de Genbank CAD91334, CAB92307 y CAA53390. Ejemplos de invertasas de sacarosa adecuadas son los números de acceso de Genbank CAB95010, NP\_012104 y CAA06839. Ejemplos de fructoquinasas adecuadas son los números de acceso de Genbank P26984, P26420 y CAA43322. Los vectores para la transformación de microalgas, incluida la *Chlorella*, que codifican uno o más de dichos genes, pueden diseñarse como se describe aquí, o como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 12/131,783, presentada el 2 de junio de 2008, titulada "Uso de materiales celulósicos para el cultivo de microorganismos".  
40

La secreción de una invertasa de sacarosa puede obviar la necesidad de la expresión de un transportador que pueda transportar la sacarosa a la célula. Esto se debe a que una invertasa secretada cataliza la conversión de una molécula de sacarosa en una molécula de glucosa y una molécula de fructosa, ambas de las cuales pueden ser transportadas y utilizadas por los microbios divulgados aquí. Por ejemplo, la expresión de una invertasa de sacarosa con una señal de secreción genera actividad de invertasa fuera de la célula. Véase Hawkins et al., *Current Microbiology* vol. 38 (1999), pp. 335-341 para ejemplos de señales de secreción activas en *Chlorella*. La expresión de dicha proteína, según lo habilitado por la metodología de manipulación genética divulgada aquí, permite que las células que ya son capaces de utilizar la glucosa extracelular como una fuente de energía utilicen la sacarosa como fuente de energía extracelular.  
45  
50

Alternativamente, una invertasa de sacarosa también puede expresarse intracelularmente en células que expresan un transportador de sacarosa, así como en células que expresan cualquier transportador de carbohidratos que permita que la sacarosa entre en la célula.  
55

Los biorreactores se pueden emplear para su uso en métodos de crecimiento heterótrofos. Como se apreciará, las disposiciones hechas para hacer que la luz esté disponible para las células en los métodos de crecimiento fotosintético son innecesarias cuando se usa una fuente de carbono fija en los métodos de crecimiento heterótrofo descritos aquí.

Los ejemplos específicos de condiciones de proceso y métodos de crecimiento heterótrofos descritos aquí pueden combinarse de cualquier manera adecuada para mejorar las eficiencias del crecimiento microbiano y la producción de lípidos. Además, la divulgación incluye la selección y/o la ingeniería genética de microbios, tales como microalgas, para producir microbios que son aún más adecuados para usar en los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, los microbios que tienen una mayor capacidad para utilizar cualquiera de las materias primas descritas anteriormente para aumentar la proliferación y/o la producción de polisacáridos están dentro del alcance de la divulgación.

#### C. Medios de crecimiento

Los microorganismos útiles de acuerdo con los métodos de la presente divulgación se encuentran en diversas ubicaciones y entornos en todo el mundo. Como consecuencia de su aislamiento de otras especies y su resultante divergencia evolutiva, el medio de crecimiento particular para el crecimiento óptimo y la generación de constituyentes de lípidos y/o hidrocarburos puede ser difícil de predecir. En algunos casos, ciertas cepas de microorganismos pueden ser incapaces de crecer en un medio de crecimiento particular debido a la presencia de algún componente inhibidor o la ausencia de algún requerimiento nutricional esencial requerido por la cepa particular de microorganismo.

Los medios de crecimiento sólidos y líquidos generalmente están disponibles en una amplia variedad de fuentes, y se pueden encontrar las instrucciones para la preparación de medios particulares que son adecuadas para una amplia variedad de cepas de microorganismos, por ejemplo, en la red en <http://www.utex.org/>, un sitio mantenido por la Universidad de Texas en Austin por su colección de cultivos de algas (UTEX).

En un ejemplo particular, un medio adecuado para el cultivo de *Chlorella protothecoides* (UTEX 31) comprende un medio de proteosa. Este medio es adecuado para cultivos axénicos, y se puede preparar un volumen de 1 L del medio (pH ~6,8) mediante la adición de 1 g de proteosa peptona a 1 litro de medio de Bristol. El medio de Bristol comprende  $\text{NaNO}_3$  2,94 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,17 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,3 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,43 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,29 mM y NaCl 1,43 mM en una solución acuosa. Para un medio de agar al 1,5%, se pueden agregar 15 g de agar a 1 l de la solución. La solución se cubre y se esteriliza en autoclave, y luego se almacena a una temperatura refrigerada antes de su uso.

En otro ejemplo particular, un medio adecuado para el cultivo heterótrofo de diversas especies de *Parachlorella* también se basa en el medio de Bristol. Este medio es adecuado para cultivos axénicos y contiene lo siguiente:  $\text{NaNO}_3$  15 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,17 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,97 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,43 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,28 mM, y NaCl 0,43 mM y 4g/L de extracto de levadura más oligominerales y vitaminas en solución acuosa. La solución se cubre y se esteriliza en autoclave, y luego se almacena a una temperatura refrigerada antes de su uso.

Otro medio que es adecuado para el cultivo heterótrofo de microalgas para la producción de polisacáridos contiene lo siguiente:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,14g/L);  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,11 g/L);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,37 g/L);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,00 g/L);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,03g/L); extracto de levadura (4,00 g/L) y ácido cítrico (0,25 g/L), además de oligominerales y vitaminas en agua desionizada.

Otros medios adecuados para usar con los métodos de la divulgación se pueden identificar fácilmente consultando la URL identificada anteriormente, o consultando a otras organizaciones que mantienen cultivos de microorganismos, como SAG, CCAP o CCALA. SAG se refiere a la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Gotinga (Gotinga, Alemania), CCAP se refiere a la colección de cultivos de algas y protozoos administrada por la Asociación Escocesa de Ciencias Marinas (Escocia, Reino Unido), y CCALA se refiere a la Colección de cultivos de laboratorio de algas en el Instituto de Botánica (Tréboň, República Checa).

#### E. Métodos ex vivo

Las microalgas y otros organismos pueden manipularse para producir moléculas de polisacárido que no se producen naturalmente mediante métodos como la alimentación de células con monosacáridos que no son producidos por las células (Nature. 2004 Aug 19;430(7002):873-7).

#### F. Métodos in vitro

Los polisacáridos se pueden alterar por modificación enzimática y química. Por ejemplo, se pueden agregar enzimas modificadoras de carbohidratos a una preparación de polisacárido y se les permite catalizar reacciones que alteran la estructura del polisacárido. Se pueden usar métodos químicos 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 Review; Habuchi, O., Glycobiology. 1996 Jan;6(1):51-7; Chen, J., J. Biol. Chem. In press; Geresh., S et al., J. Biochem. Biophys. Methods 50 (2002) 179-187).

#### G. Métodos de purificación de polisacáridos

Los exopolisacáridos pueden purificarse a partir de cultivos de microalgas mediante diversos métodos, incluidos los divulgados aquí.

## 1. Precipitación

5 Por ejemplo, los polisacáridos pueden precipitarse agregando compuestos tales como cloruro de cetilpiridinio, isopropanol, etanol o metanol a una solución acuosa que contiene un polisacárido en solución. Las pellas o fibras de polisacárido precipitado pueden lavarse y resuspenderse 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 Estados Unidos No. 6,342,367; Patente de Estados Unidos No. 6,969,705).

## 10 2. Diálisis

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

## 15 3. Filtración de flujo tangencial

La filtración se puede usar para concentrar el polisacárido y eliminar las sales. Por ejemplo, se puede utilizar la 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 discute el uso de un filtro de fibra hueca de 0,45  $\mu$ M de tecnologías MaxCell A/G. Véase también, por ejemplo, los dispositivos Millipore Pellicon®, utilizados con membranas de 100kD, 300kD, 1.000 kD (número de catálogo P2C01MC01), 0,1  $\mu$ M (número de catálogo P2VVPPV01), 0,22  $\mu$ M (número de catálogo P2GVPPV01) y 0,45 $\mu$ M (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. La TFF también se puede realizar utilizando sistemas de filtración de fibra hueca.

25 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 que los contaminantes pasen pero no las moléculas de polisacárido.

## 35 4. Cromatografía de intercambio iónico

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

## 5. Tratamiento de proteasa

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

50 El tratamiento con calor 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 Oct 1;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 Oct 15;207(1):101-20;).

55 Por lo tanto, la divulgación incluye la producción de un exopolisacárido que comprende separar el exopolisacárido de los contaminantes después de que las proteínas unidas al exopolisacárido se hayan degradado o destruido. Las proteínas pueden ser aquellas unidas al exopolisacárido durante el cultivo de una célula de microalgas en medio, que primero se separa de las células antes del tratamiento de proteólisis o proteasa. Las células pueden ser las del género *Parachlorella* como ejemplo.

60 En un ejemplo, se divulga un método para producir un exopolisacárido en donde el método comprende cultivar células del género *Parachlorella*; separar las células de los medios de cultivo; destruir la proteína unida al exopolisacárido presente en los medios de cultivo; y separar el exopolisacárido de los contaminantes. En algunos métodos, el contaminante o contaminantes se seleccionan de aminoácidos, péptidos, proteasas, fragmentos de proteínas y sales. En otros métodos, el contaminante se selecciona entre NaCl, MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Tris, ZnCl<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, COCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, FeCl<sub>3</sub> y EDTA.

65

## 6. Extracción de células enteras

Los polisacáridos intracelulares y los polisacáridos de la pared celular pueden purificarse a partir de la masa celular entera (véase del ejemplo de la Patente de Estados Unidos 4,992,540; Patente de 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).

## H. Métodos de secado

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

Los secadores de bandejas aceptan sólidos húmedos en las bandejas. Aire caliente (o nitrógeno) puede circular para secarse. Los secadores de estante también pueden emplear una presión o vacío reducidos (por debajo de la atmosférica al nivel del mar, como a aproximadamente 25 en Hg o menos) para secar a temperatura ambiente cuando los productos son sensibles a la temperatura y son similares a los liofilizados pero menos costosos de usar y puede ser fácilmente ampliados. En algunas realizaciones, el secado en secadores de bandejas de horno se realiza en vacío.

Los secadores por aspersión tienen un funcionamiento relativamente simple, que aceptan alimentación en estado fluido y lo convierten en una forma en partículas secas aplicando por aspersión el fluido en un medio de secado en caliente.

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

Los secadores instantáneos de hilado se utilizan para secar la torta húmeda, la suspensión o la pasta que normalmente es difícil de secar en otros secadores. El material se alimenta mediante un alimentador de tornillo a través de un conductor de velocidad variable en la cámara de secado vertical, donde se calienta con aire y, al mismo tiempo, se desintegra con 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 ciclónico/filtro de bolsa o con una combinación de ambos.

## I. Métodos de homogeneización de microalgas

Un interruptor de presión bombea una lechada a través de una válvula de orificio restringida. Se aplica alta presión (hasta 1.500 bar), seguida de una expansión instantánea a través de una boquilla de salida. La perturbación celular se logra mediante tres mecanismos diferentes: el impacto en la válvula, el alto cizallamiento del líquido en el orificio y la caída repentina de la presión al descargar, causando una explosión de la célula. El método se aplica principalmente para la liberación de moléculas intracelulares. De acuerdo con Hetherington et al., la perturbación 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 la tasa dependiente de la temperatura; N es el número de pasadas 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 corte, la molienda entre las perlas y las colisiones con las perlas. Las perlas perturban las células para liberar biomoléculas. La cinética de la liberación de biomoléculas por 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 adecuadamente concentrada, es decir: sonicación. El concepto de perturbación ultrasónica se basa en la creación de cavidades en suspensión celular. La homogeneización también se puede realizar 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 de secarlas en dispositivos como un molino coloidal o un molino de chorro de aire. El molino de chorro de aire utiliza aire comprimido a alta presión para moler material en partículas de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  o menos.

Debido a que el porcentaje de polisacárido en función del peso seco de una célula de microalgas puede ser frecuentemente superior al 50%, los homogeneizados de células de microalgas pueden considerarse composiciones de polisacáridos parcialmente purificadas. Las composiciones de polisacáridos purificados o aislados contienen menos del 20% y preferiblemente, menos del 10% de proteínas, ácidos nucleicos, componentes intracelulares, como otros polisacáridos que se encuentran intracelularmente que se encuentran comúnmente en el homogeneizado de células de microalgas. La perturbación celular ayuda a aumentar la cantidad de polisacárido accesible al disolvente al romper las paredes celulares que están compuestas en gran parte por polisacáridos.

La homogeneización como se describe aquí puede aumentar significativamente la cantidad de polisacárido disponible en el disolvente. Por ejemplo, la homogeneización puede aumentar la cantidad de polisacárido disponible en el 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, 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 al menos un factor de 30 o más en comparación con la cantidad de polisacárido disponible en el 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 dada de homogeneizado es medir la cantidad de un compuesto en el homogeneizado y calcular la cantidad en gramos de células necesarias para generar esta cantidad del compuesto utilizando datos conocidos para la cantidad del compuesto por gramo de masa de células. Se conoce la cantidad de muchos de estos compuestos por gramo de células de microalgas particulares. Dada una cierta cantidad de un compuesto en una composición, la persona experimentada 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 el disolvente suficiente para indicar si la composición contiene o no células homogeneizadas, como por ejemplo cinco veces la cantidad de polisacárido disponible en el disolvente presente en una cantidad similar o idéntica de células no homogeneizadas.

#### J. Decoloración

En algunos casos, los polisacáridos o extractos de microalgas producidos de forma heterótrofa tienen pigmento o coloración como un subproducto del proceso de fermentación. Tal pigmento o coloración puede ser indeseable para formulaciones cosméticas o nutracéuticas. En algunos casos, el pigmento o la coloración pueden manchar la piel humana cuando se aplica como parte de una formulación para el cuidado de la piel. En otros casos, el pigmento o la coloración puede ser visualmente poco atractivo para los consumidores finales como parte de un cuidado de la piel o una composición cosmética. En tales casos, se puede realizar una etapa de decoloración para eliminar el pigmento o la coloración en el homogenado/extracto de microalgas o polisacárido. Muchos métodos de decoloración son conocidos en la técnica y pueden ser adecuados para su uso en la presente invención. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, blanqueo, tratamiento con disolventes, tratamiento con carbón activado o carbón u otro material poroso como arcilla, enjuague con ácido, enjuague con alcohol, lavado con soluciones con alto contenido de sal y tratamiento enzimático.

#### K. Métodos de análisis

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

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 1,6 azul de 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 pueden analizarse mediante métodos como HPLC, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio aniónico (véase por ejemplo Prosky L, Asp N, Schweizer TF, DeVries JW & Furda I (1988) Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in food and food products: Interlaboratory study. 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 pueden detectarse mediante 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 polisacáridos con monosacáridos se puede realizar mediante la combinación de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) de los derivados de per-O-trimetilsililo (TMS) de los metilglicósidos monosacáridos producidos a partir de la muestra mediante metanolisis ácida (véase Merkle and 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, como el ensayo de Lowry, el ensayo de Biuret, el ensayo de Bradford o el ensayo de ácido bicinonínico (BCA). Como

ejemplo no limitativo, el ensayo de BCA se basa en la formación de un complejo de proteína  $\text{Cu}^{2+}$  bajo condiciones alcalinas. El  $\text{Cu}^{2+}$  luego se reduce a  $\text{Cu}^{1+}$  donde la cantidad de proteína presente es proporcional a la reducción de la cantidad. Se ha demostrado que la reducción está mediada por aminoácidos como cisteína, cistina, triptófano y tirosina, así como el enlace peptídico. El resultado del ensayo es un complejo azul púrpura con  $\text{Cu}^{1+}$  bajo condiciones alcalinas. El complejo de color es estable, incluso en presencia de otros componentes posiblemente presentes con las proteínas, como los detergentes. La cantidad de reducción se puede controlar por absorbancia a 562 nm. El ensayo BCA es sensible y preciso en un amplio intervalo de concentraciones de proteínas.

#### IV. Composiciones

Las composiciones de la invención incluyen un polisacárido u homogeneizado de microalgas como se describe en las reivindicaciones. En realizaciones relacionadas con polisacáridos, incluyendo exopolisacáridos, la composición puede comprender una población homogénea o heterogénea de moléculas de polisacáridos, incluyendo polisacáridos sulfatados como realizaciones no limitativas. Los ejemplos de poblaciones homogéneas incluyen aquellas que contienen un solo tipo de molécula de polisacárido, como aquella que tiene la misma estructura y peso molecular. Los ejemplos de poblaciones heterogéneas incluyen aquellas que contienen más de un tipo de molécula de polisacárido, tal como una mezcla de polisacáridos que tienen un peso molecular (MW) dentro de un intervalo o un MW por encima o por debajo de un valor de MW. En algunos casos, el polisacárido tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2 millones de Daltons. Por ejemplo, el exopolisacárido de las microalgas del género *Parachlorella* suele ser de unos 2 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 describe anteriormente.

En algunas realizaciones, una composición de la invención puede comprender uno o más polisacáridos producidos por microalgas que no se han modificado de forma recombinante. Las microalgas pueden ser aquellas que ocurren de manera 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 no limitadas a, microalgas modificadas por técnicas recombinantes. Los 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 genético de microalgas endógeno; y/o manipulación genética para aumentar la expresión de un producto genético de microalgas endógeno. La divulgación contempla la modificación recombinante de las diversas especies de microalgas descritas aquí. En algunas realizaciones, las microalgas son del género *Parachlorella*.

En algunas realizaciones, algunas microalgas cultivadas bajo diferentes condiciones heterótrofas pueden producir polisacáridos que son diferentes en su composición de monosacáridos. Las realizaciones incluyen alterar la fuente de nitrógeno, como en un ejemplo no limitativo, usar  $\text{NH}_4$  en lugar de  $\text{NO}_3$ , puede cambiar la composición de monosacáridos del polisacárido producido por las microalgas.

En algunos ejemplos, las microalgas son del género *Parachlorella*, como un ejemplo no limitativo. En algunos casos, la célula se selecciona de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijerinckii*. Los ejemplos incluyen aquellos en donde el polisacárido está enriquecido para al menos un monosacárido en comparación con un polisacárido endógeno producido por una célula no transgénica de la misma especie. El monosacárido se puede seleccionar entre arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, manosa, xilosa, ácido glucurónico, glucosamina, galactosamina, ramnosa y N-acetil glucosamina.

En algunos aspectos, la divulgación incluye un polisacárido de microalgas innovador, como el de las microalgas del género *Parachlorella*, que comprende cantidades detectables de ramnosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa. En algunos ejemplos, el polisacárido de microalgas comprende además cantidades detectables de ácido glucurónico. En algunos ejemplos, las microalgas han sido modificadas nutricionalmente dando como resultado un perfil diferente de monosacáridos en el polisacárido de la microalga.

En las composiciones de la invención, el polisacárido de microalgas comprende 15-55 por ciento en moles de ramnosa; 3-30% de moles de xilosa; 1-25 por ciento de moles de manosa; 1-45% de moles de galactosa; y 0,5-10 % de moles de glucosa. En otras realizaciones, el polisacárido de microalgas comprende además aproximadamente 22 por ciento de moles de arabinosa. En las composiciones de la invención, el polisacárido de microalgas comprende además 0,1-15 por ciento de moles de ácido glucurónico.

En otras realizaciones, el polisacárido de microalgas comprende 17-35 por ciento de moles de ramnosa; 4-13 por ciento de moles de xilosa; 8-16 por ciento de moles de manosa; 30-43 por ciento de moles de galactosa; y 2,5-8 por ciento de moles de glucosa.

En algunas realizaciones, el polisacárido de microalgas es de *Parachlorella kessleri* y comprende aproximadamente 52,8 por ciento de moles de ramnosa; aproximadamente 26,6 por ciento de moles de xilosa; aproximadamente 9,8 por ciento de moles de ácido glucurónico; aproximadamente 2,2 por ciento de moles de manosa; aproximadamente 7,5

por ciento de moles de galactosa; y aproximadamente 1,0 por ciento de moles de glucosa. En otras realizaciones, el polisacárido de microalgas de *Parachlorella kessleri* comprende aproximadamente 33,0 por ciento de moles de ramnosa; aproximadamente 12,9 por ciento de moles de xilosa; aproximadamente 3,9 por ciento de moles de ácido glucurónico; aproximadamente el 15,4 por ciento de moles de manosa; aproximadamente 31,8 por ciento de moles de galactosa; aproximadamente 2,9 por ciento de moles de glucosa.

En otras realizaciones, el polisacárido de microalgas es de *Parachlorella beijerinckii* y comprende aproximadamente 50,1 por ciento de moles de ramnosa; aproximadamente 31,2 por ciento de moles de xilosa; aproximadamente 11,5 por ciento de moles de ácido glucurónico; aproximadamente 1,4 por ciento de moles de manosa; aproximadamente 4,3 por ciento de moles de galactosa; y aproximadamente 1,4 por ciento de moles de glucosa. En otras realizaciones, el polisacárido de microalgas de *Parachlorella beijerinckii* comprende 27,0-31,4 por ciento de moles de ramnosa; 11,4-16,3 por ciento de moles de xilosa; 0-5,4 por ciento de moles de ácido glucurónico; 18,5-18,8 por ciento de moles de manosa; 30,5-35,2 por ciento de moles de galactosa; 2,7-2,9 por ciento de moles de glucosa.

En otras realizaciones más, el polisacárido de microalgas es de *Chlorella sorokiniana* y comprende aproximadamente 21,6 por ciento de moles de arabinosa; aproximadamente 17,3 por ciento de moles de ramnosa; aproximadamente 4,0 por ciento de moles de xilosa; aproximadamente 0,3 por ciento de moles de ácido glucurónico; aproximadamente 7,1 por ciento de moles de manosa; aproximadamente 42,0 por ciento de moles de galactosa; y aproximadamente 7,8 por ciento de moles de glucosa.

#### V. Composiciones cosmeceúticas y aplicación tópica

##### A. General

Las composiciones, que comprenden polisacáridos, extractos de células enteras o mezclas de polisacáridos y extractos de células enteras, se proporcionan para aplicación tópica o administración no sistémica. El polisacárido puede ser cualquier uno o más de los polisacáridos de microalgas divulgados aquí, incluidos los producidos por una especie, o una combinación de dos o más especies. De manera similar, un extracto celular entero puede ser el preparado a partir de una especie de microalgas, o una combinación de dos o más especies. En algunas realizaciones de la invención como se reivindica y ejemplos de la divulgación, polisacáridos, tales como exopolisacáridos, y extractos celulares de microalgas de los géneros *Chlorella* o *Parachlorella* se utilizan en la práctica de la invención. Una composición de la invención puede comprender entre aproximadamente 0,001% y aproximadamente 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, y/o extracto celular, en peso.

En una realización preferida, una composición de la invención puede comprender aproximadamente 0,01%, aproximadamente 0,02%, aproximadamente 0,03%, aproximadamente 0,04%, aproximadamente 0,05%, aproximadamente 0,06%, aproximadamente 0,07%, aproximadamente 0,08%, aproximadamente 0,09%, aproximadamente 0,10 %, aproximadamente 0,11%, aproximadamente 0,12%, aproximadamente 0,13%, aproximadamente 0,14%, aproximadamente 0,15%, aproximadamente 0,16%, aproximadamente 0,17%, aproximadamente 0,18%, aproximadamente 0,19% o aproximadamente 0,20% de polisacárido en peso. En otra realización preferida, una composición de la invención puede comprender desde aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,30%, aproximadamente 0,35%, aproximadamente 0,40%, aproximadamente 0,45%, aproximadamente 0,50%, aproximadamente 0,55%, aproximadamente 0,60%, aproximadamente 0,65%, aproximadamente 0,70%, aproximadamente 0,75%, aproximadamente 0,80%, aproximadamente 0,85%, aproximadamente 0,90%, aproximadamente 0,95%, aproximadamente 1%, aproximadamente 1,5%, aproximadamente 2%, aproximadamente 2,5%, aproximadamente 3%, aproximadamente 3,5%, aproximadamente 4%, aproximadamente 4,5%, aproximadamente 5%, aproximadamente 5,5%, aproximadamente 6,0%, aproximadamente 6,5%, aproximadamente 7%, aproximadamente 7,5%, aproximadamente 8%, aproximadamente 8,5%, aproximadamente 9%, aproximadamente 9,5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente 14%, aproximadamente 15%, aproximadamente 16%, aproximadamente 17%, aproximadamente 18%, aproximadamente 19%, aproximadamente 20%, aproximadamente 21%, aproximadamente 22%, aproximadamente 23%, aproximadamente 24%, aproximadamente 25%, aproximadamente 26%, aproximadamente 27%, aproximadamente 28%, aproximadamente 29%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o aproximadamente 100% de polisacárido en peso.

En otras realizaciones, la composición comprende un portador adecuado para la administración tópica y/o un conservante adecuado para la administración tópica; Del género *Parachlorella* o *Chlorella*. En realizaciones adicionales, el portador es adecuado para la administración tópica a seres humanos, tal como a la piel humana o a un tejido de la piel.

En realizaciones alternativas de la invención como se reivindica y ejemplos de la divulgación, una composición para aplicación a piel humana puede comprender un polisacárido aislado de células del género *Parachlorella* o *Chlorella*. Dicha composición puede comprender además un portador y/o conservante adecuado para la administración tópica como se describe aquí. En algunos casos, el polisacárido de la composición no contiene más de aproximadamente un 10% de proteína en peso. En otras realizaciones, el polisacárido no contiene más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 2%, o no más de aproximadamente 1% de proteína en peso. El polisacárido también puede estar esencialmente, o completamente, libre de proteína, como se puede detectar mediante métodos de ensayo como se describe aquí después del tratamiento para eliminar proteína.

En otros ejemplos, el polisacárido puede comprender una cantidad molar de glucosa que es al menos aproximadamente 5%, 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%, 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%, cantidad molar de al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en arabinosa, ácido galacturónico, fucosa y N-acetil glucosamina. Opcionalmente, el polisacárido contiene menos de un 0,1%, o menos de un 0,01% de la cantidad molar de cada uno de arabinosa, fucosa y N-acetil glucosamina.

En otras realizaciones adicionales, los polisacáridos son exopolisacáridos sulfatados que contienen al menos aproximadamente 0,05% de azufre, al menos aproximadamente 0,1% de azufre, al menos aproximadamente 0,15% de azufre, al menos aproximadamente 0,2% de azufre, al menos aproximadamente 0,25% de azufre, al menos aproximadamente 0,3% de azufre, al menos aproximadamente 0,35% de azufre, al menos aproximadamente 0,4% de azufre, al menos aproximadamente 0,45% de azufre, al menos aproximadamente 0,5% de azufre, al menos aproximadamente 0,55% de azufre, al menos aproximadamente 0,6% de azufre, al menos aproximadamente 0,65% de azufre, al menos aproximadamente 0,7% de azufre, al menos aproximadamente 0,75% de azufre, al menos 0,8% de azufre, al menos 0,9% de azufre, al menos 1% de azufre, al menos 2% de azufre, al menos 3% de azufre, al menos 4% de azufre, al menos 5% de azufre, al menos 6% de azufre, al menos 7% de azufre, al menos 8% de azufre, al menos 9% de azufre o al menos 10% de azufre en peso del polisacárido. La cantidad o nivel de sulfatación en los polisacáridos puede analizarse y compararse con la cantidad de sulfatos utilizados para cultivar las microalgas. Por lo tanto, la cantidad o el nivel de sulfatación en los polisacáridos de células cultivadas a menos de 50 mM, a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 500 mM, aproximadamente 600 mM, aproximadamente 700 mM o más, el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) puede determinarse por métodos rutinarios y repetitivos divulgados aquí. La cantidad o el nivel de azufre en peso en los polisacáridos de una muestra de células o material celular se puede determinar sin conocer la cantidad de sulfato utilizado para cultivar las células.

En otra realización, los polisacáridos se someten a sulfatación química para producir un polisacárido con un alto grado de sulfatación. Los procesos de sulfatación química son bien conocidos en la técnica y son adecuados para su uso en la presente invención. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 2,599,564 describe métodos de sulfatación química usando ácido clorosulfónico y piridina. La Patente de Estados Unidos No. 2,755,275 describe un método de sulfatación de quitina que usa ácido clorosulfónico o trióxido de azufre como agente de sulfatación en un disolvente inerte tal como dicloroetano u otros alcanos halogenados líquidos. La Patente de Estados Unidos No. 4,814,437 describe métodos para generar polisacáridos sulfatados usando ácido piridina-clorosulfónico, pero con un pretratamiento con un agente reductor para minimizar los sustituyentes de piridinio durante la preparación de polisacáridos sulfatados. Se demostró que este método logra entre el 13%-18% de contenido de azufre en el polisacárido. En un ejemplo, la divulgación comprende polisacáridos de *Parachlorella* o *Chlorella* con más del 2%, más del 5% y más del 10% de azufre en peso logrado a través de los métodos de sulfatación química descritos aquí.

Como una alternativa adicional, una composición para aplicación tópica en piel humana puede comprender células de microalgas. Las células pueden ser las del género *Parachlorella* o *Chlorella* o cualquier otra especie o cepa como se divulga aquí. Opcionalmente, la composición comprende además un portador y/o conservante adecuado para la administración tópica como se describe aquí. En ejemplos alternativos, las células se homogeneizan (como por los métodos descritos aquí) para generar o formar un homogeneizado de células de microalgas. En algunos casos, las células u homogenados de estas, y por lo tanto la composición, están esencialmente libres de coloración roja y/o verde.

En realizaciones adicionales, la invención divulgada incluye una composición que comprende polisacáridos en partículas según se reivindica, tales como microperlas o nanopérlas que comprenden un polisacárido divulgado. En algunas realizaciones, las partículas de polisacárido se denominan microesferas de ácido Algurónico™. La composición puede ser para mejorar el aspecto de la piel, tal como la piel humana. Los polisacáridos pueden tener cualquier nivel de sulfatación descrito aquí. La composición puede ser estéril y/o no pirogénica y de manera opcional sustancialmente libre de endotoxinas y/o proteínas. En otras realizaciones, la composición comprende además ácido hialurónico u otro agente adecuado o deseable para el tratamiento de la piel. Los ejemplos no limitantes de dicho

agente incluyen aloe vera, urea, ácido alfa hidroxilo, vitamina E, ácido glicirricínico, metilsulfonilmetano (MSM) y colágeno.

5 En algunas realizaciones, la composición comprende un polisacárido de algas como se reivindica, en donde el polisacárido: (a) se ha hecho total o parcialmente insoluble en agua a través del secado; y (b) ha sido homogeneizado o molido o perturbado para generar partículas.

10 El polisacárido puede ser, por supuesto, el de una diversidad de células de microalgas, como las de los géneros Parachlorella o Chlorella. 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. En una realización, los polisacáridos en partículas de una especie del género Parachlorella se formulan en al menos uno de los siguientes compuestos: Cerapil (etilhexil palmitato), Aerosil (sílice dimetil sililato), butilenglicol y un conservante como diocida, dowicil 200, y metil parabeno. En algunas realizaciones, las concentraciones de polisacáridos en partículas formuladas de una especie del género Parachlorella están entre Cerapil al 50-97% (etilhexil palmitato), Aerosil al 1-5% (sílice dimetil sililato), butilenglicol al 0,1-3% y 0,1-3% de un conservante como diocida, dowicil 200 y metilparabeno. La composición también puede comprender un portador y/o conservante adecuado para la administración tópica. La composición también puede estar sustancialmente libre de endotoxinas y/o proteínas, así como estéril y/o no pirogénica. En realizaciones adicionales, el polisacárido está encapsulado por un recubrimiento de liberación controlada, tal como uno adecuado para la aplicación tópica en la piel humana.

20 En otra realización, los polisacáridos de una especie del género Parachlorella se formulan con al menos uno de los siguientes compuestos: ciclopentasiloxano, polímero entrecruzado de vinil dimeticona, polimetil metacrilato, isodeocecano, hectorita de disteardimonio, fitoeno, fitoflueno, vitamina C, vitamina E. La composición también puede comprender un portador y/o conservante adecuado para la administración tópica. La composición también puede comprender una fragancia. La composición también puede estar sustancialmente libre de endotoxinas y/o proteínas, así como estéril y/o no pirogénica. En realizaciones adicionales, el polisacárido está encapsulado por un recubrimiento de liberación controlada, tal como uno adecuado para la aplicación tópica en la piel humana.

25 En otra realización más, los polisacáridos de una especie del género Parachlorella o Chlorella se formulan con al menos uno de los siguientes compuestos: agua, hialuronato de sodio, betaína, EDTA trisódica, glicerina, butilenglicol, anfisol K, manteca de karité, aceite de macadamia, estearato de isocetilo, aceite de oliva, diestearato de PEG 150, grancil VX401, monoestearato de glicerilo, polietileno, Granpowder USQ, Gransil PSQ, diocida y fragancia.

30 Opcionalmente, la composición se prepara mediante un método de fabricación o preparación tal como se describe aquí, tal como un método divulgado en la siguiente sección de métodos de formulación. En algunos casos, la composición comprende un polisacárido que es parcial o completamente insoluble en agua, tal como calentando una suspensión acuosa del polisacárido, eliminando así el agua de la suspensión. Las partículas de polisacárido pueden ser parcialmente solubles, de modo que sean 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%, o menos de aproximadamente 2% soluble en agua.

35 En otras realizaciones, el polisacárido se ha hecho parcial o completamente insoluble por un método seleccionado del grupo que consiste en entrecruzamiento químico, deshidratación química a través del desplazamiento de agua enlazada por un alcohol, precipitación de la solución usando un alcohol o una cetona o pH, y recubrimiento de partículas por microencapsulación. Las personas experimentadas en la técnica conocen ejemplos no limitativos de estos métodos y se pueden usar en la práctica de la invención. Para ejemplos, véase Biomacromolecules. 2005 Nov-Dec;6(6):3202-8; Arterioscler Thromb Vasc 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; Biomacromolecules. 2004 Jan-Feb;5(1):126-36; Contraception. 2002 Aug;66(2):137-40; Biomacromolecules. 2006 May;7(5):1471-80; Biopolymers. 1999 Sep;50(3):227-37; Biomaterials. 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 el entrecruzamiento químico a un material en fase sólida insoluble farmacéutica o cosméticamente aceptable, 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. Los ejemplos no limitantes incluyen etanol o un alcohol graso tal como alcohol cetílico, estearílico, cetearílico o alcohol de lanolina. Un método no limitativo de microencapsular un cosmético se describe en la Patente de Estados Unidos 4,752,496.

40 El uso de un método divulgado de la invención también incluye la molienda de material de polisacárido seco (tal como una película) en partículas por cualquier método adecuado. Los ejemplos no limitativos de tales métodos se divulgan aquí, y producen partículas con un tamaño promedio que puede oscilar entre aproximadamente 400 y aproximadamente 0,1 micrómetros (micras).

65

En algunas realizaciones, la composición comprende partículas de polisacárido que aumentan de volumen en 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 1.000%, o al menos aproximadamente 5.000%.

Cuando las partículas de polisacárido entran en contacto con el agua, la solución de agua/polisacárido aumentará su viscosidad. En algunas realizaciones, los polisacáridos de microalgas purificados y secos que se resuspenden en agua a una concentración de 1% p/v tienen una viscosidad de entre 0,5 Pascal segundos (Pa.s) (500 cP) y 1 Pa.s (1.000 cP). En otras realizaciones, los polisacáridos de microalgas purificados y secos que se resuspenden en agua a una concentración de 1% p/v tienen una viscosidad superior a 1 Pa.s (1.000 cP).

Las composiciones tópicas se formulan usualmente con un portador, tal como en un ungüento o una crema, y pueden incluir opcionalmente una fragancia. Una clase no limitante de composiciones tópicas es la de cosmeceúticos. Otros ejemplos no limitantes de formulaciones tópicas incluyen geles, soluciones, vendajes impregnados, liposomas o microcápsulas biodegradables, así como lociones, aspersores, aerosoles, suspensiones, polvos secantes, vendajes y apósitos impregnados, polímeros biodegradables y piel artificial. Otro ejemplo no limitante de una formulación tópica es el de una preparación oftálmica. Los portadores 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 puede formularse con una loción o crema adecuada que contenga el compuesto activo suspendido o disuelto en un portador. Los portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

En algunas realizaciones, los polisacáridos contienen unidades estructurales de fucosa. En otras realizaciones, los polisacáridos están sulfatados, tal como los exopolisacáridos de las microalgas del género *Parachlorella*. En algunas realizaciones, los polisacáridos serán los de una especie de *Parachlorella*, tal como una que ha sido sometida a manipulación genética y/o nutricional para producir polisacáridos con contenido de monosacáridos alterados y/o sulfatación alterada.

En ejemplos adicionales, una composición de la divulgación comprende un homogeneizado de células de microalgas y un portador tópico.

## 35 B. Métodos de formulación

Las composiciones de polisacáridos para aplicación tópica se pueden formular preparando primero una preparación purificada de polisacárido. Como ejemplo no limitativo, el polisacárido del medio de crecimiento acuoso se precipita con un alcohol, se resuspende en un regulador diluido y se mezcla con un portador adecuado para la aplicación a la piel humana o al tejido mucoso, incluido 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 describe anteriormente. Los polisacáridos intracelulares también pueden formularse de manera similar o idéntica después de la purificación de otros componentes celulares.

45 Como ejemplo, la divulgación incluye un método para formular una composición cosmeceútica, comprendiendo dicho método cultivar células de microalgas en suspensión bajo condiciones que permitan 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; separar las moléculas de exopolisacáridos de otras moléculas presentes en los medios de cultivo; homogeneizar las células de microalgas; y añadir las moléculas separadas de exopolisacáridos a las células antes, durante o después de la homogeneización. En algunas realizaciones, las células de microalgas son del género *Parachlorella*. En otras realizaciones, las células de microalgas se cultivan bajo condiciones heterótrofas.

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

60 Por supuesto, el método se puede practicar con una variedad de células de microalgas capaces de producir polisacáridos cuando se cultivan bajo condiciones heterótrofas, como las de los géneros *Parachlorella* y *Chlorella*.

65 Como se describe aquí, la composición resultante puede ser para mejorar la apariencia de la piel, tal como la piel humana. En algunas realizaciones, la formulación puede estar 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 portador y/o conservante adecuado para la administración tópica. La composición resultante también puede estar sustancialmente libre de endotoxinas y/o proteína. En muchas realizaciones, la composición también se hace estéril y/o no pirogénica. Alternativamente, el método comprende además formular ácido hialurónico en la composición.

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 en un porcentaje seleccionado de la lista que consta de 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%.

Las realizaciones de la etapa de secado incluyen el secado realizado entre aproximadamente 40 y aproximadamente 180 °C, tal como entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 170 °C, o entre aproximadamente 100 °C y aproximadamente 160 °C, entre aproximadamente 125 °C y aproximadamente 155 °C, entre aproximadamente 135 °C y aproximadamente 152 °C, entre aproximadamente 140 °C y aproximadamente 150 °C, o entre aproximadamente 145 °C y aproximadamente 148 °C como ejemplos no limitantes. Opcionalmente, el secado se realiza en dos etapas, en donde la primera etapa comprende calentar la suspensión del polisacárido a no más de aproximadamente 60 °C durante un primer período de tiempo para producir una película sólida, seguido de calentamiento de la película sólida durante un segundo período de tiempo a no más de unos 160 °C. En realizaciones alternativas, la primera y segunda etapas comprenden calentamiento a no más de aproximadamente 80 °C y no más de aproximadamente 150 °C, o a aproximadamente 100 °C 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.

Después de la etapa de secado, la molienda puede ser por cualquier método adecuado. Los ejemplos no limitativos incluyen un método seleccionado de la lista que consiste en molienda por chorro, molienda por bolas, molienda Retsch® y molienda en un dispositivo Quadro®. Las partículas resultantes de la composición pueden tener un tamaño promedio entre aproximadamente 400 y aproximadamente 0,1 micrómetros (micras). En algunas realizaciones, las partículas de la composición tienen un tamaño promedio entre aproximadamente 100 y aproximadamente 0,1 micrómetros (micras), entre aproximadamente 50 y aproximadamente 0,1 micrómetros (micras), entre aproximadamente 10 y aproximadamente 0,1 micrómetros (micras), entre aproximadamente 10 y aproximadamente 0,5 micrómetros (micras), o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 0,5 micrómetros (micras).

Los ejemplos de portadores adecuados para formular polisacáridos se describen anteriormente. Las proporciones de homogenado:portador están típicamente en el intervalo de aproximadamente 0,001:1 a aproximadamente 1:1 (volumen:volumen), aunque la invención comprende proporciones fuera de este intervalo, tales como, pero sin ser limitadas a, aproximadamente 0,01:1 y aproximadamente 0,1:1. En algunas realizaciones, la proporción de polisacárido purificado:portador está en el intervalo de aproximadamente 0,001:1 a aproximadamente 1:1 (volumen:volumen), aunque la invención comprende proporciones fuera de este intervalo, tales como, pero sin ser limitadas a, 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 rompan física o químicamente como parte del proceso de formulación. Por ejemplo, las células pueden centrifugarse a partir del cultivo, lavarse con un regulador como solución salina regulada con fosfato 1,0 mM, pH 7,4 y someterse a sonicación. Preferiblemente, las células se someten a sonicación hasta que las paredes celulares se han perturbado sustancialmente, como se puede determinar con un microscopio.

Las células también se pueden secar y moler con medios tales como mortero y mano, molienda coloidal, molienda por bola u otro método físico para romper paredes celulares.

Después de la perturbación celular, el homogeneizado celular puede formularse con portador y fragancia como se describió anteriormente para polisacáridos.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención también se pueden usar como agentes para el tratamiento del cabello tales como apósitos para el cabello (por ejemplo, cremas para el cabello, lacas para el cabello, tónicos para el cabello, geles para el cabello, lociones para el cabello, aceites para el cabello, esencias para el cabello, agua para el cabello, ceras para el cabello, y espumas para el cabello), champús, enjuagues de acabado, tratamientos para el cabello, cremas para el cabello, espumas para el cabello, lociones para secado del cabello, colores para el cabello, tinturas para el cabello (por ejemplo, colores para el cabello, tinturas para el cabello de una parte y tinturas para el cabello en dos partes), soluciones permanentes (por ejemplo, soluciones de ondas permanentes, soluciones de alisado del cabello y agentes de soporte de ondas permanentes), potenciadores del flujo sanguíneo, lociones para el cuero cabelludo y agentes contra la pérdida del cabello. Otras aplicaciones de las composiciones de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, cosméticos para el cuidado de la piel tales como tónicos, sueros, tónicos blanqueadores, lociones lechosas, lociones lechosas blanqueadoras, cremas, cremas blanqueadoras, ungüentos,

ungüentos blanqueadores, lociones, lociones blanqueadoras, aceites y paquetes faciales. Además, aún otras aplicaciones de las composiciones de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, cosméticos para maquillaje tales como bases, bases líquidas, lápices labiales, brillos labiales, bálsamos hidratantes para los labios, sombras para ojos, polvos, polvos faciales, rubores, sombras para ojos, delineadores para ojos, rímel y lápices para cejas. Otras aplicaciones de las composiciones de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, limpiadores para la piel tales como jabón, cremas limpiadoras, lociones limpiadoras, leches limpiadoras, almohadillas limpiadoras, composiciones cosméticas, enjuagues faciales y champús corporales. Además, otra aplicación de las composiciones de acuerdo con la presente invención es en cosméticos de acabado para su uso en, por ejemplo, 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 de dientes, enjuagues de dientes y enjuagues bucales.

En algunas realizaciones, el polisacárido de microalgas aislado se puede formular para consumo humano. En algunos casos, el polisacárido aislado puede formularse en productos alimenticios como un ingrediente alimentario. En tales casos, el polisacárido aislado se cultiva, se aísla y se formula bajo condiciones GMP. En los Estados Unidos, las regulaciones GMP para la fabricación, empaque o almacenamiento de alimentos para humanos están codificadas en 21 C.F.R. 110. Las condiciones GMP en los Estados Unidos, y condiciones equivalentes en otras jurisdicciones, se aplican para determinar si un alimento está adulterado (el alimento ha sido fabricado bajo condiciones tales que no es apto como alimento) o si se ha preparado, envasado o mantenido bajo condiciones insalubres tales que pueden haberse contaminado o haber sido perjudiciales para la salud. Las condiciones de GMP pueden incluir adherirse a las regulaciones que rigen: control de enfermedades; limpieza y entrenamiento del personal; mantenimiento y operación sanitaria de edificios e instalaciones; provisión de instalaciones sanitarias adecuadas y alojamiento; diseño, construcción, mantenimiento y limpieza de equipos y utensilios; la provisión de procedimientos de control de calidad apropiados para garantizar que se tomen todas las precauciones razonables al recibir, inspeccionar, transportar, segregar, preparar, fabricar, envasar y almacenar productos alimenticios de acuerdo con los principios de saneamiento adecuados para evitar la contaminación de cualquier fuente; y el almacenamiento y transporte de alimentos terminados bajo condiciones que protejan los alimentos contra la contaminación física, química o microbiana indeseable, así como contra el deterioro de los alimentos y del recipiente.

En algunas realizaciones, el polisacárido aislado de microalgas de la presente invención puede estar en forma de carbohidratos solubles e insolubles en forma de fibra dietética. En tales casos, el polisacárido puede formularse en una variedad de productos alimenticios como ingrediente alimentario para agregar o aumentar los niveles de fibra dietética en el producto alimenticio. En otras realizaciones, el polisacárido puede formularse en productos alimenticios como espesante o como emulsionante.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención incluyen productos cosméticos acabados para administración oral o tópica. Combinaciones de diversos agentes adecuados o deseables para el tratamiento de la piel pueden incluirse en tales productos cosméticos terminados. Por ejemplo, las composiciones para administración tópica pueden incluir polisacáridos de algas, carotenoides de algas, vitaminas (por ejemplo, vitamina C, vitamina E, vitamina D o precursores de vitamina D), ácido salicílico, aminoácidos (por ejemplo, tirosina), derivados de aminoácidos (por ejemplo, N-acetil metionina), betaína, perfluoropolíéters, extractos de algas de células enteras, dihidroxiacetona, Rhodiola rosea, mentol y factor respiratorio tisular. Las composiciones para administración oral pueden incluir, por ejemplo, aceites de pescado, aceites de algas, vitaminas (por ejemplo, vitamina C, vitamina D, vitamina E), carotenoides, astaxantina, zeoxantina, aminoácidos (por ejemplo, tirosina), Rhodiola rosea, extractos de células enteras de algas y betaína. Estos componentes pueden combinarse con portadores adecuados, así como aceites esenciales, aceites de fragancia, aceites de sabor, aceites de semillas, ingredientes botánicos, extractos de plantas, extractos de CO<sub>2</sub>, jabones, arcillas, colorantes, dióxido de titanio, micas, hierbas para teñir, brillos, exfoliantes, semillas de frutas, fibras, polvos de granos, harinas de frutos secos, harinas de semillas, perlas de aceite, perlas de cera, hierbas, hidrosoles, vitaminas, polvos de leche, conservantes, antioxidantes, tocoferoles, sales, azúcares, aceites vegetales, ceras, glicerina, vegetales marinos, aceites nutritivos, aceites humectantes, mantecas vegetales, propilenglicol, parabenos, miel, cera de abejas, aloe, polisorbato, almidón de maíz, cacao en polvo, coral en polvo, humectantes, gomas, agentes emulsionantes y/o espesantes.

En algunas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la presente invención incluyen polisacáridos de algas como se reivindica en combinación con al menos otro ingrediente seleccionado del grupo que consiste en betacaroteno, luteína, astaxantina, vitamina C, vitamina E, vitamina A, coenzima Q10, un péptido, un péptido acilado, ácido  $\alpha$ -hidroxi soluble en aceite, un lactato de alquilo y ácido salicílico. Los polisacáridos y otros ingredientes pueden combinarse y someterse a procesamiento (por ejemplo, secado, calentamiento, micronización, molienda y similares) para formar partículas que comprenden los múltiples componentes para uso en cosméticos, cuidado de la piel, nutracéuticos u otros productos.

En otras realizaciones, las composiciones de acuerdo con la presente invención incluyen polisacáridos de algas como se reivindica en combinación con al menos otro ingrediente seleccionado del grupo que consiste en agua, hialuronato de sodio, EDTA, glicerina, manteca de karité, aceite de macadamia, estearato de isocetilo, aceite de oliva, butilenglicol, anísol K, diestearato de PEG 150 y polietileno. Opcionalmente, la composición puede incluir una fragancia.

En un aspecto, la invención está dirigida a ingredientes cosméticos, que incluyen polisacáridos de algas encapsulados en microesferas y soluciones acuosas de tales polisacáridos de algas microencapsulados. En algunas realizaciones, las soluciones acuosas pueden incluir desde 0,01% a 10% p/p de polisacáridos de algas microencapsulados. Las microesferas pueden formularse para liberar los contenidos de polisacáridos de algas tras la aplicación tópica, por ejemplo, en la piel humana, en donde los polisacáridos se hinchan en contacto con la humedad de la piel para reducir la aparición de arrugas en la piel. En algunas realizaciones, cuando los polisacáridos de microalgas se hicieron parcialmente insolubles y se molieron en perlas con un diámetro promedio de menos de 10 micrones, las perlas de polisacáridos se pueden hinchar hasta al menos 2 veces su volumen cuando están en contacto con el agua, en comparación con el volumen de la perla de polisacárido seca. En otras realizaciones, las perlas de polisacárido se hinchan hasta al menos 5 veces el volumen o en contacto con agua.

### 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 suministrados a través de los capilares no pueden alcanzar las capas externas de las células. Las capas externas de las células deben proporcionarse con nutrientes a través de la administración tópica. Sin embargo, la administración tópica no siempre es un método eficaz para proporcionar nutrientes a las capas profundas de la piel que contienen células vivas. Las composiciones proporcionadas aquí comprenden composiciones tópicas que contienen polisacáridos de algas y/o extractos celulares como también composiciones orales que comprenden moléculas nutracéuticas tales como polisacáridos purificados, extractos de células enteras, 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 aditivo o sinérgico en comparación con el uso de solo un producto tópico o solo un producto administrado por vía oral.

Los ejemplos de los componentes tópicos de la composición incluyen exopolisacáridos de *Chlorella sp.*, *Parachlorella kessleri*, *Parachlorella beijerinckii*, u otras microalgas que son capaces de producir exopolisacáridos (polisacáridos de alto peso molecular que se secretan en el medio de cultivo) cuando se cultivan bajo condiciones heterótrofas. Otros componentes de la composición tópica pueden incluir polisacáridos y/o extractos celulares de microalgas cultivadas heterotróficamente.

Los ejemplos de composiciones para administración oral incluyen uno o más de los siguientes: DHA, EPA, ARA, aceite de microalgas, ácido lineoleico, luteína, licopeno, betacaroteno, braunixantina, zeaxantina, astaxantina, ácido linoleico, alfa caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), coenzima Q10, vitamina D, vitamina E y superóxido dismutasa. Las composiciones para administración oral usualmente incluyen un portador tal como los descritos anteriormente. Las composiciones orales se pueden formular en forma de comprimidos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden formularse 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, al menos 500 miligramos y al menos un gramo de una molécula pequeña como un carotenoide o un ácido graso poliinsaturado.

En otro aspecto, la divulgación incluye composiciones nutracéuticas administradas por vía oral que comprenden uno o más polisacáridos, o extracto de células de microalgas u homogenados, de la divulgación. Una composición nutracéutica sirve como un suplemento nutricional en el consumo. En otras realizaciones, un nutracéutico puede ser bioactivo y servir para afectar, alterar o regular una bioactividad de un organismo.

Un nutracéutico puede estar en forma de una formulación sólida o líquida. En algunas realizaciones, una formulación sólida incluye una formulación de cápsula o comprimido como se describe anteriormente. En otras realizaciones, un nutracéutico sólido puede ser simplemente un extracto u homogenado seco de microalgas, así como polisacáridos secos per se. En formulaciones líquidas, la divulgación incluye suspensiones, así como soluciones acuosas, de polisacáridos, extractos u homogenados. En algunas realizaciones, el nutracéutico se deriva de microalgas, mientras que en otras realizaciones el nutracéutico se deriva de otras fuentes 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 de la divulgación incluyen un método para producir una composición nutracéutica. Dicho método puede comprender secar un homogenado de células de microalgas o un extracto celular. El homogenado puede producirse por la perturbación de microalgas que se han separado de los medios de cultivo utilizados para propagar (o cultivar) las microalgas. Así, en un ejemplo, un método de la invención comprende cultivar microalgas rojas; separando las microalgas de los medios de cultivo; perturbando las microalgas para producir un homogenado; y secando el homogenado. En ejemplos similares, un método de la divulgación puede comprender secar uno o más polisacáridos producidos por las microalgas.

En algunos ejemplos, un método de la divulgación comprende secado por secado en bandeja, secado por centrifugación, secado por rotación, secado instantáneo por centrifugación o liofilización. En otras realizaciones, los métodos de la invención comprenden la perturbación de microalgas por un método seleccionado de perturbación de presión, sometido a sonicación, molienda por chorro y molienda por bolas.

5 En ejemplos adicionales, un método de la divulgación comprende además la formulación del homogenado, extracto o polisacáridos con un portador adecuado para el consumo humano. Como se describe aquí, la formulación puede ser la de la formación de comprimidos o la encapsulación del homogenado o extracto.

10 En ejemplos adicionales, los métodos comprenden el uso de homogenados, extractos o polisacáridos de microalgas en donde las células contienen una secuencia de ácido nucleico exógena, como en el caso de las células modificadas descritas aquí. 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 endógenos de microalgas.

15 En una realización preferida, en la composición tópica y en la composición oral ambas contienen en común al menos una molécula o un tipo de molécula (como los carotenoides). Por ejemplo, la composición tópica contiene homogenado de células de *Parachlorella* que contienen zeaxantina y la composición oral contiene zeaxantina. En otra realización, la composición tópica contiene homogenado de células de *Parachlorella* que contienen polisacárido, y la composición oral contiene polisacárido purificado a partir de medios de cultivo de *Parachlorella*. En otra realización, tanto la  
20 composición tópica como la composición oral contienen luteína y/o zeaxantina. Las microalgas pueden, pero no necesariamente, ser la fuente de luteína y zeaxantina, o ambas. En algunas realizaciones, la dosificación diaria de la composición oral es de aproximadamente 10 mg de luteína y aproximadamente 0,6 mg de zeaxantina por día y la dosificación diaria de la composición tópica es de aproximadamente 100 ppm de luteína y aproximadamente 12 ppm de zeaxantina en un líquido libre de aceite. En otras realizaciones, las composiciones orales y tópicas comprenden  
25 carotenoides tales como al menos uno de fitoeno, fitoflueno, betacaroteno, luteína, zeaxantina y astaxantina.

En una realización, la composición tópica, opcionalmente derivada o parcialmente derivada de microalgas, comprende los carotenoides fitoeno y fitoflueno y opcionalmente también contiene vitamina C y vitamina E; la composición oral, opcionalmente derivada o parcialmente derivada de microalgas, comprende al menos dos de los siguientes  
30 compuestos: ácido ascórbico, succinato de vitamina E, luteína, zeaxantina, betacaroteno, EPA, DHA y CoQ10. No es necesario que todos los componentes de la composición oral se formulen en el mismo comprimido o cápsula. En algunas composiciones, la composición oral comprende al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6 y al menos 7 de los compuestos mencionados anteriormente. Opcionalmente, las dosificaciones diarias de la composición tópica son aproximadamente 0,1-7% de concentrado de IBR-CLC® (combinación de fitoeno/fitoflueno; Israeli Biotechnology  
35 Research Corp.; Patente de Estados Unidos 6,383,474), vitamina C al 1-20%, vitamina E al 1-20%. Opcionalmente, las dosificaciones diarias para la composición oral son entre 20-600 mg de ácido ascórbico, 20-600 mg de succinato de vitamina E, 0,1-50 mg de luteína, 0,05-30 mg de zeaxantina, 0,1-50 mg de betacaroteno, 5-400 mg de CoQ10, 50-750 mg de EPA, y 20-750 mg de DHA.

40 Algunas de las composiciones aquí descritas se empacan para su venta como una sola unidad. Por ejemplo, una unidad para la venta comprende un primer recipiente que contiene una composición para administración tópica, un segundo recipiente que contiene dosis individuales de una composición para administración oral y, opcionalmente, instrucciones para la coadministración de la composición tópica y oral. En algunas realizaciones, la composición para  
45 administración tópica es una crema, loción, suero, gel, solución, aspensor o ungüento.

Algunos ejemplos de la divulgación incluyen un producto combinado que comprende 1) una primera composición que comprende un extracto de microalgas y un portador adecuado para la aplicación tópica en la piel; y 2) una segunda  
50 composición que comprende al menos un compuesto y un portador adecuado para el consumo humano; en donde la primera y segunda composiciones se empacan para su venta como una sola unidad. Por lo tanto, la divulgación incluye coempaques de las dos composiciones, opcionalmente con instrucciones y/o una etiqueta que indica la identidad de los contenidos y/o su uso adecuado.

Otros productos de combinación se incluyen en la divulgación. En algunos ejemplos, la primera composición puede ser una formulación tópica o una formulación no sistémica, opcionalmente un cosmecéutico, como se describe aquí.  
55 Preferiblemente, la primera composición comprende un portador adecuado para la aplicación tópica sobre la piel, tal como la piel humana. Los ejemplos de la segunda composición incluyen una composición alimenticia o nutraceutica como se describe aquí. Preferiblemente, la segunda composición comprende al menos un portador adecuado para el consumo humano, tal como el presente en un producto o composición alimenticia. Los productos combinados de la divulgación se pueden empaclar por separado para su uso posterior por parte de un usuario o se pueden empaclar  
60 juntos para facilitar la compra y el uso por parte de un consumidor. El empaque de la primera y segunda composiciones puede estar a la venta como una sola unidad.

#### D. Métodos de mejora cosmética

65 En un aspecto adicional, la invención incluye un método según se reivindica para realzar cosméticamente la piel o su apariencia o textura. En algunos casos, la mejora se debe a un aumento o mejora de la elasticidad de la piel. La piel

es la de un ser humano, como la piel de la cara, manos, 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 polisacárido adecuada para inyección en la piel o tejido de los labios para mejorar su apariencia. La composición puede ser cualquiera como se describe en las reivindicaciones adecuadas 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 sabe la persona experimentada, la piel humana, a medida que envejece, pierde gradualmente los componentes de la piel que la mantienen flexible y de aspecto juvenil. Los componentes de la piel incluyen colágeno, elastina y ácido hialurónico, que han sido objeto de interés y uso para mejorar la apariencia del envejecimiento de la piel.

La divulgación incluye composiciones de polisacáridos de microalgas, extractos de células de microalgas y homogenados de células de microalgas para usar de la misma manera que el colágeno y el ácido hialurónico. En algunas realizaciones, los polisacáridos serán los de una especie de Parachlorella. En algunas realizaciones, los polisacáridos se formulan como un fluido, opcionalmente elástico y/o viscoso, adecuado para inyección. Las composiciones se pueden usar como rellenos dérmicos inyectables como un ejemplo no limitante. Las inyecciones se pueden hacer en la piel para rellenar las líneas faciales y arrugas. En otras realizaciones, las inyecciones se pueden usar para la mejora de 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, los extractos celulares y los homogenados celulares de la divulgación pueden coformularse con colágeno y/o ácido hialurónico (como los productos Restylane® y Hylaform®) e inyectarse en el tejido facial. Los ejemplos no limitantes de dicho tejido incluyen debajo de la piel en áreas de arrugas y los labios. En una realización preferida, el polisacárido está sustancialmente libre de proteínas. Las inyecciones pueden repetirse según lo considere apropiado el profesional experimentado, 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 de los géneros Chlorella o Parachlorella antes de la coadministración. La divulgación en esta realización particular proporciona una vida media más larga al ácido hialurónico debido a la potente inhibición de la hialuronidasa por polisacáridos aislados de microalgas del género Parachlorella. Esto permite menos inyecciones a un paciente. Preferiblemente, el polisacárido del género Parachlorella está al menos sustancialmente libre de proteína. Preferiblemente, la mezcla de polisacárido del género Parachlorella 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 mamíferos. La inyección puede ser de una cantidad eficaz para producir una mejora cosmética, tal como disminución de arrugas o disminución de la aparición de arrugas como ejemplos no limitantes. Alternativamente, la inyección puede ser de una cantidad que produzca 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. En un ejemplo, la especie de microalga es del género Parachlorella y el polisacárido está sustancialmente libre de proteína.

La divulgación incluye un método para estimular la síntesis o producción de elastina en una célula, tal como un fibroblasto, poniendo en contacto la célula con un polisacárido divulgado. De una manera relacionada, el polisacárido también puede inhibir la actividad de elastasa producida por una célula, tal como, pero sin limitarse a, 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 polisacárido de la divulgación, en la piel o en 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 una persona experimentada, tal como un aumento de al menos aproximadamente 50%, 100%, aproximadamente 200%, o aproximadamente 300% o más que la observada en ausencia de polisacárido.

De manera relacionada, se usa un polisacárido con base en su efecto antiinflamatorio en la piel o en un tejido de la piel. En algunas realizaciones, el método inhibe los leucocitos polimorfonucleares (PMN) en la quimiotaxis, 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 el interferón gamma o la interleucina-1-alfa. Con el interferón gamma como un ejemplo, la inhibición 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 lo observado en ausencia de polisacárido. Con interleucina-1-alfa como ejemplo, la inhibición puede ser de 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 de sangre periférica, incluyendo 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 del envejecimiento o reducir la apariencia del envejecimiento en la piel humana como se describe aquí. Los métodos también pueden tener como base la idea de que la biomasa de microalgas y polisacáridos de la invención también reducen los efectos de la luz UV o la radiación. En algunas realizaciones, el polisacárido reduce la formación de dímero de timidina en el ADN causado por la exposición a la radiación UVB. La reducción puede ser de 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 pueden usarse para proteger la piel humana o el tejido de los labios de la radiación de luz UV. La radiación UV puede comprender UVA y/o UVB. El método puede comprender aplicar una composición de la invención divulgada a la piel o a un tejido de la piel 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 de dímeros de timidina y/o las quemaduras solares. En una realización alternativa, una composición de la invención puede aplicarse en una cantidad eficaz o suficiente, tal como la que reduce adicionalmente el daño mediado por UV, para tratar la piel que ha sido dañada por la radiación UV. Un ejemplo adicional 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 oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tal 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 pueden emplearse están manitol, agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijos insípidos se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga como Ph. Helv o un alcohol similar.

Las composiciones de polisacáridos inyectables estériles contienen preferiblemente 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 del 0,00001% de proteína, más preferiblemente menos del 0,000001% de proteína.

Debería ser evidente para una persona experimentada en la técnica que pueden realizarse diversas realizaciones y modificaciones a la invención divulgadas en esta solicitud sin apartarse del alcance de las reivindicaciones. Todas las publicaciones mencionadas aquí se citan con el propósito de describir y divulgar reactivos, metodologías y conceptos que se pueden usar en relación con la presente invención. Nada aquí debe interpretarse como una admisión de que estas referencias son de la técnica anterior en relación con las invenciones descritas aquí.

Se hace referencia a las siguientes solicitudes: Solicitud de Patente U.S. No.: 11/336,426, presentada el 19 de enero de 2006, titulada "Polysaccharide Compositions and Methods of Administering, Producing, and Formulating Polysaccharide Compositions"; Solicitud de Patente U.S. No.: 11/337,103, presentada el 19 de enero de 2006, titulada "Methods and Compositions for Improving the Health and Appearance of Skin"; Solicitud de Patente U.S. No.: 11/336,656, presentada el 19 de enero de 2006, titulada "Devices and Solutions for Prevention of Sexually Transmitted Diseases"; Solicitud de Patente U.S. No.: 11/336,428, presentada el 19 de enero de 2006, titulada "Methods and Compositions for Cholesterol Reduction in Mammals"; Solicitud de Patente U.S. No.: 11/337,171, presentada el 19 de enero de 2006, titulada "Methods and Compositions for Reducing Inflammation and Preventing Oxidative Damage"; Solicitud de Patente U.S. No.: 11/336,431, presentada el 19 de enero de 2006, titulada "Methods and Compositions for Thickening, Stabilizing and Emulsifying Foods"; Solicitud de Patente U.S. No.: 11/336,430, presentada el 19 de enero de 2006, titulada "Methods and Compositions for Joint Lubrication"; Solicitud de Patente U.S. No.: 60/832,091, filed July 20, 2006, titulada "Decolorized Microalgal Compositions for Skin Care Products"; Solicitud de Patente U.S. No.: 60/838,452, presentada el 17 de agosto de 2006, titulada "Polysaccharide Compositions and Methods of Administering, Producing, and Formulating Polysaccharide Compositions"; Solicitud de Patente U.S. No.: 60/816,967, presentada el 28 de junio de 2006, titulada "Zeaxanthin Production Methods and Novel Compositions Containing Zeaxanthin"; Solicitud de Patente U.S. No.: 60/872,072, presentada el 30 de noviembre de 2006, titulada "Polysaccharide Compositions and Methods of Administering, Producing, and Formulating Polysaccharide Compositions"; y la Solicitud de patente PCT No: PCT/US2007/001319, presentada el 19 de enero de 2007, titulada "Nutraceutical Compositions from Microalgae and Related Methods of Production and Administration".

**VI. Ejemplos**

Ejemplo 1

5 Crecimiento heterótrofo de microalgas para producir polisacáridos

*Chlorella sorokiniana* (UTEX 1810), *Parachlorella kessleri* (cepa SAG 27.87) y *Parachlorella beijerinckii* (cepa SAG 2046) se inocularon en matraces Erlenmeyer esterilizados en autoclave de 1 litro que contenían un medio nutritivo:

10

Tabla 1. Medios nutritivos.

Componente	Concentración final
NaNO <sub>3</sub>	15 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,17 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,97 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,43 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,28 mM
NaCl	0,43 mM
Extracto de levadura	4g/L
Glucosa	7%
Solución de vitamina	1x (véase a continuación)
Oligominerales	1x (véase a continuación)

Tabla 2. Medios nutritivo.

Vitamina en solución (1.000X)	
<i>Tricina</i>	9 g/L
Tiamina HCl	0,67 g/L
Biotina	0,01 g/L
Cianocobalamina (Vit B 12)	0,008 g/L
Pantotenato de calcio	0,02 g/L
Ácido p-aminobenzoico	0,04 g/L
Mineral traza 100X	
<i>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</i>	0,011 g/L
<i>CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</i>	0,081 g/L
<i>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></i>	0,330 g/L
<i>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	1,400 g/L
<i>MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</i>	0,810 g/L
<i>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</i>	0,039 g/L
<i>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	0,110 g/L
<i>NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</i>	0,013 g/L
VOSO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O (Vanadil (IV))	0,039 g/L
Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Se (selinita de sodio)	0,036 g/L
monohidrato de ácido cítrico	3,00 g/L

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

- 5 Los cultivos de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijerinckii* en matraces de 1 litro se protegieron para evitar la exposición a la luz y se mantuvieron a 28 °C a 200 rpm-1" de duración de abertura durante aproximadamente 90-120 horas, hasta que la concentración de polisacárido en el medio de cultivo alcanzó entre 1-3 g/L. El cultivo de *Chlorella sorokiniana* en matraces de Fernbach de 1 litro se protegió para evitar la exposición a la luz y se mantuvo a 28 °C a 200 rpm-1" de embolado durante aproximadamente 10 días. La concentración final de polisacárido en los medios de cultivo alcanzó entre 1-2 g/l. Todos los cultivos se alimentan para mantener una concentración de glucosa de 1-4%.

#### Ejemplo 2

##### Aislamiento y secado de polisacáridos

- 15 Los cultivos de *Chlorella sorokiniana*, *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijerinckii* se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1. Los cultivos densos se centrifugaron a 16.000 x g a temperatura ambiente durante 30 minutos y los polisacáridos se precipitaron del sobrenadante con alcohol isopropílico al 70% (IPA). IPA y las fibras de polisacárido precipitadas se vertieron sobre un tamiz de malla. Las fibras de polisacárido se recogieron de la malla y se colocaron en una cápsula de pesaje de aluminio y se sometieron a secado en un horno a 60 °C durante un mínimo de dos horas. El polisacárido se secó suficientemente cuando no quedó humedad en la muestra según se determinó al alcanzar un peso constante de la muestra.

- 25 Alternativamente, se aislaron otras muestras del mismo polisacárido del medio de cultivo utilizando filtración por flujo tangencial (TFF). Los filtros utilizados para la recuperación fueron 0,1 µm de PVDF (0,1 m<sup>2</sup>) (Durapore de Millipore Corp. #P2VVPPC01). Antes de su uso, los filtros se lavaron con agua (>5 l). Tras el lavado del filtro, se transfirió el sobrenadante clarificado al tanque de reciclaje, y el sistema se configuró con las líneas de permeado y de retenido dirigidas de nuevo al tanque TFF. La velocidad de la bomba se ajustó de tal manera que la presión de entrada era aproximadamente 48.263 Pa (7 psig) (TMP= 24.131 Pa (3,5 psig) y el permeado se controló a intervalos periódicos para detectar la presencia de polisacárido de longitud completa. Esto se realizó mediante la recolección de una muestra de permeado de 10 ml y agregando 20 ml de IPA, y agitando enérgicamente la solución. Este proceso se continuó (modo de reciclaje a baja presión) hasta que la mayoría del polisacárido ya no apareció en la muestra de permeado (aproximadamente 60-80 minutos). Luego se dirigió el permeado para desechar y el producto de polisacárido se concentró aproximadamente en un 50%. Después de la concentración, la presión de entrada se duplicó aproximadamente, momento en el que se inició el proceso de diafiltración contra agua. La diafiltración continuó durante un mínimo de 6 veces el intercambio de volumen, hasta que no se observó un color significativo en el permeado. Después de la diafiltración, el material se concentró adicionalmente hasta que la presión de entrada alcanzó aproximadamente 172.369 Pa (25 psig). El material se retiró del sistema y los filtros se lavaron con 100 ml de agua a 37 °C. Después del enjuague, los filtros se recircularon con agua a 37 °C durante 15 minutos. Se añadieron ambos enjuagues al producto recuperado. El polisacárido purificado se transfirió luego a un liofilizador para su secado. El material se congeló instantáneamente en los tubos de secado (aproximadamente 500-700 ml por tubo) y se secó en un liofilizador durante aproximadamente 72 horas. El producto de polisacárido se retiró, pesó y almacenó.

#### Ejemplo 3

- 45 Análisis de monosacáridos

- Polisacáridos purificados de *Chlorella sorokiniana*, *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijerinckii* se sometieron a análisis de monosacáridos. Los cultivos se hicieron crecer como se describe en el Ejemplo 1 y el polisacárido se precipitó del medio de cultivo usando isopropanol, se recogió y se secó en un horno a 60 °C hasta que no quedó humedad.

- El análisis de monosacáridos se realizó mediante cromatografía de gases /espectrometría de masas (GC/MS) combinadas de los derivados de per-O-trimetilsililo (TMS) de los metilglucósidos monosacáridos producidos a partir de la muestra mediante metanolisis ácida.

- Los metilglucósidos preparados a partir de 500 µg de la muestra seca se prepararon utilizando metanolisis en HCl 1 M en metanol a 80 °C (18-22 horas), seguido de una re-N-acetilación con piridina y anhídrido acético en metanol (para la detección de amino azúcares). Las muestras fueron luego per-O-trimetilsililadas 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 de GC/MS de los metilglucósidos de TMS se realizó en un HP 5890 GC en interfaz con un MSD 5970, utilizando una columna capilar de sílice fundida Supelco DB-1 (30m 0,25 mm ID).

- 65 Las composiciones de monosacáridos se determinaron como sigue:

Tabla 3. Análisis de monosacáridos de *Parachlorella kessleri*.

Residuo de glicosilo	% en moles
Arabinosa (Ara)	n.d.
Ramnosa (Rha)	33,0
Fucosa (Fuc)	n.d.
Xilosa (Xyl)	12,9
Ácido glucurónico (GlcA)	3,9
Ácido galacturónico (GalA)	n.d.
Manosa (Man)	15,4
Galactosa (Gal)	31,8
Glucosa (Glc)	2,9
N-acetil galactosamina (GalNAc)	n.d.
N-acetil glucosamina (GlcNAc)	n.d.

5

Tabla 4. Análisis de monosacáridos de *Parachlorella beijerinckii* (en % en moles).

Residuo de glicosilo	Medio 1	Medio 2
Arabinosa (Ara)	n.d.	n.d.
Ramnosa (Rha)	31,4	27,0
Fucosa (Fuc)	n.d.	n.d.
Xilosa (Xyl)	11,4	16,3
Ácido glucurónico (GlcA)	5,4	n.d.
Manosa (Man)	18,5	18,8
Galactosa (Gal)	30,3	35,2
Glucosa (Glc)	2,9	2,7
N-acetil glucosamina (GlcNAc)	n.d.	n.d.
Ácido N-acetil neuramínico (NANA)	n.d.	n.d.

10

Tabla 5. Análisis de monosacáridos de *Chlorella sorokiniana*.

Residuo de glicosilo	% en moles
Arabinosa (Ara)	21,6
Ramnosa (Rha)	17,3
Fucosa (Fuc)	n.d.
Xilosa (Xyl)	4,0
Ácido glucurónico (GlcA)	0,3
Ácido galacturónico (GalA)	n.d.
Manosa (Man)	7,1
Galactosa (Gal)	42,0
Glucosa (Glc)	7,8
N-acetil galactosamina (GalNAc)	n.d.
N-acetil glucosamina (GlcNAc)	n.d.

Residuo de glicosilo	% en moles
N-acetil-manosamina (ManNAc)	n.d.

Los valores de % en moles se expresan como porcentaje en moles del total de carbohidratos en la muestra.  
n.d. = ninguno detectado.

5 Del análisis de monosacáridos anterior, los polisacáridos producidos a partir de ambas especies de *Parachlorella* tienen un perfil de monosacáridos similar. También es posible alterar el perfil de monosacárido haciendo crecer las microalgas en diferentes medios nutritivos, en este caso, la fuente de nitrógeno se alteró: se utilizó NH<sub>4</sub> (Medio 2) o NO<sub>3</sub> (Medio 1). Como se muestra arriba, la misma cepa de *Parachlorella beijerinckii* cultivada en dos medios nutritivos diferentes tiene un perfil de monosacárido diferente. El perfil de monosacáridos para *Chlorella sorokiniana* contenía algunas diferencias en comparación con los perfiles de monosacáridos de las dos cepas de *Parachlorella*. La diferencia más marcada fue en el porcentaje molar de arabinosa (a 21,6%, en comparación con ninguna detectada en las dos cepas de *Parachlorella*).

#### Ejemplo 4

##### 15 Medición de proteínas

Parachlorella kessleri y Parachlorella beijerinckii se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1 y el polisacárido de ambos cultivos se purificó por precipitación con IPA como se describe en el Ejemplo 2. El polisacárido purificado de ambas especies de *Parachlorella* se analizó para determinar el contenido de proteínas utilizando el ensayo de proteínas Bio Rad, realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se agregaron 10 µl de muestra o estándar BSA con 200 µl de reactivo Bio Rad diluido 1:4 en agua. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a 650 nm utilizando un lector de placas Molecular Devices Spectra Max. Los polisacáridos de *Parachlorella kessleri* contenían 0,64% de proteína (promedio de muestras por triplicado) y los polisacáridos de *Parachlorella beijerinckii* contenían aproximadamente 1,15% de proteína (promedio de muestras por triplicado).

##### 25 Ejemplo 5

##### Producción de perlas de polisacárido

30 El polisacárido purificado de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijerinckii* se produjo a partir de las condiciones descritas en el Ejemplo 1 y se purificó usando precipitación con IPA o los procedimientos de TFF descritos en el Ejemplo 2. Después de que el polisacárido purificado se secó completamente en un horno de aire forzado a 60 °C, una molienda inicial se realizó utilizando un molino de martillos. El material se molió a partículas de tamaño 50-200 µm (según lo determinado por tamizado a través de un tamiz de malla de 250 µm y un análisis microscópico). El polvo de polisacárido se recoció luego en un horno de aire forzado a 150 °C durante 2,5 horas. Después de la etapa de recocido, el material descrito anteriormente se molió en partículas o perlas de menos de 10 µm usando un molino de chorro de aire. El molino de chorro de aire utiliza aire comprimido a alta presión para moler el material de polisacárido seco y purificado.

##### 40 Ejemplo 6

##### Propiedades de hinchamiento de perlas de polisacárido

45 El polisacárido purificado de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijerinckii* se molió y se recoció en perlas como se describe en el Ejemplo 5. Para probar las propiedades de hinchamiento de las perlas de polisacárido, 100 mg de perlas recocidas se dispersaron completamente en 10 ml de agua en un tubo de centrifuga de 15 ml sometiendo a vórtice. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 20.000 x g. La hinchazón se midió mediante inspección visual de la capa de gel de polisacárido. Como se muestra en la Figura 1, 100 mg de perlas de polisacárido producidas a partir de polisacáridos purificados de *Parachlorella beijerinckii* cultivadas en medios que contienen NO<sub>3</sub> (Figura 1, A) o NH<sub>4</sub> (Figura 1, B) como fuente de nitrógeno, se analizaron para determinar la hinchazón en 10 ml de agua. El polisacárido en el tubo A se hinchó hasta aproximadamente 2-3 veces su volumen en comparación con el polisacárido seco. El polisacárido en el tubo B se hinchó hasta aproximadamente la marca de volumen de 2 ml en el tubo de la centrifuga. También se muestra una muestra de perlas de polisacáridos secos de 100 mg (*Parachlorella beijerinckii*) (Figura 1, C) para comparación. La hinchazón de las perlas de polisacárido en contacto con el agua es una propiedad útil para la aplicación tópica en la piel humana en preparaciones cosméticas.

##### Ejemplo 7

##### 60 Viscosidad del 1% de solución de polisacárido

Se midió la viscosidad de una solución al 1% de polisacárido purificado de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijeirinkii*. Las microalgas se cultivaron bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 1 y los polisacáridos se purificaron utilizando TFF y se liofilizaron bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 2. Los polisacáridos secados y purificados se resuspendieron en DI H<sub>2</sub>O a una concentración del 1% p/v. La solución de polisacárido se centrifugó para asegurarse de que no había burbujas visibles en la solución. La viscosidad se analizó en un viscosímetro Brookfield con un husillo LV3 (#63). El motor se ajustó a 60 rpm y se tomaron medidas de viscosidad después de 3 minutos. Las medidas de viscosidad para una solución al 1% de polisacárido purificado a partir de *Parachlorella kessleri* fue de 0,930 Pa.S (930 cP) y de *Parachlorella beijeirinkii* fue de 0,587 Pa.S (587 cP).

10 Ejemplo 8

Contenido de azufre de polisacárido

15 Se midió el contenido de azufre para los polisacáridos purificados de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijeirinkii*. Ambas microalgas se cultivaron bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 1 y los polisacáridos se purificaron utilizando TFF y se liofilizaron bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 2.

20 El contenido de azufre se analizó de acuerdo con US EPA SW846, Método 6010B, Espectrometría de Emisión de Plasma-Atómica Inductivamente Acoplada. Antes del análisis, las muestras de polisacáridos se acidificaron o digirieron. Se pesó una cantidad apropiada de muestra en un recipiente de microondas al 0,001 g más cercano. Los reactivos apropiados se agregaron luego al recipiente de microondas. Luego se selló el recipiente y se colocó en el microondas de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La temperatura de cada recipiente alcanzó un mínimo de 180 ± 10 °C en 5 minutos y se dejó permanecer en un mínimo de 180 ± 10 °C durante 10 minutos. Al final del programa de microondas, los recipientes se dejaron enfriar durante un mínimo de 5 minutos antes de retirarlos. Luego se destaparon los recipientes y se transfirieron a matraces volumétricos para el análisis del contenido de azufre. El polisacárido purificado a partir de *Parachlorella kessleri* contenía 0,192% de azufre en peso y el polisacárido purificado a partir de *Parachlorella beijeirinkii* contenía 0,68% de azufre en peso.

30 Ejemplo 9

Peso molecular

35 El peso molecular de los polisacáridos de microalgas se determinó mediante cromatografía de permeación en gel. *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijeirinkii* se cultivaron bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 1. El polisacárido de ambas cepas se purificó usando TFF y se liofilizó de acuerdo con las condiciones descritas en el Ejemplo 2. Las muestras se molieron en un mortero y mano para asegurar la uniformidad. Las soluciones se realizaron a una concentración de 0,25% (p/v) en el disolvente de cromatografía (NaCl 0,1 N, acetonitrilo al 10%). A concentraciones más altas, las muestras eran demasiado viscosas para filtrarlas antes de la inyección. Las muestras se filtraron a través de membranas de nailon de tamaño de poro de 0,45 µm con dos prefiltros de vidrio hilado Whatman 934-AH.

45 La calibración de las ejecuciones contra estándares de peso molecular se realizó con fracciones de peso molecular estrecho de dextranos u otros estándares solubles en agua tales como poliestireno sulfonatos de sodio. Las proporciones de los picos de los porcentajes se determinaron utilizando el detector de índice de refracción. El detector ultravioleta registra la absorción de los cromóforos, tales como los péptidos en los polímeros, y es variable dependiendo de la capacidad de absorción de los grupos unidos. Las columnas utilizadas para la cromatografía de permeación de gel fueron TSK-gel PWXL en series, G2500, G3000, G4000, G5000, G6000 y precolumna más corta. Los resultados del detector de índice de refracción se resumen a continuación en la Tabla 6 y las trazas cromatográficas correspondientes se muestran en la Figura 3a y 3b. Los resultados del detector UV fueron similares y consistentes con los resultados del detector de índice de refracción. Ambas muestras de polisacáridos se eluyeron de la columna como cuatro especies de moléculas, denominadas Pico A, B, C y D. De las cuatro especies, la especie predominante (Pico A), que representa más del 75% de la muestra total, tenía un promedio de peso molecular de alrededor de 2 millones de Daltons.

55 Tabla 6. Peso molecular del polisacárido purificado de *Parachlorella*.

Parachlorella kessleri (SAG 27.87)			Parachlorella beijeirinkii (SAG 2046)		
Índice de refracción			Índice de refracción		
Pico % del total		Peso molecular, Daltons	Pico% del total		Peso molecular, Daltons
Pico A	M <sub>w</sub> =	2,063,430	Pico A	M <sub>w</sub> =	2,036,521
	M <sub>n</sub> =	1,505,130		M <sub>n</sub> =	1,454,769

Parachlorella kessleri (SAG 27.87)			Parachlorella beijerinckii (SAG 2046)		
Índice de refracción			Índice de refracción		
Pico % del total		Peso molecular, Daltons	Pico% del total		Peso molecular, Daltons
82,1%	$M_w/M_n=$	1,4	78,7%	$M_w/M_n=$	1,4
Pico B	$M_w=$	59,518	Pico B	$M_w=$	58,515
9,1%	$M_n=$	52,780	4,7%	$M_n=$	53,854
	$M_w/M_n=$	1,1		$M_w/M_n=$	1,1
Pico C	$M_w=$	1135	Pico C	$M_w=$	1085
5,8%	$M_n=$	1133	12,5%	$M_n=$	1074
	$M_w/M_n=$	1		$M_w/M_n=$	1,0
Pico D	$M_w=$	844	Pico D	$M_w=$	564
3,0%	$M_n=$	806	4,2%	$M_n=$	557
	$M_w/M_n=$	1,1		$M_w/M_n=$	1,0
<p><math>M_w</math>= peso molecular promedio en peso</p> <p><math>M_n</math>= peso molecular promedio en número</p> <p><math>M_w/M_n</math>= polidispersidad</p>					

Ejemplo 10

5 Composiciones Cosmecéuticas

10 Parachlorella kessleri y Parachlorella beijerinckii se hicieron crecer bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 1. El polisacárido de ambas cepas se purificó usando TFF y se liofilizó de acuerdo con las condiciones descritas en el Ejemplo 2. El polisacárido purificado (al 0,1% p/p) se formuló en una crema de noche con los siguientes ingredientes: agua, hialuronato de sodio, betaína, EDTA trisódico, glicerina, butilenglicol, anfol K, manteca de karité, aceite de macadamia, estearato de isocetilo, aceite de oliva, diestearato de PEG 150, grancil VX401, monoestearato de glicerilo, polietileno, Granpowder USQ, gransil PSQ, diocida y fragancia. La mezcla se homogeneizó para formar una composición adecuada para administración tópica.

15 Ejemplo 11

Evaluación de irritación/sensibilización de la piel

20 El polisacárido de Parachlorella beijerinckii se preparó en una solución al 1% para una prueba de parche de insulto repetido (RIPT) en un sujeto de estudio de cincuenta humanos para evaluar si una reaplicación consistente causará irritación/sensibilización en la piel humana. El estudio se realizó de conformidad con CFR Título 21, Parte 50 (consentimiento informado de sujetos humanos). Se obtuvo un consentimiento informado de cada voluntario antes de iniciar el estudio, describiendo las razones del estudio, los posibles efectos adversos, los riesgos asociados y los beneficios potenciales del tratamiento y sus límites de responsabilidad. Cincuenta sujetos (hombres y mujeres) de 25 edades comprendidas entre los 18-66 años completaron el siguiente estudio.

Procedimiento

30 Se pidió a los sujetos que se bañaran o lavaran como de costumbre antes de llegar a las instalaciones de prueba. Se dispensaron 0,2 ml o 0,2 g del material de prueba en un parche oclusivo e hipoalergénico. El parche se aplicó directamente a la piel de las regiones infraescapulares de la espalda, a la derecha o a la izquierda de la línea media y se despidió al sujeto con instrucciones de no mojar o exponer el área de prueba a la luz solar directa. Después de 24 horas, el parche fue removido por el sujeto en casa. Este procedimiento se repitió para una serie de nueve

exposiciones consecutivas de 24 horas todos los lunes, miércoles y viernes durante tres semanas consecutivas. Luego, a los sujetos se les dio un período de descanso de 10-14 días, después de lo cual se aplicó una exposición o repetición de dosis de prueba una vez a un sitio de prueba previamente no expuesto. La repetición de la dosis de prueba fue equivalente a cualquiera de las nueve exposiciones originales. Las reacciones se calificaron 24 y 48 horas después de la aplicación. Se realizó una comparación entre las nueve respuestas inductivas y la repetición de la dosis de prueba. En caso de una reacción adversa, se mide el área de eritema y edema. El edema se estima por la evaluación de la piel con respecto al contorno de la piel normal no afectada. Las reacciones se califican justo antes de las aplicaciones dos a nueve y la siguiente fecha de prueba después de la aplicación nueve. En la mayoría de los casos, esto es aproximadamente 24 horas después de la eliminación del parche. Al concluir el estudio, el dermatólogo consultor revisó los datos y confirmó las conclusiones declaradas.

## Resultados

En todos los 50 sujetos, no se observaron reacciones adversas de ningún tipo durante el curso del estudio. El material de prueba, cuando se analiza bajo oclusión como se describió anteriormente, puede considerarse un irritante no primario y un sensibilizador no primario para la piel de acuerdo con la Evaluación de la Seguridad de los Productos Químicos en Alimentos, Fármacos y Cosméticos, publicado por la asociación de oficiales de alimentos y fármacos de los Estados Unidos, 1965 (modificado).

## Ejemplo 12

### Protección contra daños UV: Prevención de la formación de dímeros de timidina

El polisacárido purificado por TFF (véase Ejemplo 2) de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijerinckii* se suministró al sitio de prueba como una solución madre al 3% para evaluar los cambios en el contenido de dímero de timidina del ADN tisular después de la exposición a UVB.

El sistema de prueba utilizado para este ensayo fue el MatTek EpiDerm®, un modelo de piel que consiste en queratinocitos epidérmicos normales derivados de seres humanos cultivados para formar un modelo de la epidermis humana altamente diferenciado y de múltiples capas. Los tejidos se trataron tópicamente durante la noche con los materiales de prueba (polisacárido), Trolox 1 mM (control positivo) o se dejaron sin tratar (control negativo). Al día siguiente, los tejidos se expusieron a UVB (300 mJ/cm<sup>2</sup>). Tras las exposiciones a UVB, se extrajo el ADN de los tejidos EpiDerm utilizando el kit DNEasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se cuantificó mediante un ensayo fluorométrico. Se mezcló una parte alícuota de 10 µl de la muestra de ADN con 1,0 ml de regulador TE y se transfirieron 100 µl de esta muestra diluida a un pozo en una placa de 96 pozos. También se transfirió una serie de patrones de ADN (de 0 a 1.000 ng/ml) a los pozos en una placa de 96 pozos por duplicado. Finalmente, se agregaron 100 µl de colorante Cyquant Green diluido a cada pozo y se determinó la intensidad de fluorescencia de cada pozo utilizando una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm.

Se cargaron alícuotas de ADN de las muestras de prueba (400 ng en 2x SSC (20x SSC solución madre: NaCl 3M, citrato de sodio 0,3M, pH 7,0)) en una membrana mediante precipitación por microfiltración. Después de cargar, la membrana se lavó una vez en 2x SSC y luego se coció durante 30 minutos a 80 °C para entrecruzar el ADN con la membrana. La membrana se incubó luego durante 1 hora en solución de bloqueo (TBS: Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM) suplementado con proteína de leche desnatada al 5%, polivinilpirrolidona al 0,2% y ficol al 0,2%) y luego se lavó brevemente dos veces en TBS-T (TBS con proteína de leche desnatada al 0,1% y Tween 20 al 0,1%). La membrana se incubó durante la noche a 4 °C con un anticuerpo que reconoce los dímeros de timidina diluidos en TBS-T. Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces con TBS-T (20 minutos por lavado) y luego se incubó con un anticuerpo secundario marcado de forma fluorescente durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después de este período de incubación, la membrana se lavó tres veces con TBS-T (20 minutos por lavado). La membrana se colocó en un BioRad Molecular Imager FX y se escaneó utilizando un láser de excitación y una combinación de filtro de emisión apropiada para el fluoróforo. Las imágenes producidas por el escáner fueron analizadas utilizando el software de análisis ImageJ. Las mediciones de intensidad de fluorescencia se expresaron en Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU). Luego se calcularon los valores medios de RFU para cada tratamiento y se compararon los tratamientos utilizando ANOVA de una vía.

Los resultados para el ensayo del dímero de timidina se resumen a continuación en la Tabla 7. Los valores se expresan como RFUs y se presentan como valores medios ± desviación estándar. A una concentración de 0,03%, ambos polisacáridos purificados de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijerinckii* redujeron la presencia de dímeros de timidina en el ADN de los tejidos después de la exposición a UVB a un nivel comparable al del control positivo (muestras tratadas con Trolox). Se observaron resultados similares con polisacáridos purificados de *Parachlorella beijerinckii* a una concentración del 0,3% (la concentración de 0,3% no se realizó con polisacáridos de *Parachlorella kessleri*). Los resultados de este estudio indican que ambos polisacáridos redujeron significativamente la cantidad de formación de dímeros de timidina.

Tabla 7. Ensayo de dímero de timidina.

Tratamiento	RFU
No expuesto a UVB	12 ± 7
Sin tratar (expuesto a UVB)	108 ± 22
Trolox (control positivo)	55 ± 14*
polisacárido de <i>P. kessleri</i> al 0,03%	59 ± 17*
polisacárido de <i>P. kessleri</i> al 0,003%	110 ± 31
polisacárido de <i>P. beijeirinckii</i> al 0,3%	52 ± 11*
polisacárido de <i>P. beijeirinckii</i> al 0,03%	66 ± 18*
polisacárido de <i>P. beijeirinckii</i> al 0,003%	89 ± 9
* denota valores que son significativamente diferentes del grupo no tratado (p <0,05)	

Ejemplo 13

5 Ensayo de viabilidad de fibroblastos in vitro

El polisacárido purificado por TFF (véase Ejemplo 2) de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijeirinckii* se suministró al sitio de prueba como una solución madre al 3% para evaluar la viabilidad de las células de fibroblastos en un modelo in vitro después de la exposición a los polisacáridos purificados (materiales de prueba).

10 Los fibroblastos son células que se encuentran en la piel humana y son la principal fuente de proteínas de la matriz extracelular, incluidas las proteínas estructurales, colágeno y elastina. Un modelo de cultivo de células de fibroblastos que usa un ensayo de MTT de (3-(4,5 Dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeinitetrazolio bromuro), un análisis colorimétrico de la actividad metabólica de la célula puede evaluar la viabilidad de las células (y a la inversa, la toxicidad del material de prueba) después del tratamiento. La reducción de MTT en las mitocondrias da como resultado la formación de cristales de formazán púrpura insolubles que se extraen de las células con isopropanol y se cuantifican espectrofotométricamente. La intensidad del color púrpura es directamente proporcional a la actividad metabólica de las células e inversamente proporcional a la toxicidad del material de prueba.

20 Los fibroblastos se sembraron en pozos individuales de una placa de 24 pozos en 0,5 ml de medio de crecimiento de fibroblastos (FGM) y se incubaron durante la noche a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Al día siguiente, se retiró el medio por aspiración para eliminar cualquier célula no adherente y se reemplazó con 0,5 ml de FGM nueva. Las células se cultivaron hasta su confluencia, con un cambio de medio cada 48 a 72 horas. Al alcanzar la confluencia, las células se trataron dentro de 24 horas con DMEM suplementado con FBS al 1,5% para lavar cualquier efecto de los factores de crecimiento incluidos en el medio de cultivo normal. Después de este período de lavado de 24 horas, las células se trataron con polisacárido purificado de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijeirinckii* a una concentración de 0,3%, 0,03% y 0,003%. Las células no tratadas (control negativo) recibieron DMEM con FBS al 1,5%. Las células se incubaron durante 48 horas y al final del período de incubación, se eliminó el medio de cultivo celular y los fibroblastos se lavaron dos veces con PBS para eliminar cualquier material de prueba restante. Después del lavado final, se agregaron 500 µl de DMEM con 0,5 mg/ml de MTT a cada pozo y las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación, la solución de DMEM/MTT se eliminó y las células se lavaron de nuevo una vez con PBS y luego se agregó 1 ml de alcohol isopropílico al pozo para extraer los cristales de formazán de color púrpura. Se transfirieron 200 µl de extractos de isopropanol a una placa de 96 pozos y se leyó la placa a 540 nm usando alcohol isopropílico como blanco. El valor medio de absorbancia de MTT para las células de control negativo se calculó y se usó para representar el 100% de la viabilidad celular. Los valores de MTT individuales de las células que se sometieron a los diversos tratamientos se dividieron luego por el valor medio para las células de control negativo y se expresaron como un porcentaje para determinar el cambio en la viabilidad celular causado por cada tratamiento.

40 Ninguna de las condiciones de tratamiento tuvo un impacto significativo en la viabilidad de las células y las puntuaciones de viabilidad para los fibroblastos tratados con los materiales de prueba fueron similares a los del grupo no tratado. Estos resultados son consistentes con la conclusión de que los materiales de prueba no eran tóxicos para las células.

Ejemplo 14

45 Ensayo de producción de elastina

La elastina es el componente principal de una red de fibras elásticas que dan a los tejidos su capacidad de retroceder después de un estiramiento transitorio. Esta proteína es liberada por los fibroblastos (elastina soluble) en el espacio extracelular, donde luego es entrecruzada con otras proteínas de la 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 a base de ELISA.

Las células de fibroblastos y los materiales de prueba de polisacáridos se prepararon como se describe en el Ejemplo 13. Las células no tratadas sirvieron como control negativo y las células tratadas con IGF-1 (100 ng/ml) se usaron como control positivo. Las células se trataron durante 48 horas y al final del período de tratamiento, se recogió el medio de cultivo celular de cada grupo de tratamiento y se almacenó congelado (-75 °C) o se analizó inmediatamente. Los materiales fueron probados por triplicado.

Se disolvió alfa-elastina soluble en carbonato de sodio 0,1 M (pH 9,0) a una concentración de 1,25 µg/ml. Luego se aplicaron 150 µl de esta solución a los pozos de una placa Maxisorp (Nunc) de 96 pozos y la placa se incubó durante la noche a 4 °C. Luego, los pozos se saturaron con PBS que contenía BSA al 0,25% (albúmina de suero bovino) y Tween 20 al 0,05%. La placa se incubó 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 alfa-elastina que osciló entre 0 y 100 ng/ml. Luego se transfirieron 180 µl de muestra estándar o de prueba (medio de cultivo) a un tubo de microcentrífuga de 650 µl. 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 agregaron 20 µl de la solución a cada tubo. Los tubos se incubaron durante la noche a 4 °C. Se transfirieron 150 µl de cada tubo a la placa ELISA de elastina de 96 pozos, y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la placa se lavó 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%. Después del lavado, se agregaron 200 µl 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 nuevamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez que se lavó la placa tres veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%, se agregaron a la placa 200 µl 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 utilizando un lector de placas.

Para cuantificar la cantidad de cada sustancia presente, se generó una curva estándar utilizando las concentraciones conocidas de cada sustancia. Se realizó un análisis de regresión para establecer la línea que mejor se ajusta a estos puntos de datos. Los valores de absorbancia para los materiales de prueba y las muestras no tratadas se utilizaron para estimar la cantidad de cada sustancia presente en cada muestra. Los resultados se resumen en la Tabla 8 a continuación. Los valores se presentan en la concentración media de elastina ± desviación estándar de la media. Se observó un aumento en la producción de elastina en todas las condiciones de tratamiento con polisacáridos (0,3%, 0,03% y 0,003%). El tratamiento con la concentración más baja de 0,003% de polisacárido de ambas especies de *Parachlorella* produce un aumento en la producción de elastina comparable al control positivo (IGF-1).

Tabla 8. Producción de elastina soluble.

Tratamiento	Elastina (ng/ml)
Sin tratamiento (control negativo)	63 ± 20
IGF-1 (100 ng/ml)	108 ± 15*
polisacárido de <i>P. kessleri</i> al 0,3%	86 ± 7
polisacárido de <i>P. kessleri</i> al 0,03%	97 ± 18
polisacárido de <i>P. kessleri</i> al 0,003%	120 ± 15*
polisacárido de <i>P. beijerinckii</i> al 0,3%	97 ± 23
polisacárido de <i>P. beijerinckii</i> al 0,03%	99 ± 9
polisacárido de <i>P. beijerinckii</i> al 0,003%	107 ± 12*

\* denota valores que son significativamente diferentes del grupo no tratado (p <0,05).

Ejemplo 15

Ensayo de proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y análisis de citoquinas

Los linfocitos, que son el tipo de célula principal en las PBMC, responden mediante la proliferación cuando se enfrentan a ciertos antígenos. Esta proliferación ocurre en una respuesta inflamatoria y los linfocitos también secretan factores, denominados citoquinas, que reclutan otras células inmunitarias y/o mantienen la proliferación de linfocitos. Los métodos in vitro recrean este evento de proliferación inicial utilizando PBMCs y antígenos, como la fitohemaglutinina

(PHA) para estimular una respuesta de proliferación. Se puede usar un colorante vital, como el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) para cuantificar la extensión de proliferación. MTS puede ser absorbido por las células y las enzimas deshidrogenasas activas dentro de las células viables convierten el MTS en un producto de formazán soluble en agua. Este producto de formazán se acumula en el medio de cultivo celular en proporción al número de células viables y se puede medir espectrofotométricamente. Los agentes pueden ser cribados en este ensayo para evaluar su capacidad para modular esta respuesta inflamatoria. Si hay una disminución en la proliferación tras el tratamiento con un agente, entonces esto es correlativo a un efecto antiinflamatorio. Alternativamente, si hay un aumento en la proliferación con el tratamiento con un agente, entonces esto es correlativo a un efecto proinflamatorio. Además, los medios de cultivo celular pueden recogerse y analizarse para citoquinas secretadas como la IL-1 y el interferón gamma. Se sabe que estas citoquinas se sobreexpresan durante la inflamación.

Los materiales de prueba de polisacáridos, preparados como se describe en el Ejemplo 13, se analizaron para determinar las propiedades antiinflamatorias utilizando el ensayo in vitro de PBMC descrito anteriormente. Se agregaron 100 µl de PBMC (descongeladas de viales criopreservados a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml) a los pozos en una placa de 96 pozos (cada tratamiento se probó por triplicado). Se añadieron a los pozos 100 µl de medio suplementado con 2,5 µg/ml de PHA y los polisacáridos (a 0,003, 0,03 y 0,3% de concentración final). La ciclosporina A (2,5 µg/ml), un compuesto antiinflamatorio conocido, se usó como control positivo, mientras que las células que no recibieron agente de prueba (solo PHA, células no tratadas) se usaron como control negativo. Un conjunto de células que no se trató con PHA sirvió como línea base de referencia para todas las mediciones (no estimuladas). Una vez preparadas las células, las placas se incubaron durante aproximadamente 68 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación, se agregaron 30 µl de solución de MTS a cada pozo y la placa de 96 pozos se devolvió a la incubadora durante 4 horas adicionales. Luego se leyó la placa a 490 nm usando un lector de placas. También se preparó y trató un segundo conjunto de placas como se describe anteriormente. Al final del período de incubación, el sobrenadante del cultivo celular se analizó para determinar la secreción de IL-1 alfa e interferón gamma.

La secreción de IL-1 alfa se midió utilizando ELISA. Las placas ELISA se prepararon diluyendo anticuerpos de captura de IL-1 alfa en PBS. A continuación, se agregaron 100 µl del anticuerpo de captura diluido a los pozos de una placa ELISA de 96 pozos y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la placa se lavó tres veces con 300 µl de regulador de lavado (Tween 20 al 0,05% en PBS) y luego se bloqueó agregando 300 µl de regulador de bloqueo (BSA al 1% en PBS) a cada pozo. La placa se incubó con el regulador de bloqueo durante al menos una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, la placa se lavó tres veces con regulador de lavado. Se preparó una serie de estándares (0 a 500 pg/ml de IL-1 alfa recombinante) y se dispensaron 100 µl de cada uno de estos estándares en dos pozos como duplicados en la placa apropiada de 96 pozos. También se agregaron 100 µl de medio de cada condición de prueba (por triplicado) a la placa de 96 pozos y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la incubación, la placa se lavó tres veces con regulador de lavado. Se agregaron 100 µl de anticuerpo de detección conjugado con biotina y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. La placa se lavó de nuevo tres veces y luego se agregaron 100 µl de HRP-estreptavidina a cada pozo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La placa se lavó tres veces con regulador de lavado y se agregaron a cada pozo los 100 µl de solución de sustrato (peróxido de hidrógeno+tetrametilbencidina). Una vez que se produjo un nivel suficiente de desarrollo de color, se agregaron 50 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 2N) a cada pozo y se leyó la placa a 460 nm. La secreción de interferón gamma también se analizó utilizando un ELISA utilizando los mismos métodos que el ELISA de IL-1 alfa, pero con un anticuerpo de captura de interferón gamma.

Se observó que el tratamiento con una concentración final del 0,3% de ambos polisacáridos (de *Parachlorella kessleri* y *Parachlorella beijerinckii*) reducía significativamente la cantidad de proliferación de PBMC estimulada por PHA. Con respecto a la liberación de citoquinas (IL-1 alfa e interferón gamma), se observó que ambos polisacáridos reducen significativamente la cantidad de secreción de IL-1 alfa e interferón gamma estimulada por PHA de una manera dependiente de la dosis. Estos resultados indican que ambos polisacáridos fueron capaces de producir un efecto antiinflamatorio en las PBMC in vitro y pueden reducir la inflamación in vivo. Los resultados de este estudio se resumen en la Tabla 9 a continuación. Los resultados para el ensayo de proliferación de PBMC se expresaron como un índice de estimulación, utilizando las PBMC no tratadas no expuestas a PHA (no estimuladas) para representar el 100%. Todos los valores para estos ensayos se expresan como medias ± desviación estándar.

Tabla 9. Resultados del ensayo de activación de PBMCN.

Tratamiento	Ensayo de proliferación (índice de estimulación)	IL-1 alfa ELISA (pg/ml)	Interferón gamma ELISA (pg/ml)
No estimulado	100 ± 4	257 ± 385	5 ± 4
Sin tratamiento (control negativo)	254 ± 17	14.203 ± 519	201 ± 3
Ciclosporina A 2,5 µg/ml (control positivo)	98 ± 7*	1.586 ± 649*	77 ± 11*

Tratamiento	Ensayo de proliferación (índice de estimulación)	IL-1 alfa ELISA (pg/ml)	Interferón gamma ELISA (pg/ml)
Polisacárido (P.kessleri) al 0,3%	170 ± 16*	2.167 ± 877*	116 ± 3*
Polisacárido (P.kessleri) al 0,03%	NS	8.613 ± 2.685*	144 ± 22*
Polisacárido (P.kessleri) al 0,003%	NS	18.027 ± 2.045	114 ± 7*
Polisacárido (P.beijerinckii) al 0,3%	207 ± 25*	570 ± 519*	107 ± 3*
Polisacárido (P.beijerinckii) al 0,03%	NS	4.788 ± 679*	130 ± 13*
Polisacárido (P.beijerinckii) al 0,003%	NS	9.365 ± 2.203*	117 ± 11*

\* denota valores que son significativamente diferentes del grupo no tratado (p <0,05)

NS denota valor no significativo

Ejemplo 16

5 Genotipificado de cepas de microalgas que producen polisacáridos

Varias cepas de microalgas del género *Chlorella* y *Parachlorella* se cultivaron de forma heterótrofa bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 1 y se genotipificaron de acuerdo con la secuencia genómica del ARNr 23S. Las cepas fueron: *Chlorella sorokiniana* UTEX 1810, *Parachlorella kessleri* SAG 27.87 y *Parachlorella beijerinckii* SAG 2046. El ADN genómico se aisló de la biomasa de algas de la siguiente manera: las células (aproximadamente 200 mg) se centrifugaron de cultivos líquidos 5 minutos a 14.000 x g. Las células se resuspendieron luego en agua destilada estéril, se centrifugaron durante 5 minutos a 14.000 x g y se desechó el sobrenadante. Se añadió una sola perla de vidrio de ~2 mm de diámetro a la biomasa y los tubos que contenían la biomasa y la perla se colocaron a -80 °C durante al menos 15 minutos. Se retiraron las muestras y se agregaron 150 µl de regulador de molienda (sarcosil al 1%, sacarosa 0,25 M, NaCl 50 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, RNase A 0,5 µg/ul). Las pellas se resuspendieron mediante breve agitación en vórtice, seguido de la adición de 40 µl de NaCl 5M. Las muestras se agitaron brevemente en vórtice, seguido de la adición de 66 µl de CTAB al 5% (bromuro de cetil trimetilamonio) y una breve agitación en vórtice final. Las muestras se incubaron a continuación a 65 °C durante 10 minutos, después de lo cual se centrifugaron a 14.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se extrajo una vez con 300 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12:1, seguido de centrifugación durante 5 minutos a 14.000 x g. La fase acuosa resultante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 0,7 volumen de isopropanol (~190 µl), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos o durante la noche a 4 °C. El ADN se recuperó mediante centrifugación a 14.000 x g durante 10 minutos. La pella resultante se lavó dos veces con etanol al 70%, seguido de un lavado final con etanol al 100%. Las pellas se secaron al aire durante 20-30 minutos a temperatura ambiente, seguido de una resuspensión en 50 µl de TrisCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0).

Cinco µl de ADN total de algas, preparado como se describe anteriormente, se diluyeron a 1:50 en Tris 10 mM, pH 8,0. Las reacciones de PCR, volumen final 20 µl, se configuraron de la siguiente manera. Se agregaron diez µl de 2 x mezcla maestra iProof HF (BIO-RAD) a 0,4 µl de cebador SZ02613 (5'-TGTTGAAGAATGAGCCGCGAC-3' (SEQ ID NO:1) a concentración madre 10 mM). Esta secuencia de cebador se ejecuta desde la posición 567-588 en el número de acceso de Gen Bank. L43357 y está altamente conservado en plantas superiores y genomas de plástidos de algas. Esto fue seguido por la adición de 0,4 µl de cebador SZ02615 (5'-CAGTGAGCTATTACGCACTC-3' (SEQ ID NO:2) a concentración madre 10 mM). Esta secuencia de cebador es complementaria a la posición 1112-1093 en el número de acceso de Gen Bank. L43357 y está altamente conservado en plantas superiores y genomas de plástidos de algas. A continuación, se agregaron 5 µl de ADN total diluido y 3,2 µl de dH<sub>2</sub>O. Las reacciones de PCR se ejecutaron de la siguiente manera: 98 °C, 45 segundos; 98 °C, 8 segundos; 53 °C, 12 segundos; 72 °C, 20 segundos durante 35 ciclos seguidos de 72 °C durante 1 minuto y manteniéndose a 25 °C. Para la purificación de los productos de PCR, se agregaron 20 µl de Tris 10 mM, pH 8,0, a cada reacción, seguido de extracción con 40 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12:1, agitando en vórtice y centrifugando a 14.000 x g durante 5 minutos. Las reacciones de PCR se aplicaron a columnas S-400 (GE Healthcare) y se centrifugaron durante 2 minutos a 3.000 x g. Los productos de PCR purificados se clonaron posteriormente mediante TOPO en PCR8/GW/TOPO y los clones positivos se seleccionaron para placas LB/Spec. El ADN plasmídico purificado se secuenció en ambas direcciones utilizando los cebadores directo e inverso M13. Las secuencias de las cepas anteriores se enumeran como SEQ ID NO:3-4 en el listado de

secuencias adjunto. Las cepas SAG 27.87 y SAG 2046 tuvieron secuencias genómicas de ARNr 23S idénticas y la secuencia genómica ARNr 23S de UTEX 1810 fue aproximadamente 96% idéntica a la de las otras cepas analizadas. En la Figura 2 se muestra un cladograma que compara los resultados de la secuencia de las tres cepas de microalgas.

## 5 Ejemplo 17

Producción en tanda alimentada de polisacáridos

10 Parachlorella kessleri (SAG 27.87) y Parachlorella beijerinckii (SAG 2046) se cultivaron en cultivos alimentados en tanda en fermentadores de 7 l para producir exopolisacáridos solubles. La formulación del medio fue: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,14 g/L); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 g/L); MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,37 g/L); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,00 g/L); CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,03g/L); extracto de levadura (Amberex) (4,00g/L); ácido cítrico (0,25g/L); 100x oligoelementos C (10mL/L); Antiespuma 204 (Sigma) (0,225 ml/L); y 1.000x vitaminas DAS (1mL/L). Los cultivos se inocularon a 7% v/v y la temperatura se mantuvo a 28 °C y un pH de 6,8. Se agregaron KOH al 10% y HCl al 10% para mantener el nivel de pH en 5,0 durante toda la ejecución en el fermentador. Los cultivos se agitaron a 200 rpm durante las primeras 52 horas y luego se aumentaron a 350 rpm durante el resto del tiempo de cultivo. Los niveles de glucosa se ajustaron de modo que se mantuviera a entre 5-30 gramos/litro durante toda la ejecución. La ejecución de la fermentación para Parachlorella kessleri duró 190 horas (aproximadamente 8 días) y alcanzó un título de polisacárido de 1,35 gramos/litro. La ejecución de la fermentación para Parachlorella beijerinckii duró 333 horas (aproximadamente 14 días) y alcanzó un título de polisacáridos de 2,6 gramos/litro. Los polisacáridos resultantes se purificaron usando los métodos de TFF descritos en el Ejemplo 2 y se secaron y pesaron.

## Ejemplo 18

### 25 Análisis de monosacáridos

Polisacárido purificado de Parachlorella kessleri y Parachlorella beijerinckii de cultivos alimentados en tanda (purificados por TFF bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 2) se sometieron a análisis de monosacáridos.

30 El análisis de monosacáridos se realizó mediante la combinación de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) de los derivados de per-O-trimetilsililo (TMS) de los metilglucósidos monosacáridos producidos a partir de la muestra mediante metanolisis ácida.

35 Los metilglucósidos preparados a partir de 500 µg de la muestra seca se prepararon utilizando metanolisis 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 amino azúcares). Las muestras fueron luego per-O-trimetilsililadas 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 con GC/MS de los metilglucósidos de TMS se realizó en un HP 5890 GC en interfase con un MSD 5970, utilizando una columna capilar de sílice fundida Supelco DB-1 (30m 0,25 mm ID).

Las composiciones de monosacáridos se determinaron como sigue:

Tabla 10. Análisis de monosacáridos de Parachlorella kessleri.

Residuo de Glicosil	Mol %
Ribosa (Rib)	n.d.
Ramnosa (Rha)	52,8
Fucosa (Fuc)	n.d.
Xilosa (Xyl)	26,6
Ácido glucurónico (GlcA)	9,8
Ácido galacturónico (GalA)	n.d.
Manosa (Man)	2,2
Galactosa (Gal)	7,5
Glucosa (Glc)	1,0
N-acetil galactosamina (GalNAc)	n.d.
Metildeoxihexosa	+
Ácido hexadecanoico*	+
Ácido octadecadienoico*	+

Tabla 11. Análisis de monosacáridos de *Parachlorella beijerinckii*.

Residuo de Glicosil	Mol %
Ramnosa (Rha)	50,1
Xilosa (Xyl)	31,2
Ácido glucurónico (GlcA)	11,5
Manosa (Man)	1,4
Galactosa (Gal)	4,3
Glucosa (Glc)	1,4
N-acetil galactosamina (GalNAc)	n.d.
N-acetil glucosamina (GlcNAc)	n.d.
ácido 3 desoxi-2-mano-2octuslónico (KDO)	n.d.
Metildesoxihexosa	+
Ácido hexadecanoico*	+
Ácido octadecadienoico*	+
Ácido octadecenoico*	+

Los valores de % en moles se expresan como porcentaje en moles del total de carbohidratos en la muestra.  
n.d. = no se detectó. + = se detectó en niveles inferiores a los cuantitativos (por debajo de aproximadamente el 1-3%)  
\* Se detectaron ácidos grasos pero no se cuantificaron porque las condiciones se configuraron para la cuantificación de monosacáridos.

- 5 Las publicaciones mencionadas aquí se citan con el propósito de describir y divulgar reactivos, metodologías y conceptos que pueden usarse en relación con la presente invención. Nada aquí debe interpretarse como una admisión de que estas referencias son de la técnica anterior en relación con las invenciones descritas aquí.
- 10 Listado de secuencias
- <110> SOLAZYME, INC.  
CORAGLIOTTI, ANNA  
FRANKLIN, SCOTT
- 15 DAY, ANTHONY G.  
DECKER, STEPHEN M.
- <120> COMPOSICIONES DE POLISACÁRIDOS DE MICROALGAS
- 20 <130> 026172-003110PC
- <150> 61/164,312  
<151> 2009-03-27
- 25 <150> PCT/US2009/060692  
<151> 2009-10-14
- <150> 61/246,070  
<151> 2009-09-25
- 30 <150> 61/173,166  
<151> 2009-04-27
- <150> 61/157,187  
35 <151> 2009-03-03
- <150> 61/105,121

ES 2 718 275 T3

<151> 2008-10-14

<160> 4

5 <170> PatentelN versión 3.5

<210> 1  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

15 <400> 1  
 tgttgaagaa tgagccggcg ac 22

<210> 2  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

25 <400> 2  
 cagtgagcta ttacgcactc 20

<210> 3  
 30 <211> 548  
 <212> ADN  
 <213> Parachlorella kessleri y Parachlorella beijerinckii

<400> 3  
 tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaga agtggcttgg ttaaggataa ctatccggag 60  
 ccagagcgaa agcaagtctg aatagggcgc ttaaagggtca ctttttctag acccgaacct 120  
 gggatgatcta accatgacca ggatgaagct tgggtaacac cacgtgaagg tccgaaccga 180  
 ccgatgattga aaaatcggcg gatgagttgt ggtagcggg gaaataccaa tcgaactcgg 240  
 agctagctgg ttctccccga aatgcggtga ggcgcagcgg tttatgaggc tgtctagggg 300  
 taaagcactg tttcgggtgcg ggctgcgaaa gcggtaccaa atcgtggcaa actctgaata 360  
 ctagatatgc tattcatgag ccagtgagac ggtgggggat aagcttcatc gtcaagaggg 420  
 aaacagccca gatcaccagc taaggcccca aaatggctgt taagtggcaa aggaggtgag 480  
 aatgctgaaa caaccaggag gtttgcttag aagcagccac cttttaaaga gtgcgtaata 540  
 35 gctcactg 548

<210> 4  
 <211> 546  
 <212> ADN  
 40 <213> Chlorella sorokiniana

<400> 4

ES 2 718 275 T3

tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaaa cgtggcaagg ttaaggacat gtatccggag	60
ccgaagcgaa agcaagtctg aatagggcgc ctaagtcatt ttttctagac ccgaaccggg	120
gtgatctaac catgaccagg atgaagcttg ggtgacacca agtgaaggtc cgaaccgacc	180
gatgttgaaa aatcggcgga tgagttgtgg ttagcgggtga aataccagtc gaactcggag	240
ctagctgggt ctccccgaaa tgcgttgagg cgcagcgggt cataaggctg tctaggggta	300
aagcactggt tcggtgcggg ctgcgaaagc ggtaccaaact cgtggcaaac tctgaatact	360
agatatgcta tttatgagcc agtgagacgg tgggggataa gcttcatcgt cgagagggaa	420
acagcccaga tcactagcta aggccccaaa atgatcgta agtgacaaag gaggtgagaa	480
tgcagaaaca accaggaggt ttgcttagaa gcagccaccc tttaaagagt gcgtaatagc	540
tactg	546

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende exopolisacárido aislado de microalgas cultivadas de forma heterotrófica seleccionada de *Parachlorella kessleri*, *Parachlorella beijerinckii* o *Chlorella sorokiniana*, en donde el contenido de monosacáridos de la exopolisacárida comprende 15-55 por ciento de moles de ramnosa, 3-30 por ciento de moles de xilosa, 1-25 por ciento de moles de mannososa, 1-45 por ciento de moles de galactosa, 0,5-10 por ciento de moles de glucosa y 0,1-15 por ciento de moles de ácido glucurónico.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en donde el exopolisacárido se muele para proporcionar partículas de exopolisacárido que tienen un tamaño de partícula promedio de entre 400 micrómetros y 0,1 micrómetros.
3. La composición de la reivindicación 2, en donde las partículas de exopolisacáridos son parcialmente solubles en agua.
- 15 4. La composición de las reivindicaciones 2 o 3, en donde las partículas de exopolisacáridos cuando se resuspenden en agua a una concentración de 1% p/v tienen una viscosidad de entre 0,5 Pascal segundos (Pa·s) (500 cP) y 1 Pa·s (1.000 cP).
- 20 5. La composición de la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en donde las partículas de exopolisacáridos son de *Parachlorella kessleri*.
6. La composición de la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en donde las partículas de exopolisacáridos son de *Parachlorella beijerinckii*.
- 25 7. La composición de la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en donde las partículas de exopolisacáridos son de *Chlorella sorokiniana*.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde las partículas de exopolisacárido aumentan en volumen al menos el 100% tras el contacto con agua en comparación con el volumen anhidro de las partículas de exopolisacárido.
- 30 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde las partículas de exopolisacáridos están formuladas con al menos un excipiente adecuado para administración tópica.
- 35 10. Un método no terapéutico para mejorar la apariencia de la piel que comprende aplicar la composición de la reivindicación 9 a la piel humana.

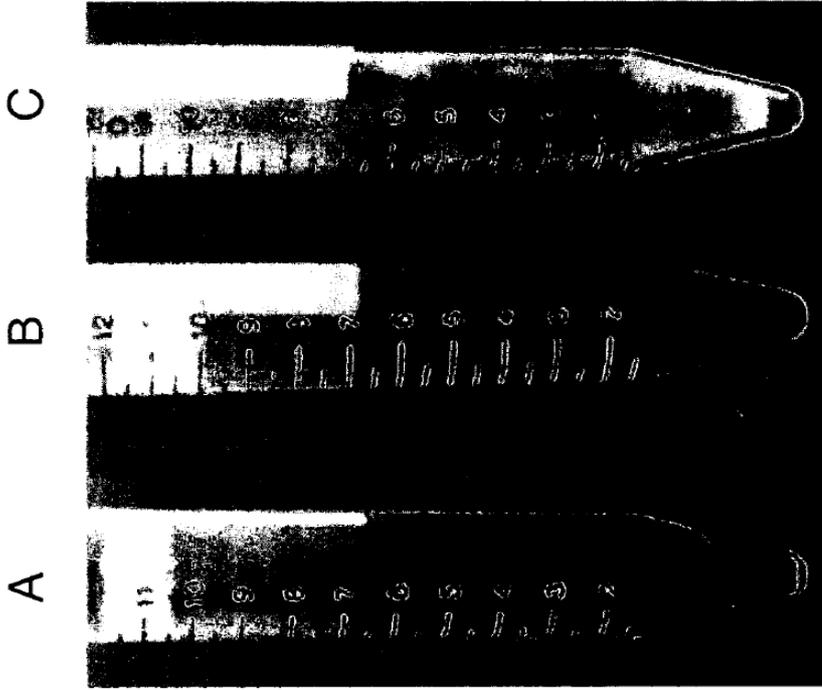


Figura 1

# Comparación de cladogramas de UTEX 1810, SAG 2046, SAG 27,87

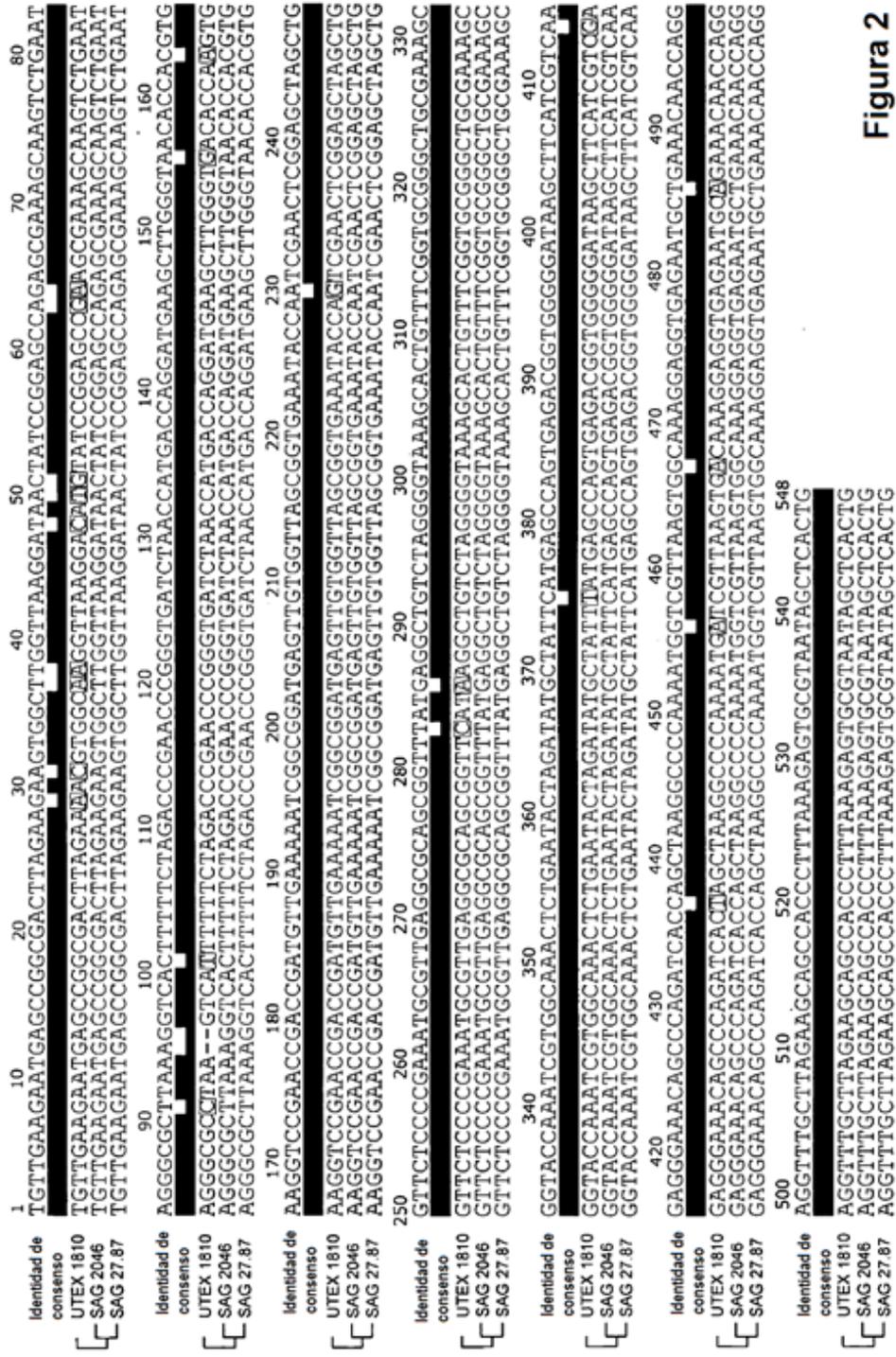


Figura 2

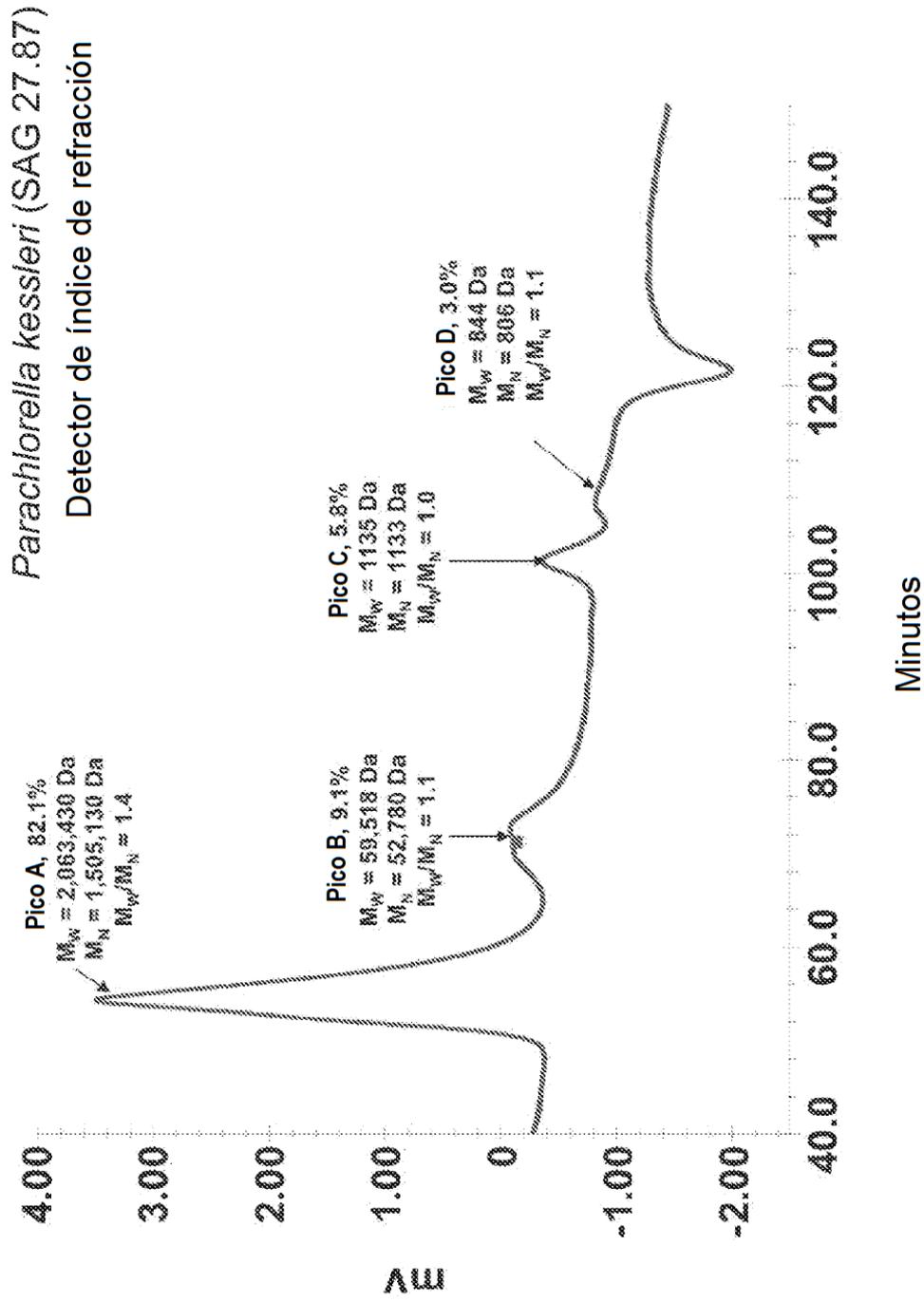


Figura 3A

*Parachlorella beijerinckii* (SAG 2046)

Detector de índice de refracción

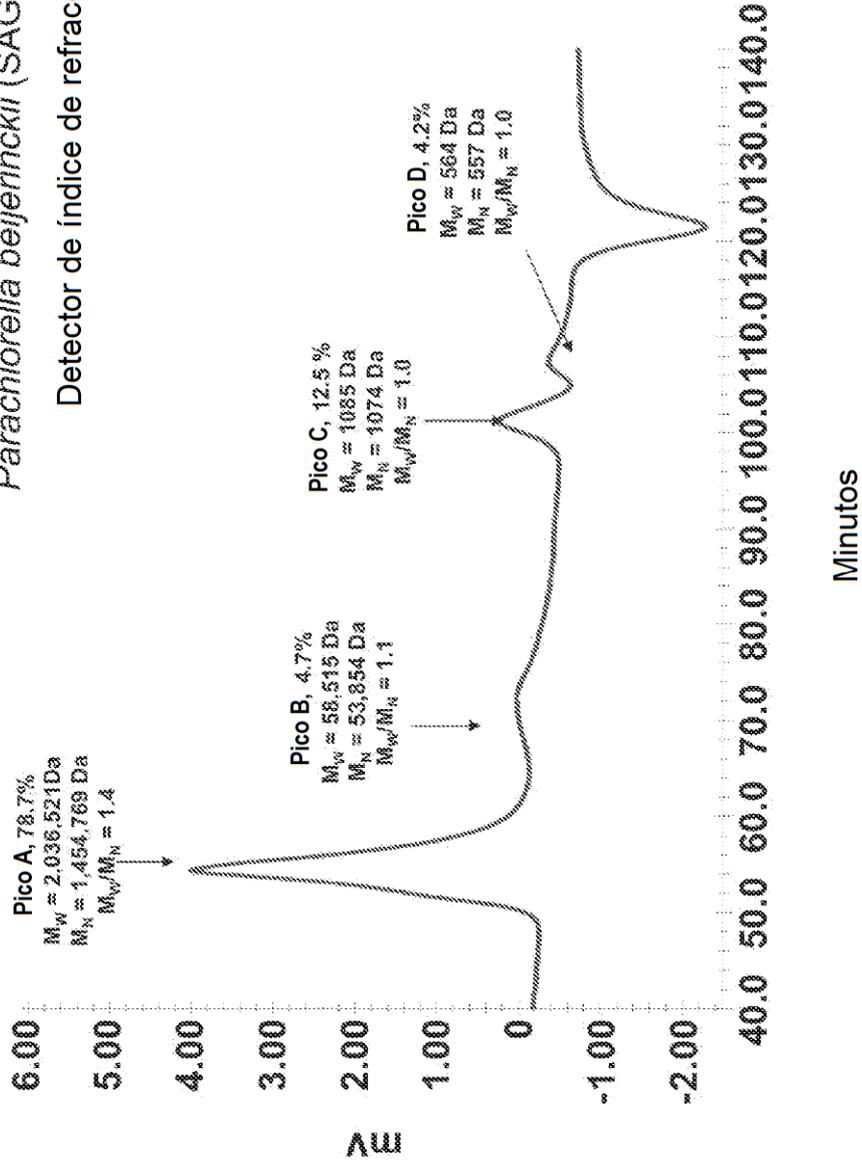


Figura 3B