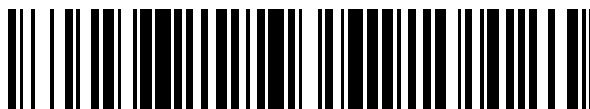


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 678**

51 Int. Cl.:

A61K 36/05 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2014** **PCT/EP2014/074937**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015** **WO15071497**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2014** **E 14799180 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020** **EP 3071212**

54 Título: **Extracto de algas para su uso como agente inmunomodulador**

30 Prioridad:

18.11.2013 FR 1361293

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

28.10.2020

73 Titular/es:

AMADEITE (100.0%)

ZA du Haut Bois

56580 Brehan, FR

72 Inventor/es:

DEMAIS, HERVÉ;

NYVALL COLLÈN, PI;

LE GOFF, MATTHIEU y

LE CHEVILLER, ISABELLE

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 790 678 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

Extracto de algas para su uso como agente inmunomodulador

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un extracto de algas del orden de las ulvales, en particular un extracto de algas verdes de tipo *Ulva*, para su uso para modular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal, en particular para estimular la respuesta inmunitaria frente a las infecciones. Se refiere igualmente al uso no terapéutico de un extracto de algas verdes de tipo *Ulva* para modular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal.
- 10 **[0002]** La modulación de la respuesta inmunitaria es un eje de tratamiento importante para numerosas enfermedades. De hecho, es importante por ejemplo mejorar la respuesta inmunitaria en los pacientes que sufren infecciones.
- [0003]** La estimulación de la respuesta inmunitaria es además un mecanismo importante en muchos aspectos.
- 15 Se sabe por ejemplo que la leche materna está enriquecida con IgA, anticuerpos que permitirán la protección del recién nacido contra un cierto número de infecciones. Las células intestinales, en particular sus células epiteliales, están expuestas a diversos agentes patógenos contra los cuales se producen anticuerpos. Estos anticuerpos migrarán a continuación hasta la glándula mamaria y se añadirán a la leche materna, procurando así una protección al lactante. Siempre existe la necesidad de identificar nuevas sustancias capaces de estimular esta reacción inmunitaria. En particular, las células epiteliales intestinales constituyen un sitio privilegiado a cuyo nivel podrían actuar las sustancias inmunoestimuladoras administradas por vía oral. Existe además la necesidad de identificar nuevas sustancias capaces de aumentar la respuesta a la vacunación, estimulando la respuesta inmunitaria, en particular a través de una administración complementaria a la vacunación. Las especies de ulvas (Ulvales, Chlorophyta) son unas algas abundantes que se encuentran en la zona intercotidal o marismas. Colonizan los sustratos duros, ancladas por un disco de fijación, pero determinadas especies pueden asimismo dar lugar a unas formas vivas libres, a la deriva. Las ulvas son unas algas de crecimiento rápido y oportunistas en cuanto al espacio y a la absorción de los nutrientes. Su crecimiento en la columna de agua se observa particularmente en las aguas costeras eutrofizadas y en las lagunas donde *Ulva* sp prolifera en forma de «mareas verdes» (Fletcher, 1996). A menudo tiene como resultado una producción de masa y unas encalladuras masivas que producen unos gases nocivos cuando se acumulan (Morand et Briand, 1996). Hasta la actualidad, esta biomasa ha presentado un valor añadido muy bajo y los medios para usarla fuera del compuesto (Mazé y col. 1993, Cuomo y col. 1995), de la producción de metano (Briand et Morand, 1997), del consumo alimentario humano (Pérez, 1997) o como base de papel (Nicolucci et Monegato 1993) podrían permitir aprovechar sus propiedades específicas. También se menciona aquí el artículo "Stimulation of Turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides" de R. Castro y col. (Aquaculture 254 (2006) 9-20).
- 35 **[0004]** Los autores de la presente invención han puesto de relieve, de forma sorprendente, que un extracto de algas del orden de las ulvales, en particular un extracto de algas verdes de tipo *Ulva*, poseía propiedades inmunomoduladoras.
- 40 **[0005]** Así, la presente invención se refiere a un extracto de algas del orden de las ulvales, en particular un extracto de algas verdes de tipo *Ulva*, que comprende polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es inferior o igual a 50 kDa (excluidos los polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño discriminado por ultrafiltración es superior a 50 kDa) para su uso con el fin de modular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal.
- 45 **[0006]** Se refiere igualmente al uso no terapéutico de un extracto de algas del orden de las ulvales, en particular un extracto de algas verdes de tipo *Ulva*, que comprende polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es inferior o igual a 50 kDa para modular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal.
- 50 **[0007]** En particular, la presente invención se refiere a un extracto de algas para su uso tal como se define anteriormente, o el uso no terapéutico de un extracto algas tal como se define anteriormente, en el que los polisacáridos comprenden manosa y/o arabinosa, preferentemente manosa. Todavía más en particular, dichos polisacáridos comprenden al menos el 0,005 % de manosa y/o al menos el 0,005 % de arabinosa, en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas, preferentemente al menos el 0,005 % de manosa.
- 55 Todavía más en particular, dichos polisacáridos comprenden manosa en una cantidad comprendida entre el 0,005 y el 0,5 %, por ejemplo del 0,005 al 0,20 % o del 0,15 al 0,5 % y/o arabinosa en una cantidad comprendida entre el 0,005 y el 0,5 %, en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas, preferentemente manosa en una cantidad comprendida entre el 0,005 y el 0,5 %, por ejemplo del 0,005 al 0,20 % o del 0,15 al 0,5 % en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas.
- 60 **[0008]** La presente invención se refiere todavía más en particular a un extracto de algas para su uso tal como se define anteriormente, o al uso no terapéutico de un extracto algas tal como se define anteriormente, en el que dichos polisacáridos comprenden, además:
- 65 - galactosa; y/o

- glucosa; y/o
- ramnosa; y/o
- xilosa; y/o
- ácido glucurónico.

5

[0009] Más en particular, dichos polisacáridos comprenden:

- del 0,05 al 0,5 % de galactosa; y/o
- del 0,005 al 0,5 % de glucosa, en particular del 0,005 al 0,05 % o del 0,05 al 0,5 %; y/o;
- 10 - del 2 al 15 % de ramnosa; y/o
- del 0,1 al 1 % de xilosa; y/o
- del 1 al 7 % de ácido glucurónico;

en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas. La presente invención se refiere
15 asimismo a un extracto de algas del orden de las ulvales, en particular un extracto de algas verdes del tipo *Ulva*, susceptibles de ser obtenidas por un procedimiento en el que:

- a) las algas se lavan y se les quita la arena;
- b) dichas algas se trituran;
- 20 c) la fase sólida del triturado se separa de su fase líquida;
- d) dicha fase líquida se clarifica;
- e) el jugo obtenido en la etapa d) se ultrafiltra con una membrana de 50 kDa o menos; y
- f) el jugo de filtrado obtenido en la etapa e) se concentra y después se seca; para su uso para modular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal.

25

[0010] Se refiere asimismo al uso no terapéutico de un extracto de algas del orden de las ulvales, en particular un extracto de algas verdes del tipo *Ulva*, susceptibles de ser obtenidas por un procedimiento en el que:

- a) las algas se lavan y se les quita la arena;
- 30 b) dichas algas se trituran;
- c) la fase sólida del triturado se separa de su fase líquida;
- d) dicha fase líquida se clarifica;
- e) el jugo obtenido en la etapa d) se ultrafiltra con una membrana de 50 kDa o menos; y
- f) el jugo de filtrado obtenido en la etapa e) se concentra y después se seca; para modular la respuesta inmunitaria
- 35 en un ser humano o un animal.

[0011] En particular, la presente invención se refiere a un extracto de algas para su uso tal como se menciona anteriormente, o el uso no terapéutico de un extracto de algas tal como se indica anteriormente, para estimular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal, en particular en el sistema inmunitario intestinal. En el marco de
40 la presente invención, se entiende por propiedades «inmunomoduladoras» o que permiten la «modulación de la respuesta inmunitaria», el significado aportado habitualmente a estos términos y bien conocido por el experto en la materia, en particular cualquier propiedad que permite estimular o frenar las reacciones inmunitarias del cuerpo humano o animal.

45 **[0012]** En particular, el extracto de algas para su uso según la invención, o el uso no terapéutico del extracto de algas según la invención, permite inducir la expresión de moléculas de adhesión y de quimiocinas, especialmente IL8 y/o IL-1 α y/o IL1- β y/o IL6 y/o TNF- α y/o CCL20.

[0013] Así el extracto de algas tal como se define en el marco de la presente invención es útil en el tratamiento
50 y/o la prevención de las patologías infecciosas, en particular las patologías infecciosas porcinas elegidas entre: parvovirus, erisipela porcina, rinitis infecciosa, gripe (influenza), circovirus porcina, micoplasmosis y colibacilosis; las patologías infecciosas aviares elegidas entre: enfermedad de Marek, enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa, enfermedad de Gumboro, viruela aviar, micoplasmosis, anemia infecciosa aviar, laringotraqueítis infecciosa, EDS y gripe aviar; las patologías infecciosas bovinas elegidas entre: BVD (diarreas víricas bovina),
55 bronconeumonía enzoótica, IBR, virosis herpética, clostridiosis, colibacilosis, fiebre catarral, coronaviriosis, rotaviriosis y rinotraqueítis; y las patologías infecciosas acuícolas elegidas entre: necrosis hematopoyética, vibriosis, forunculosis, necrosis pancreática infecciosa y anemia infecciosa.

[0014] La presente invención se refiere así igualmente a un extracto de algas tal como se describe en el marco
60 de la presente invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una patología infecciosa tal como las mencionadas anteriormente.

[0015] En particular, el extracto de algas tal como se define en el marco de la presente invención es útil en el marco de una profilaxis vacunal, a modo de complemento de la vacunación.

65

[0016] Más en particular, la presente invención se refiere a un extracto de algas para su uso tal como se indica anteriormente, en el que el extracto de algas se usa en una composición farmacéutica para una administración oral.

[0017] Según otra realización de la presente invención, el extracto de algas para su uso tal como se indica anteriormente, se usa en una composición farmacéutica por vía parenteral.

[0018] La presente invención se refiere igualmente al uso no terapéutico de un extracto de algas tal como se indica anteriormente, en el que el extracto de algas se usa en un complemento alimentario para una administración oral.

[0019] Se describe especialmente un extracto de algas tal como se describe en el marco de la presente invención en la solicitud de patente FR1261909.

[0020] Tal como se indica anteriormente, un extracto de algas tal como se describe en el marco de la presente invención se refiere a un extracto de algas del orden de las ulvales, en particular un extracto de algas verdes de tipo *Ulva*, que comprende polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es inferior o igual a 50 kDa. Más en particular, el extracto de algas contiene polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es inferior a 40, 30, 20 o 15 kDa. Todavía más en particular, los polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados del extracto de algas tienen un tamaño inferior a o igual a 15 kDa.

[0021] El extracto de algas tal como se describe en el marco de la presente invención comprende polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es inferior o igual a 50 kDa, excluyendo polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es superior a 50 kDa.

[0022] Según otra realización de la invención, el extracto de algas tal como se describe en el marco de la presente invención comprende polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es inferior o igual a 15 kDa, excluyendo polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es superior a 15 kDa.

[0023] Un dalton (Da) es una unidad de masa definida como igual a una doceava parte de la masa de un átomo de carbono 12, masa que después se calculará a partir de una mezcla de varios isótopos (principalmente carbono 12 y carbono 13, que tienen 6 y 7 neutrones, respectivamente, además de los 6 protones de cualquier átomo de carbono). Un dalton es, con una precisión bastante buena, la masa de un átomo de hidrógeno, el valor exacto es 1,00794 uma (unidad de masa atómica). El kilodalton (kDa) es igual a 1.000 Da.

[0024] En el contexto de la presente invención, las masas mencionadas en kDa se determinan por cualquier método usado habitualmente por el experto en la materia, en particular las masas de polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados de extractos de algas según la presente invención pueden ser discriminados por ultrafiltración en las membranas permitiendo filtrar sólo las moléculas de tamaños predeterminados.

[0025] En particular, y tal como se menciona anteriormente, los polisacáridos del extracto de algas descritos en el marco de la presente invención comprenden manosa y/o arabinosa, preferentemente manosa. Más en particular, dichos polisacáridos comprenden al menos el 0,005 % de manosa y/o al menos el 0,005 % de arabinosa, en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas, principalmente al menos el 0,01 % de manosa y/o al menos el 0,01 % de arabinosa. Todavía más en particular, dichos polisacáridos comprenden manosa en una cantidad comprendida entre el 0,01 y el 0,50 %, por ejemplo del 0,01 al 0,20 % o del 0,20 al 0,5 % y/o arabinosa en una cantidad comprendida entre el 0,01 y el 0,5 %, en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas, especialmente manosa en una cantidad comprendida entre el 0,03 y el 0,45 %, por ejemplo del 0,03 al 0,15 % o de 0,15 al 0,45 % y/o arabinosa en una cantidad comprendida entre el 0,01 y el 0,2 %.

[0026] Preferentemente, dichos polisacáridos comprenden manosa en una cantidad comprendida entre el 0,01 y el 0,50 %, por ejemplo, del 0,01 al 0,20 % o del 0,20 al 0,5 %, especialmente manosa en una cantidad comprendida entre el 0,03 y el 0,45 %, por ejemplo, del 0,03 al 0,15 % o del 0,15 al 0,45 %.

[0027] De forma particular, y tal como se menciona anteriormente, dichos polisacáridos comprenden, además:

- galactosa; y/o
- glucosa; y/o
- ramnosa; y/o
- xilosa; y/o
- ácido glucurónico.

[0028] Todavía más en particular, dichos polisacáridos comprenden:

- del 0,05 al 0,5 % de galactosa, principalmente del 0,1 al 0,4 %; y/o
- del 0,005 al 0,5 % de glucosa, en particular del 0,005 al 0,05 %, especialmente del 0,01 al 0,03 %, o del 0,05 al

0,5 %; %; y/o

- del 2 al 15 % de ramnosa, especialmente del 5 al 10 %; y/o
- del 0,1 al 1 % de xilosa, especialmente del 0,3 al 0,7 %; y/o
- del 1 al 7 % de ácido glucurónico, especialmente del 1 al 5 %;

5

en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas.

[0029] De este modo, por ejemplo, se puede citar un extracto de algas para su uso según la invención que comprende:

10

- manosa; y/o
- arabinosa; y/o - galactosa; y/o
- glucosa; y/o
- ramnosa; y/o

15

- xilosa; y/o
- ácido glucurónico.

Más en particular se puede citar por ejemplo un extracto de algas para su uso según la invención que comprende:

20 - del 0,01 al 0,50 % de manosa, por ejemplo, del 0,01 al 0,20 %, especialmente del 0,03 al 0,15 % o del 0,20 al 0,5 %; y/o

- del 0,01 al 0,5 % de arabinosa, especialmente del 0,01 al 0,2 %; y/o

- del 0,05 al 0,5 % de galactosa, especialmente del 0,1 al 0,4 %; y/o

- del 0,005 al 0,5 % de glucosa, en particular del 0,005 al 0,05 %, especialmente del 0,01 al 0,03 %, o del 0,05 al 0,5 %;

25 y/o

- del 2 al 15 % de ramnosa, especialmente del 5 al 10 %; y/o

- del 0,1 al 1 % de xilosa, especialmente del 0,3 al 0,7 %; y/o

- del 1 al 7 % de ácido glucurónico, especialmente del 1 al 5 %;

30 en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas.

Se puede incluso más en particular citar un extracto de algas para su uso según la invención que comprende:

- el 0,09 % de manosa; y/o

- el 0,1 % de arabinosa; y/o

35 - el 0,3 % de galactosa; y/o

- el 0,02 % de glucosa; y/o

- el 8,1 % de ramnosa; y/o

- el 0,5 % de xilosa; y/o

- el 2,6 % de ácido glucurónico;

40

en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas.

Además, se puede más en particular citar un extracto de algas para su uso según la invención que comprende:

- el 0,3 % de manosa; y/o

45 - el 0,2 % de galactosa; y/o

- el 0,4 % de glucosa; y/o

- el 7,9 % de ramnosa; y/o

- el 0,5 % de xilosa; y/o

- el 4,9 % de ácido glucurónico;

50

en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas.

[0030] Por tanto, la presente invención se refiere asimismo al uso no terapéutico de un extracto de algas según la invención, en el que el extracto de algas comprende:

55

- manosa; y/o

- arabinosa; y/o

- galactosa; y/o

- glucosa; y/o

60 - ramnosa; y/o

- xilosa; y/o

- ácido glucurónico,

y más en particular:

65

- del 0,01 al 0,50 % de manosa, por ejemplo, del 0,01 al 0,20 %, especialmente del 0,03 al 0,15 % o del 0,20 al 0,5 %; y/o
- del 0,01 al 0,5 % de arabinosa, especialmente del 0,01 al 0,2 %; y/o
- del 0,05 al 0,5 % de galactosa, especialmente del 0,1 al 0,4 %; y/o
- 5 - del 0,005 al 0,5 % de glucosa, en particular del 0,005 al 0,05 %, especialmente del 0,01 al 0,03 %, o del 0,05 al 0,5 %; y/o
- del 2 al 15 % de ramnosa, especialmente del 5 al 10 %; y/o
- del 0,1 al 1 % de xilosa, especialmente del 0,3 al 0,7 %; y/o
- del 1 al 7 % de ácido glucurónico, especialmente del 1 al 5 %;

10

en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas, y todavía más en particular comprende:

- el 0,09 % de manosa; y/o
- 15 - el 0,1 % de arabinosa; y/o
- el 0,3 % de galactosa; y/o
- el 0,02 % de glucosa; y/o
- el 8,1 % de ramnosa; y/o
- el 0,5 % de xilosa; y/o
- 20 - el 2,6 % de ácido glucurónico;

en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas, o que comprende:

- 25 - el 0,3 % de manosa; y/o
- el 0,2 % de galactosa; y/o
- el 0,4 % de glucosa; y/o
- el 7,9 % de ramnosa; y/o
- el 0,5 % de xilosa; y/o
- 30 - el 4,9 % de ácido glucurónico;

en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas.

[0031] Tal como se indica anteriormente, el extracto de algas tal como se describe en el marco de la presente invención es un extracto de algas del orden de las ulvales, en particular un extracto de algas verdes de tipo *Ulva*, que puede obtenerse por un procedimiento de preparación en el que:

- a) las algas se lavan y se les quita la arena;
- b) dichas algas se trituran;
- 40 c) la fase sólida del triturado se separa de su fase líquida;
- d) dicha fase líquida se clarifica;
- e) el jugo obtenido en la etapa d) se ultrafiltra en una membrana de 50 kDa o menos; y el jugo de filtración obtenido en la etapa e) se concentra y después se seca.

45 **[0032]** Según una realización de la invención, el extracto de algas comprende:

- del 10 al 50 % de carbono;
- del 1 al 10 % de hidrógeno;
- del 1 al 5 % de nitrógeno;
- 50 - del 20 al 50 % de oxígeno; y
- del 1 al 15 % de azufre;

en porcentaje en masa de la materia seca total del extracto de algas. Todavía más en particular, el extracto de algas comprende:

55

- del 15 al 30 % de carbono;
- del 3 al 6 % de hidrógeno;
- del 1 al 3 % de nitrógeno;
- del 25 al 40 % de oxígeno; y

60

- del 2,5 al 10 % de azufre;

en porcentaje en masa de la materia seca total del extracto de algas.

Según otra realización de la invención, el extracto de algas comprende:

- 65 - del 10 al 50 % de carbono;

- del 1 al 10 % de hidrógeno;
- del 0,5 al 5 % de nitrógeno;
- del 20 al 60 % de oxígeno; y
- del 1 al 15 % de azufre;

5

en porcentaje en masa de la materia seca total del extracto de algas.

Los otros elementos químicos presentes en la materia seca del extracto están representados especialmente por los minerales (Ca, K, Na, mg, Al, Cl, I, P, Fe, etc.).

- 10 **[0033]** Más en particular, el extracto de algas tal como se describe en el marco de la presente invención se caracteriza por el espectro RMN ^1H presentado en la Figura 1.

[0034] Este espectro RMN ^1H se ha registrado a 298 K en un espectrómetro Bruker Avance 500 equipado con una sonda criogénica inversa de 5 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ TCI. Antes del análisis, se disolvieron las muestras en el 99,97 % de átomo de D_2O . Los desplazamientos químicos se expresan en ppm en comparación con el patrón externo (ácido trimetilsililpropiónico). No se ha realizado ninguna supresión de la señal de HOD.

15

- [0035]** Según una realización de la presente invención, el extracto de algas que comprende en particular polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es inferior o igual a 50 kDa es tal que puede obtenerse por un procedimiento de preparación en el que:

20

- a) las algas se lavan y se les quita la arena;
- b) dichas algas se trituran;
- c) la fase sólida del triturado se separa de su fase líquida;
- 25 d) dicha fase líquida se clarifica;
- e) el jugo obtenido en la etapa d) se ultrafiltra con una membrana de 50 kDa o menos; y
- f) el jugo de filtración obtenido en la etapa e) se concentra y después se seca.

25

- [0036]** En particular, para la implementación del procedimiento tal como se indica en el marco de la presente invención, en la etapa a) del mismo, las algas se lavan en agua dulce.

30

[0037] Se les puede quitar la arena usando cualquier medio a disposición del experto en la materia.

[0038] Dichas algas se trituran después principalmente mediante un triturador, como ejemplo un afinador o un

35

[0039] A continuación, la fase sólida del triturado, el orujo, se separa de su fase líquida, el jugo, por prensado del triturado, por ejemplo, con la ayuda de una prensa de cinta o de platos, o por centrifugación.

- 40 **[0040]** Por «jugo», se entiende el jugo citoplasmático que incluye la estructura parietal de la doble estructura de las células de las algas.

[0041] La fase líquida obtenida se clarifica después, por ejemplo, con un clarificador de platos, o por centrifugación, decantación o filtración (por ejemplo, de bolsa o de placa).

45

[0042] Después, se ultrafiltra el jugo.

[0043] Según una realización para la implementación del procedimiento tal como se indica en el marco de la presente invención, la ultrafiltración se realiza en una membrana de 50 kDa o menos, especialmente en una membrana de 40, 30, 20 o 15 kDa. Más en particular, la membrana será una membrana de 15 kDa o menos.

50

[0044] Esta membrana puede ser por ejemplo una membrana de cerámica o una membrana orgánica. Más en particular, la membrana es una membrana de cerámica.

- 55 **[0045]** El jugo de filtración obtenido se puede concentrar después, por ejemplo, por ósmosis inversa, evaporación o precipitación, después se seca por liofilización o atomización.

[0046] Opcionalmente, el extracto obtenido puede triturarse de nuevo después, con el fin de obtener un polvo homogéneo en términos de granulometría.

60

[0047] Según uno de estos aspectos, el procedimiento se desarrolla en parte a temperatura ambiente. Por temperatura ambiente se entiende una temperatura comprendida entre 5 y 25 °C.

[0048] Según otro de estos aspectos, el procedimiento se desarrolla en parte a una temperatura comprendida entre 4 y 10 °C, esto con el fin de evitar los crecimientos microbianos.

65

[0049] Según una realización para la implementación del procedimiento tal como se indica en el marco de la presente invención, el extracto de algas obtenido en la etapa f) del procedimiento mencionado anteriormente se purifica, por ejemplo, por ultrafiltración, en particular en una casete de ultrafiltración, especialmente con el fin de eliminar la parte mineral.

[0050] Según otro de estos aspectos, el extracto de algas para su uso según la invención se obtiene por el procedimiento tal como se describe anteriormente.

[0051] El procedimiento difiere de la mayoría de los procedimientos descritos en la técnica anterior debido a la ausencia de una etapa que implique una precipitación del extracto de algas. Se diferencia asimismo de los procedimientos anteriores por la falta de uso de solventes, en particular orgánicos, lo que representa una ventaja importante desde el punto de vista ecológico.

[0052] Por «algas verdes del tipo *Ulva*», se entiende las algas verdes agrupadas en el género *Ulva*, de la familia de las Ulvaceae, del orden de las ulvales. Se pueden citar principalmente las especies y las subespecies siguientes: *Ulva acanthophora*, *Ulva anandii*, *Ulva angusta*, *Ulva arasakii*, *Ulva armoricana*, *Ulva atroviridis*, *Ulva attenuata*, *Ulva beytensis*, *Ulva bifrons*, *Ulva brevistipitata*, *Ulva bulbosa*, *Ulva burmanica*, *Ulva byssoides*, *Ulva californica*, *Ulva chaetomorphoides*, *Ulva clathrata*, *Ulva coccinea*, *Ulva compressa*, *Ulva conglobata*, *Ulva cornucopiae*, *Ulva cornuta*, *Ulva covelongensis*, *Ulva crassa*, *Ulva crassimembrana*, *Ulva curvata*, *Ulva dactylifera*, *Ulva denticulata*, *Ulva elegans*, *Ulva elminthoides*, *Ulva enteromorpha*, *Ulva erecta*, *Ulva expansa*, *Ulva fasciata*, *Ulva fenestrata*, *Ulva flexuosa*, *Ulva gelatinosa*, *Ulva geminoidea*, *Ulva gigantea*, *Ulva grandis*, *Ulva hendayensis*, *Ulva hookeriana*, *Ulva hopkirkii*, *Ulva indica*, *Ulva intestinalis*, *Ulva intestinaloides*, *Ulva intricata*, *Ulva intybacea*, *Ulva javanica*, *Ulva kyllinii*, *Ulva lactuca*, *Ulva lactucaefolia*, *Ulva laetevirens*, *Ulva laingii*, *Ulva linearis*, *Ulva lingulata*, *Ulva linkiana*, *Ulva linza*, *Ulva lippii*, *Ulva litoralis*, *Ulva littorea*, *Ulva lobata*, *Ulva lubrica*, *Ulva marginata*, *Ulva micrococca*, *Ulva myriotrema*, *Ulva neapolitana*, *Ulva nematoidea*, *Ulva ohnoi*, *Ulva olivacea*, *Ulva olivaceum*, *Ulva pacifica*, *Ulva papenfussii*, *Ulva paradoxa*, *Ulva parva*, *Ulva parvula*, *Ulva patengensis*, *Ulva percurva*, *Ulva pertusa*, *Ulva phyllosa*, *Ulva popenguinensis*, *Ulva porrifolia*, *Ulva procera*, *Ulva profunda*, *Ulva prolifera*, *Ulva pseudocurvata*, *Ulva pseudolinza*, *Ulva pulchra*, *Ulva purpurascens*, *Ulva quilonensis*, *Ulva radiata*, *Ulva ralfsii*, *Ulva ranunculata*, *Ulva reticulata*, *Ulva rhacodes*, *Ulva rigida*, *Ulva rotundata*, *Ulva rubens*, *Ulva saifullahii*, *Ulva scagelii*, *Ulva scandinavica*, *Ulva sericea*, *Ulva serrata*, *Ulva simplex*, *Ulva sorensenii*, *Ulva spinulosa*, *Ulva stenophylla*, *Ulva stipitata*, *Ulva sublittoralis*, *Ulva subulata*, *Ulva taeniata*, *Ulva tenera*, *Ulva tetragona*, *Ulva torta*, *Ulva tuberosa*, *Ulva umbilicata*, *Ulva uncialis*, *Ulva uncinata*, *Ulva usneoides*, *Ulva utricularis*, *Ulva utriculosa*, *Ulva uvoides*, *Ulva ventricosa*.

[0053] Así, un extracto de algas para su uso según la presente invención puede usarse en aplicaciones veterinarias, y estar comprendido en un medicamento o una composición farmacéutica, para modular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal, en particular para estimular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal, y más en particular para prevenir y/o tratar una patología infecciosa tal como las mencionadas anteriormente, todavía más en particular en el marco de una profilaxis vacunal, a modo de complemento de la vacunación.

[0054] Así la presente invención se refiere igualmente a un extracto de algas para su uso tal como se menciona anteriormente, en el que el extracto de algas está comprendido en una composición farmacéutica o en un medicamento.

[0055] El uso no terapéutico de un extracto de algas según la presente invención puede por su parte estar dirigido a aplicaciones destinadas a seres humanos o a animales, por ejemplo, a través de complementos alimentarios en el marco de la salud sin efectos secundarios para modular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal, en particular para estimular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal.

[0056] Así la presente invención se refiere igualmente al uso no terapéutico de un extracto de algas tal como se menciona anteriormente, en el que el extracto de algas está comprendido en una composición alimentaria.

[0057] En particular, la composición alimentaria es útil a modo de complemento de la vacunación.

[0058] Los excipientes farmacéuticamente aceptables usados para la preparación de un medicamento o de una composición farmacéutica que comprende un extracto de algas para su uso según la invención se eligen según la forma farmacéutica y el modo de administración deseado, entre los excipientes habituales que son conocidos por el experto en la materia.

[0059] En la presente invención para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, local, intratraqueal, intranasal, transdérmica o rectal, el extracto de algas tal como se define anteriormente, puede administrarse en forma de dosis unitarias, en mezcla con excipientes farmacéuticos clásicos, a los animales y a los seres humanos, para modular la respuesta inmunitaria, en particular para prevenir y/o tratar patologías

infecciosas como las mencionadas anteriormente.

[0060] Las formas de administración adecuadas incluyen formas orales como comprimidos, cápsulas blandas o duras, polvos, gránulos y soluciones o suspensiones orales, formas de administración sublingual, bucal, intratraqueal, intraoculares, intranasales, por inhalación, formas de administración tópicas, parenterales como transdérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa, formas de administración rectal e implantes. Para la aplicación tópica, se pueden usar los extractos de algas para su uso según la invención en cremas, geles, pomadas o lociones.

[0061] Cuando se prepara una composición sólida en forma de comprimidos, el ingrediente activo principal se puede mezclar con un vehículo farmacéutico, como gelatina, almidón, lactosa, estearato de magnesio, talco, goma arábica o análogos.

[0062] Los comprimidos se pueden recubrir igualmente con sacarosa, un derivado celulósico, o con otras sustancias adecuadas o incluso se pueden tratar de modo que tengan una actividad prolongada o retardada y que liberen de forma continua una cantidad predeterminada del principio activo.

[0063] Una preparación en forma de cápsulas se puede obtener por ejemplo mezclando el ingrediente activo con un diluyente y vertiendo la mezcla obtenida en unas cápsulas blandas o duras.

[0064] En una realización particular, el extracto de algas, el medicamento o la composición farmacéutica para su uso según la presente invención están destinados a una administración oral. En otra realización, el extracto de algas, el medicamento o la composición farmacéutica para su uso según la presente invención están destinados a una administración parenteral.

[0065] Los medicamentos o composiciones farmacéuticas que comprenden un extracto de algas para su uso según la invención pueden presentarse también en forma líquida, por ejemplo, en forma de soluciones, emulsiones, suspensiones o jarabes, y especialmente en una forma adaptada para una administración oral o intranasal, por ejemplo. Los soportes líquidos adecuados pueden ser, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos como glicerol o glicoles, así como sus mezclas, en proporciones variables, en agua.

[0066] Una preparación en forma de jarabe o elixir o para administración en forma de gotas puede contener también el ingrediente activo junto con un edulcorante, acalórico, por ejemplo, como el metilparabeno y el propilparabeno como antiséptico, así como un agente aromatizante y un colorante adecuado.

[0067] Los polvos o gránulos dispersables en agua pueden, por ejemplo, contener el ingrediente activo mezclado con agentes dispersantes o humectantes, o agentes de suspensión, como la polivinilpirrolidona, así como edulcorantes o correctores del sabor.

[0068] En general, en el marco de la presente invención, la dosis diaria del extracto de algas será la dosis eficaz más baja del extracto de algas capaz de producir un efecto inmunoestimulador.

[0069] Por «dosis eficaz» se designa cualquier cantidad de una composición que permite observar el efecto buscado, en este caso un efecto inmunoestimulador.

[0070] Según uno de sus aspectos, un extracto de algas para su uso según la invención se usa en una composición tal como se menciona anteriormente para una administración a una dosis en el ser humano comprendida entre 0,1 y 100 mg/kg, todavía más en particular entre 0,5 y 60 mg/kg, por ejemplo entre 1 y 20 mg/kg o entre 5 y 30 mg/kg, o a una dosis en el animal comprendida entre 1 y 200 mg/kg, más en particular entre 1 y 100 mg/kg, todavía más en particular entre 2 y 45 mg/kg o entre 10 y 60 mg/kg.

[0071] Según otro de sus aspectos, en el marco del uso no terapéutico de un extracto de algas según la presente invención, este puede usarse en una composición alimentaria.

[0072] Por «composición alimentaria», se entiende por ejemplo cualquier tipo de alimentos funcionales, productos alimentarios en forma de yogur o bebidas, principalmente lácteos, cualquier tipo de materia prima, aditivo o coadyuvante tecnológico, en forma de premezclas, medicinales o no, destinados a ser incorporados a los alimentos, cualquier tipo de alimento completo o suplemento, destinado al consumo humano o animal.

Según uno de sus aspectos, en el marco del uso no terapéutico de un extracto de algas en una composición alimentaria, este se usa para una administración a una dosis en el ser humano comprendida entre 0,1 y 100 mg/kg, todavía más en particular entre 0,5 y 60 mg/kg, por ejemplo entre 1 y 20 mg/kg o entre 5 y 30 mg/kg, o a una dosis en el animal comprendida entre 1 y 200 mg/kg, más en particular entre 1 y 100 mg/kg, todavía más en particular entre 2 y 45 mg/kg o entre 10 y 60 mg/kg.

[0073] La presente invención, según otro de estos aspectos, se refiere igualmente a un procedimiento para modular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal, en particular para estimular la respuesta inmunitaria

en un ser humano o un animal que comprende la administración, a un ser humano o un animal, de una dosis eficaz de un extracto de algas según la invención.

5 [0074] Más en particular el procedimiento según la presente invención estimula la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal, en particular en el sistema inmunitario intestinal.

[0075] Todavía más en particular, el procedimiento según la invención induce la expresión de moléculas de adhesión y de quimiocinas, especialmente las IL8 y/o IL-1 α y/o IL1- β y/o IL6 y/o TNF- α y/o CCL20,

10 [0076] El extracto de algas administrado en el marco del procedimiento según la invención puede estar comprendido en un medicamento, una composición farmacéutica o una composición alimentaria, tal como se menciona anteriormente.

15 [0077] Puede administrarse según los modos de administración mencionados anteriormente.

[0078] Según una realización para la implementación del procedimiento según la invención, el extracto de algas según la invención se administra en una composición farmacéutica.

20 [0079] En particular, dicho procedimiento es útil para la prevención y/o el tratamiento de una patología infecciosa tal como las mencionadas anteriormente.

[0080] Según otra realización para la implementación del procedimiento según la invención, el extracto de algas según la invención se administra en una composición alimentaria.

25 [0081] En particular, la presente invención se refiere igualmente a un procedimiento tal como se menciona anteriormente que comprende la administración, a un ser humano o un animal, de una dosis eficaz de un extracto de algas según la invención durante un periodo de 3 a 30 días, en particular de 10 a 20 días o de 3 a 10 días, a una dosis en el ser humano comprendida entre 0,1 y 100 mg/kg, más en particular entre 0,5 y 60 mg/kg, todavía más en particular entre 1 y 20 mg/kg o entre 5 y 30 mg/kg, o a una dosis en el animal comprendida entre 1 y 200 mg/kg, más en particular entre 1 y 100 mg/kg, todavía más en particular entre 2 y 45 mg/kg o entre 10 y 60 mg/kg.

35 [0082] Según una realización para la implementación del procedimiento según la invención, después de transcurrido el periodo de tiempo mencionado anteriormente, la administración del extracto de algas puede renovarse para un periodo equivalente.

[0083] Según uno de estos aspectos, la presente invención se refiere igualmente a un procedimiento tal como se menciona anteriormente que comprende:

a) la preparación de un extracto de algas según la invención por el procedimiento siguiente:

- 40
- lavado y retirada de la arena de las algas;
 - trituración de dichas algas;
 - separación de la fase sólida del triturado de su fase líquida;
 - clarificación de dicha fase líquida;
- 45
- ultrafiltración del jugo obtenido en la etapa anterior en una membrana de 50 kDa o menos, por ejemplo, de 15 kDa o menos; y
 - concentración y después secado del jugo de filtración obtenido en la etapa anterior; seguido opcionalmente por una etapa de ultrafiltración, por ejemplo, en una casete de ultrafiltración; y

50 b) la administración, a un ser humano o un animal, de una dosis eficaz de un extracto de algas según la invención, en particular durante un periodo de 3 a 30 días, más en particular de 10 a 20 días o de 3 a 10 días, a una dosis en el ser humano comprendida entre 0,1 y 100 mg/kg, todavía más en particular entre 0,5 y 60 mg/kg, por ejemplo entre 1 y 20 mg/kg o entre 5 y 30 mg/kg, o a una dosis en el animal comprendida entre 1 y 200 mg/kg, más en particular entre 1 y 100 mg/kg, todavía más en particular entre 2 y 45 mg/kg o entre 10 y 60 mg/kg.

55 [0084] La presente invención se ilustrará en más detalle por las figuras y los ejemplos siguientes que no limitan su alcance.

FIGURAS

60 [0085]

Figura 1: Espectro RMN ¹H de un extracto de algas según la presente invención

Figura 2: Cromatograma obtenido con el extracto de algas según la invención separado en dos columnas shodex 802 y 803

65

Figura 3: Cromatograma obtenido después del análisis de derivados trimetilsililados de la muestra del extracto de algas según la invención por cromatografía en fase gaseosa. Con Ara: Arabinosa; Gal: Galactosa; Glc: Glucosa; Xyl: Xilosa; Man: Manosa; Rha: Ramnosa, GlcA: Ácido glucurónico

Figura 4: Evaluación de la dosis máxima no tóxica del extracto de algas EA1 según la invención

Figura 5: Evaluación de la dosis máxima no tóxica del extracto de algas EA2 según la invención

Figura 6: Evaluación de la dosis máxima no tóxica del extracto de algas EA3 según la invención

Figura 7: Efectos de los extractos de algas EA1, EA2 y EA3 según la invención en la expresión de IL8 (medida por qPCR)

Figura 8: Efectos de los extractos de algas EA1, EA2 y EA3 según la invención en la expresión de TNF- α (medida por qPCR)

Figura 9: Efectos de los extractos de algas EA1, EA2 y EA3 según la invención en la expresión de CCL20 (medida por qPCR)

Figura 10: Efectos del extracto de algas EA1 según la invención en la expresión de IL6 (medida por qPCR)

Figura 11: Efectos del extracto de algas EA1 según la invención en la expresión de IL1 α (medida por qPCR)

Figura 12: Efectos del extracto de algas EA1 según la invención en la expresión de IL1 β (medida por qPCR)

Figura 13: Efectos del extracto de algas EA1 según la invención en la expresión de PPAR γ (medida por qPCR)

Figura 14: Efectos del extracto de algas EA1 según la invención en la expresión de IL12p35 (medida por qPCR)

Figura 15: Efectos de los extractos de algas EA1 y EA3 según la invención medido por ELISA en la expresión de TNF- α .

Figura 16: Efectos de los extractos de algas EA1 y EA3 según la invención medido por ELISA en la expresión de IL-8

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de un extracto de algas según la invención

[0086] Una tonelada de algas del tipo *Ulva*, frescas y en bruto, se lavan en agua embotellada y se les quita la arena con la ayuda de una máquina para lavar las algas.

[0087] Salvo indicaciones contrarias, las etapas del procedimiento se realizan a temperatura ambiente.

[0088] Las algas (1 tonelada de algas escurridas al 8 % de materia seca) se trituran después en finas partículas mediante un afinador industrial (marca Inotec tipo «I175CDI-75D»). Por «finas partículas», se entiende unas partículas cuyo tamaño está comprendido entre 50 y 1.000 nm, con dos poblaciones, la primera cuyos tamaños están comprendidos entre 50 y 200 nm, la segunda cuyos tamaños están comprendidos entre 600 y 1.000 nm.

[0089] El triturado se prensa después mediante una prensa de cinta industrial de marca Flottweg tipo «B FRU 800 HK» a una velocidad de aproximadamente 1 tonelada/hora.

[0090] Esta etapa permite la separación de la fase sólida (orujo) de la fase líquida (jugo). El rendimiento en jugo obtenido es del 75 %.

[0091] Los 750 kg de jugo bruto obtenidos se clarifican después mediante un clarificador de platos de la marca Flottweg tipo «AC 2000».

[0092] Se obtienen de este modo 710 kg de un jugo claro al 3,10 % de materia seca (del 95 al 98 % de rendimiento en masa) y una crema (del 2 al 5 % en masa).

[0093] Después, el jugo claro se ultrafiltra en una membrana de cerámica (Tami Industries) de 15 kDa.

[0094] Se obtiene de este modo un permeato y un retenido. El permeato se conserva hasta la obtención de 640 kg de jugo de filtración (91 % de rendimiento en volumen) al 2,2 % de materia seca.

[0095] El jugo de filtración (permeato) se seca después por liofilización después de concentración por evaporación.

[0096] La concentración se realiza en un evaporador de efecto simple (EVA 1000, Pignat) con los parámetros siguientes: recirculación forzada, velocidad de alimentación 10L/h, presión de vapor de 1 bar, presión de vacío de 0,3 bar y temperatura de evaporación de 90 °C.

[0097] Una primera concentración se realiza con una velocidad de agua evaporada de 8L/h y el °brix aumenta del 5,5 (igual a una concentración de materia seca del 4,5 %) al 14,7.

[0098] A continuación, esta solución se concentra una segunda vez con una velocidad de agua evaporada de

5-6 L/h y el °brix aumenta hasta 34. La concentración de materia seca de la solución se determina al 38,4 %.

[0099] A continuación, la liofilización se realiza con la ayuda de un equipo Bioblock scientific (modelo CHRIST alpha 1-4 LSC) a una temperatura de congelación de -80 °C que es igualmente la temperatura mínima a lo largo de esta etapa.

[0100] El polvo obtenido se tritura después con un triturador planetario MiniMill de la marca Philips. El producto se ha introducido en unos recipientes de trituración (10 g de producto en cada recipiente de trituración con 4 bolas de zirconita). El conjunto se pone en rotación durante 15 minutos a la velocidad 10.

[0101] De este modo se obtienen 14 kg de polvo de extracto de algas.

Ejemplo 2: Determinación del tamaño de los polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados de un extracto de algas según la invención por GPC (Gel Permeation Chromatography)

[0102] El extracto de algas según la invención preparado según el ejemplo 1 se ultrafiltra en una membrana 1.000 Da y se disuelve a una concentración de 0,5 g/L en agua. Después se inyecta en dos columnas shodex 802 y 803 colocadas en serie (contexto de fraccionamiento de la columna 802: 4×10^3 Da y de la columna 803: $1,7 \times 10^5$ Da). El eluyente utilizado es el nitrato sódico 0,1 M con la azida de sodio al 0,2 % con una velocidad de 0,5 ml/min. La detección se ha realizado a través de refractómetro Wyatt y un detector de difusión de la luz 18 ángulos Wyatt. Los dn/dc se toman iguales a 0,150 mL/g.

[0103] El cromatograma detectado por el refractómetro se presenta en la figura 2.

[0104] Se obtiene un tamaño medio de los polisacáridos de un extracto de algas según la invención de 4,4 kDa.

Ejemplo 3: Determinación de la composición de un extracto de algas según la invención

[0105] El extracto de algas según la invención y preparado según el ejemplo 1 se purifica por ultrafiltración frontal en unas células amicon funcionando bajo agitación. Se utiliza una membrana en celulosa regenerada de umbral de corte de 1.000 Da. Se disuelve una muestra de 572,1 mg de extracto de algas según la invención en 150 ml de agua ultrapura milli-Q. Se utilizan cinco litros de agua para eliminar las moléculas de masa inferior a 1.000 Da. El retentado se liofiliza. Se pesan 117 mg en una muestra. El rendimiento de la ultrafiltración es entonces del 20,5 % (p/p). Se han realizado los análisis siguientes en las muestras ultrafiltradas.

[0106] La proporción de los monosacáridos constituyentes de los polisacáridos del extracto de algas según la invención se determina según el método de Kamerling (Kamerling y col., 1975) modificado por Montreuil (Montreuil y col., 1986). La identificación y la dosificación de los monosacáridos necesitan hidrólisis por metanólisis del polímero de modo que sólo se obtienen unos monómeros. Los residuos glicosídicos se trimetilsililan después para hacer que serán volátiles. De este modo se han identificado y dosificado por cromatografía en fase acuosa en forma de metilglicósidos O-trimetilsililados.

[0107] Se usan los reactivos siguientes:

- Solución de metanol/HCl 3 N (Supelco);
- Carbonato de plata;
- Mioinositol;
- Piridina;
- Reactivo Sylon BFT (BSTFA +TMCS 99:1) (Supelco); y
- Diclorometano.

[0108] El modo operativo es el siguiente: 400 µg del extracto algas preparados como se ha mencionado anteriormente y 50 µg de mioinositol se colocan en un baño en seco en presencia de 500 µl de una mezcla de metanol/ácido clorhídrico 3 N (Supelco) durante 4 horas a 100 °C. Las muestras se centrifugan 15 minutos a 3.000 rpm y el sobrenadante se evapora bajo un flujo de nitrógeno. A continuación, los compuestos se disuelven en 80 µl de piridina y se incuban durante 25 minutos a 80 °C con 80 µl de sylon (BSTFA: TMCS, 99:1, Supelco). Después de evaporación blanda de los reactivos en exceso bajo chorro de nitrógeno, se retoman los metilglicósidos trimetilsililados en 500 µl de diclorometano y a continuación se inyectan en cromatografía en fase gaseosa (inyección en columna, detector FID: ionización de llama). El gas vector es el nitrógeno. La columna, del tipo HP-5MS (30 m, 0,25 mm de diámetro interno), es apolar. El programa de ascenso de la temperatura es el siguiente: 120 °C mantenidos durante 1 minuto, después un gradiente de 1,5 °C/min hasta 180 °C, seguida de un gradiente de 2 °C/min hasta 200 °C.

[0109] Cada monosacárido es identificado por comparación de los tiempos de retención relativos en relación con el patrón interno, con los de los polisacáridos puros tratados en las mismas condiciones. Se calcula un coeficiente para cada monosacárido con respecto al calibre interno con el fin de definir la proporción de cada monosacárido en

los polisacáridos del extracto de algas según la invención.

[0110] Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1 siguiente y en la figura 3.

- 5 **Tabla 1:** Composición del extracto de algas según la invención obtenidas después del análisis de derivados trimetilsililados por cromatografía en fase gaseosa, expresada en peso con respecto al peso total del extracto de algas; con Ara: Arabinosa; Gal: Galactosa; Glc: Glucosa; Xyl: Xilosa; Man: Manosa; Rha: Ramnosa, GlcA: Ácido glucurónico

Muestra	% en peso del ultrafiltrado	Rendimiento de la ultrafiltración	% en peso del extracto bruto
Ara	0,6	20,50 %	0,123
Gal	1,3	20,50 %	0,267
Glc	0,1	20,50 %	0,021
Xyl	2,45	20,50 %	0,502
Man	0,45	20,50 %	0,092
Rha	39,6	20,50 %	8,118
GlcA	12,9	20,50 %	2,645

10 **Ejemplo 4: Evaluación de la actividad del extracto de algas según la invención en cuanto a su actividad inmunomoduladora**

[0111] Los efectos del extracto de algas según la invención se someten a ensayo en células epiteliales porcinas diferenciadas **IPEC-1**.

- 15 [0112] Las células epiteliales intestinales porcinas (Intestinal Porcine Epithelial Cell-1, IPEC-1) son células yeyunales de lechón transformadas espontáneamente.

20 [0113] Previamente se determina la cantidad óptima de células IPEC-1 para su depósito en los pocillos de una placa P6 para alcanzar la confluencia en 3 días. La dosis de $0,2 \times 10^5$ células/cm² se conserva como dosis óptima.

[0114] A continuación, se estudia la dosis máxima no tóxica del extracto de algas según la invención con el fin de determinar la dosis máxima que no inhibe la proliferación celular de las células IPEC-1. Se preparan dos extractos de algas según la invención según el ejemplo 1 (denominados respectivamente EA1 y EA2). Se prepara un tercer extracto de algas EA3, preparado igualmente según el ejemplo 1, pero que se ha sometido a una etapa de purificación ulterior. Para la purificación, el extracto EA3 se ultrafiltra en una casete PALL minimate de umbral de corte 1 kDa. A continuación, este extracto se liofiliza.

30 [0115] Los tres extractos se disuelven en 28 mL de medio DMEM/F12 completo. A continuación, se preparan 50 mL de solución al 1 %, o bien 0,5 g tomados en 50 mL. Seguidamente se efectúa una esterilización por filtración a 0,2 µm.

35 A continuación, se realizan diluciones en tubo Falcon 50 mL para ensayar diferentes concentraciones de extracto de algas, como se indica en la tabla 2 mostrada a continuación.

Tabla 2

Preparación de solución de un extracto de algas					
	1 %	0,5 %	0,1 %	0,05 %	0,01 %
dilución deseada		2	5	2	5
dilución obtenida		2	5	2	5
volumen de dilución anterior		19	9,5	18	6
volumen del medio	48	19	37,8	18	24
volumen total	48	38	47,3	36	30

(continuación)

Preparación de solución de un extracto de algas					
	1 %	0,5 %	0,1 %	0,05 %	0,01 %
resto	29,0	28,5	29,3	30,0	30,0

A continuación, se preparan las células siguiendo el protocolo que se muestra seguidamente:

- 5 1. preparación de 28 ml de suspensión celular a $0,07 \times 10^6$ células/mL para cada dosis para ensayo, es decir $1,96 \times 10^6$ células/dosis,
2. tripsinización,
3. las células se lavan con PBS sin Ca-Mg,
4. depósito de Tripsina ATV (2 mL/F175, o 0,4 mL/pocillo P6) para disociar y despegar las células,
- 10 5. incubación 5 minutos a 37 °C,
6. colocación de nuevo en medio de cultivo,
7. numeración con azul de tripano,
8. preparación de 6 tubos Falcon de 15 mL con 2,23 mL,
9. centrifugación, y
- 15 10. toma del depósito de células de cada tubo en 28 mL de cada solución de extracto para ensayo y transferencia a un tubo Falcon de 50 mL.

La puesta en cultivo se efectúa depositando 3 ml/pocillo de cada suspensión en las placas y después incubando a 37 °C durante 24, 48 y 72 h.

- 20 La tabla 3 resume el contenido de los diferentes pocillos.

Tabla 3

Dosis	Volumen	Ctd extraída	Nº células	Ctd extraída/célula		
g/100 ml	ml/pocillo	mg/pocillo	por pocillo	mg	µg	ng
0	3	0	2,1 E+05	0	0,0000	0,0
0,01	3	0,3	2,1 E+05	1,4 E-06	0,0014	1,4
0,05	3	1,5	2,1 E+05	7,1 E-06	0,0071	7,1
0,1	3	3	2,1 E+05	1,4 E-05	0,0143	14,3
0,5	3	15	2,1 E+05	7,1 E-05	0,0714	71,4
1	3	30	2,1 E+05	1,4 E-04	0,1429	142,9

[0116] A continuación, se observan los cultivos y, en su caso, se toman fotografías.

- 25 Las células se recogen y enumeran según el protocolo que se muestra a continuación:

1. tomar una placa 6 de pocillos,
2. retirar el sobrenadante,
- 30 3. lavar con 1 mL de PBS sin Ca-Mg,
4. depositar 0,4 mL/pocillo de tripsina ATV,
5. incubar 5 min a 37 °C hasta el desprendimiento de las células,
6. añadir 0,6 ml de medio de cultivo,
7. mezclar bien, y
- 35 8. usar azul de tripano al 0,4 %, (50 µL de células + 50 µL de azul de tripano al 0,4 %), y después contar las células en hematómetro de Malassez en un total de 100 rectángulos.

[0117] Los resultados de las figuras 4 a 6 demuestran que la dosis máxima no tóxica es del 0,1 % para EA1 y EA2 y del 0,5 % para EA3.

- 40 [0118] La estimulación de las células IPEC-1 diferenciadas por los extractos de algas según la invención EA1, EA2 y EA3 se somete a ensayo durante 4 h a 37 °C (aproximadamente 10 días después de la confluencia) a D15.

- [0119] Se someten a ensayo tres dosis (DM (dosis máxima), DM/10, DM/100) en comparación con LPS bacteriano (control positivo) y del medio de diferenciación (control negativo).
- 45 Las soluciones de extracto de algas según la invención EA1, EA2 y EA3 obtenidas por el procedimiento indicado en

ES 2 790 678 T3

el ejemplo 1 se preparan al 0,1 % en DMEM/F12 completo. Para ello, se toman 0,02 g en 20 mL y se efectúa una esterilización por filtración de 0,2 μ m. Seguidamente se llevan a cabo diluciones sucesivas como se indica en la tabla 4 mostrada a continuación.

Tabla 4

Preparación de soluciones de extracto de algas			
	DM	DM/10	DM/100
	0,1 %	0,01 %	0,001 %
dilución deseada		10	10
dilución obtenida		10	10
volumen de dilución anterior		2	2
volumen del medio		18	18
volumen total	20	20	20
resto	18	18	20

[0120] La cantidad de extractos de algas por célula se indica en la tabla 5 mostrada a continuación.

5

Tabla 5

Dosis	Volumen	Ctd extraída	Nº células	Ctd extraída/célula		
g/100 ml	ml/pocillo	mg/pocillo	por pocillo	mg	mg	ng
0,001	2	0,02	4,0 E+05	5E-08	0,00005	0,05
0,01	2	0,2	4,0 E+05	5,0 E-07	0,0005	0,5
0,1	2	2	4,0 E+05	5,0 E-06	0,0050	5,0

[0121] A continuación, se prepara la solución de LPS (SIGMA O111:B4) (dosis: 50 ng/10⁵ células). Se depositan 200 ng de LPS/pocillo en un volumen de 2 mL. La tabla 6 mostrada a continuación indica las diferentes concentraciones preparadas.

10

Tabla 6

Preparación de soluciones LPS			
	1 mg/ml	1.000 ng/ml	100 ng/ml
dilución deseada		1.000	10
dilución obtenida		1.000	200
vol de dilución anterior		0,001	0,1
volumen del medio	1	0,999	19,9
volumen total	1	1,000	20,0
Resto (ml)	1	1	20

[0122] En las placas, se depositan 2 mL de medio para ensayo en cada filtro y 3 mL por debajo. A continuación, se incuba la totalidad durante 4 h a 37 °C en el 5 % de CO₂.

Las células IPEC-1 tratadas se recogen a continuación para su análisis según el protocolo siguiente:

1. se lavan los pocillos dos o tres veces con 1 mL de agua fisiológica tamponada,
2. se toman las células en 350 µl de Tampón RA1 (kit Macherey-Nagel), y
3. se efectúa una transferencia en tubos Eppendorf, numerados de 1 a 15.

A continuación, se extraen los ARN siguiendo las instrucciones del fabricante del kit Macherey-Nagel NucleoSpin RNA II, Ref 740955.250, Lote 1211/004.

Los ARN obtenidos se transcriben seguidamente en ADN por transcripción inversa según el protocolo siguiente:

25

1. para cada muestra, calcular el volumen que se debe tomar para tratar 1 µg,
2. depositar este volumen en cada pocillo de un módulo colocado en bloque refrigerado,

3. añadir el volumen de agua necesario QSP 9 µLl,
4. añadir 1,3 µL de oligo dT anclado 100 µM Sample 3154325 Eurogentec,
5. incubar 10 minutos a 65 °C en GeneAmp PCR System 9700 (USER Khalid),
6. durante la incubación preparar la mezcla en un tubo cónico de 1,5 mL (para una muestra) en hielo:

- i. 4 µL de tampón 5X
- ii. 2 µL de dNTP 20 mM (Eurogentec)
- iii. 1,9 µL de agua milliQ
- iv. en el último momento añadir 0,8 µL de enzimas MuMLV 25 U/µl (ME-0125-400) (Eurogentec)

7. en cada muestra añadir 8,7 µL de mezcla para un volumen final de 20 µL,
8. colocar el módulo en bloque refrigerado,
9. incubar 90 minutos a 37 °C para la polimerización y 5 minutos a 93 °C para inactivar la enzima al final de la reacción en GeneAmp PCR System 9700, y
10. congelar a -20 °C en una caja ADN(1)MO.

A continuación, se analizan las muestras en qPCR (pruebas one way ANOVA, diferencias probadas no paramétricas Dunnet).

Se prueba el efecto del extracto EA1 en la expresión de IL8, de TNF-α, de CCL20, de IL6, de IL1 α, de IL1 β, de PPARγ y de IL 12p35. Se prueba el efecto de los extractos EA2 y EA3 en la expresión de IL8, de TNF-α y de CCL20. Los resultados se indican en las figuras 7 a 14.

Muestran un crecimiento de la expresión del ARNm de las diferentes citocinas sometidas a ensayo.

[0123] Se evalúa igualmente la actividad inmunoestimuladora de un extracto de algas según la invención estudiando la estimulación de los factores de inmunidad mediante ELISA en células IPEC-1 diferenciadas.

Los dos kits comerciales usados son el Kit Duo set porcine CXCL8/IL8 (ref: DY535) y el Kit Duo set porcine TNF-α (ref: DY690B) suministrados por la empresa R&D Systems. Los dos kits siguen el mismo protocolo usando un anticuerpo de captura, un anticuerpo y un sistema de detección y proteínas estándar específicas para cada interleucina.

Cultivo celular e incubación con los extractos EA1 y EA3 para la producción de citocinas

[0124] Las células IPEC-1 ($0,25 \times 10^5$ células/cm²) son cultivadas en insertos de cultivo durante 3 días hasta obtener una confluencia celular. A continuación, se sustituye el suero de ternera fetal por dexametasona a 10^{-7} M para diferenciar las células durante un periodo de 10-14 días. Se incuban tres pocillos de cultivo durante 24 h a 37 °C en presencia de los extractos EA1 y EA3. Los testigos están constituidos por cultivos celulares sin extractos de algas. Se recogen los sobrenadantes de cultivo por encima y por debajo de los insertos y se almacenan a -80 °C en tubo Eppendorf hasta su dosificación.

Dosificación de IL8 y de TNF-α por ELISA

[0125] Los anticuerpos de captura (anti IL-8 o anti TNF-α de ratón), diluidos 1/180 en PBS, se inmovilizan a razón de 100 µL/pocillo durante la noche a temperatura ambiente. Se efectúan tres lavados para eliminar los anticuerpos no fijados con 400 µL/pocillo de PBS que contienen el 0,05 % de Tween (tampón de lavado). A continuación, se realiza una etapa de saturación para bloquear los sitios de fijación no específicos y evitar así que las proteínas para ensayo se fijen al plástico. Para ello, se añaden 300 µL/pocillo de tampón PBS que contiene el 1 % de suero de albúmina bovina (BSA). Las placas se incuban durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavan tres veces con 400 µL/pocillo de tampón de lavado. Las proteínas estándar (IL8 y TNF-α recombinantes) se diluyen a la mitad en un tampón PBS que contiene el 1 % de BSA para tener concentraciones del orden de 4.000, 2.000, 1.000, 500, 250, 125 pg/ml. Se deposita un volumen de 100 µL de muestra de sobrenadante puro y de proteínas estándar por pocillo y después se incuba durante 2 h a temperatura ambiente. Después de una etapa de tres lavados con 400 µL/pocillo de tampón, se incuban las placas en presencia de 100 µL/pocillo de anticuerpos de detección acoplado con la biotina diluida a 1/180 con tampón de dilución que contiene suero de cabra descomplementado al 2 %. Después de una incubación de 2 h a temperatura ambiente, las placas se lavan tres veces con tampón de lavado y después se incuban con 100 µL de conjugado *Streptavidina*-HRP durante 20 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Después de tres lavados con tampón de lavado, se incuban los pocillos con 100 µL de sustrato (v/v reactivo A y B) durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción HRP-sustrato se detiene con 50 µL/pocillo de una solución de parada y se efectúa la lectura de la DO (densidad óptica) a 450 nm con un lector ELISA Labsystems Multiskan RC.

Los resultados se indican en las figuras 15 y 16.

Muestran un crecimiento de la expresión proteica de las diferentes citocinas probadas.

CONCLUSIÓN

[0126] La administración de un extracto de algas según la presente invención evidencia de este modo un efecto

inmunoestimulador del producto.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de algas del orden de las ulvales, en particular extracto de algas verdes de tipo *Ulva*, que comprende polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es inferior o igual a 50 kDa, excluyendo
5 polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño discriminado por ultrafiltración es superior a 50 kDa, para su uso para modular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal.
2. Extracto de algas para su uso según la reivindicación 1, en la que dichos polisacáridos comprenden manosa y/o arabinosa, en particular manosa.
10
3. Extracto de algas para su uso según la reivindicación 2, en el que dichos polisacáridos comprenden al menos el 0,005 % de manosa y/o al menos el 0,005 % de arabinosa, en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas.
- 15 4. Extracto de algas para su uso según la reivindicación 3, en el que dichos polisacáridos comprenden manosa en una cantidad comprendida entre el 0,01 y el 0,50 % y/o arabinosa en una cantidad comprendida entre el 0,01 y el 0,5 %, en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas.
5. Extracto de algas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos
20 polisacáridos comprenden, además:
 - galactosa;
 - glucosa;
 - ramnosa;
 - 25 - xilosa; y
 - ácido glucurónico.
6. Extracto de algas para su uso según la reivindicación 5, en el que dichos polisacáridos comprenden:
 - 30 - del 0,05 al 0,5 % de galactosa en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas;
 - del 0,005 al 0,5 % de glucosa en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas;
 - del 2 al 15 % de ramnosa en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas;
 - del 0,1 al 1 % de xilosa en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas; y
 - 35 - del 1 al 7 % de ácido glucurónico en peso con respecto al peso de la materia seca total del extracto de algas.
7. Extracto de algas del orden de las ulvales, en particular extracto de algas verdes del tipo *Ulva*, susceptible de obtenerse por un procedimiento en el que:
 - 40 a) las algas se lavan y se les quita la arena;
 - b) dichas algas se trituran;
 - c) la fase sólida del triturado se separa de su fase líquida;
 - d) dicha fase líquida se clarifica;
 - e) el jugo obtenido en la etapa d) se ultrafiltra con una membrana de 50 kDa o menos; y
 - 45 f) el jugo de filtración obtenido en la etapa e) se concentra y después se seca;
 para su uso para modular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal.
8. Extracto de algas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para estimular la respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal, en particular en el sistema inmunitario intestinal.
50
9. Extracto de algas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el extracto de algas induce la expresión de moléculas de adhesión y de quimiocinas, especialmente las IL8 y/o IL-1 α y/o IL-1 β y/o IL6 y/o TNF- α y/o CCL20.
- 55 10. Extracto de algas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, a modo de complemento de la vacunación.
11. Extracto de algas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el tratamiento y/o la prevención de patologías infecciosas, especialmente las patologías infecciosas porcinas elegidas entre: parvovirus, erisipela porcina, rinitis infecciosa, gripe (influenza), circovirus porcino, micoplasmosis y colibacilosis; las patologías infecciosas aviares elegidas entre: enfermedad de Marek, enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa, enfermedad de Gumboro, viruela aviar, micoplasmosis, anemia infecciosa aviar, laringotraqueítis infecciosa, EDS y gripe aviar; las patologías infecciosas bovinas elegidas entre: BVD (diarreas víricas bovina), bronconeumonía enzoótica, IBR, virosis herpética, clostridiosis, colibacilosis, fiebre catarral, coronavirus, rotavirus y rinotraqueítis; y
65 las patologías infecciosas acuícolas elegidas entre: necrosis hematopoyética, vibriosis, forunculosis, necrosis

pancreática infecciosa y anemia infecciosa.

12. Extracto de algas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el extracto de algas está comprendido en una composición farmacéutica.

5 13. Extracto de algas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el extracto de algas está comprendido en una composición alimentaria.

14. Extracto de algas para su uso según la reivindicación 12, en el que el extracto de algas se administra a una dosis en el ser humano comprendida entre 0,1 y 100 mg/kg o a una dosis en el animal comprendida entre 1 y 10 200 mg/kg.

15. Extracto de algas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que los polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados tienen un tamaño discriminado por ultrafiltración inferior o igual a 15 kDa.

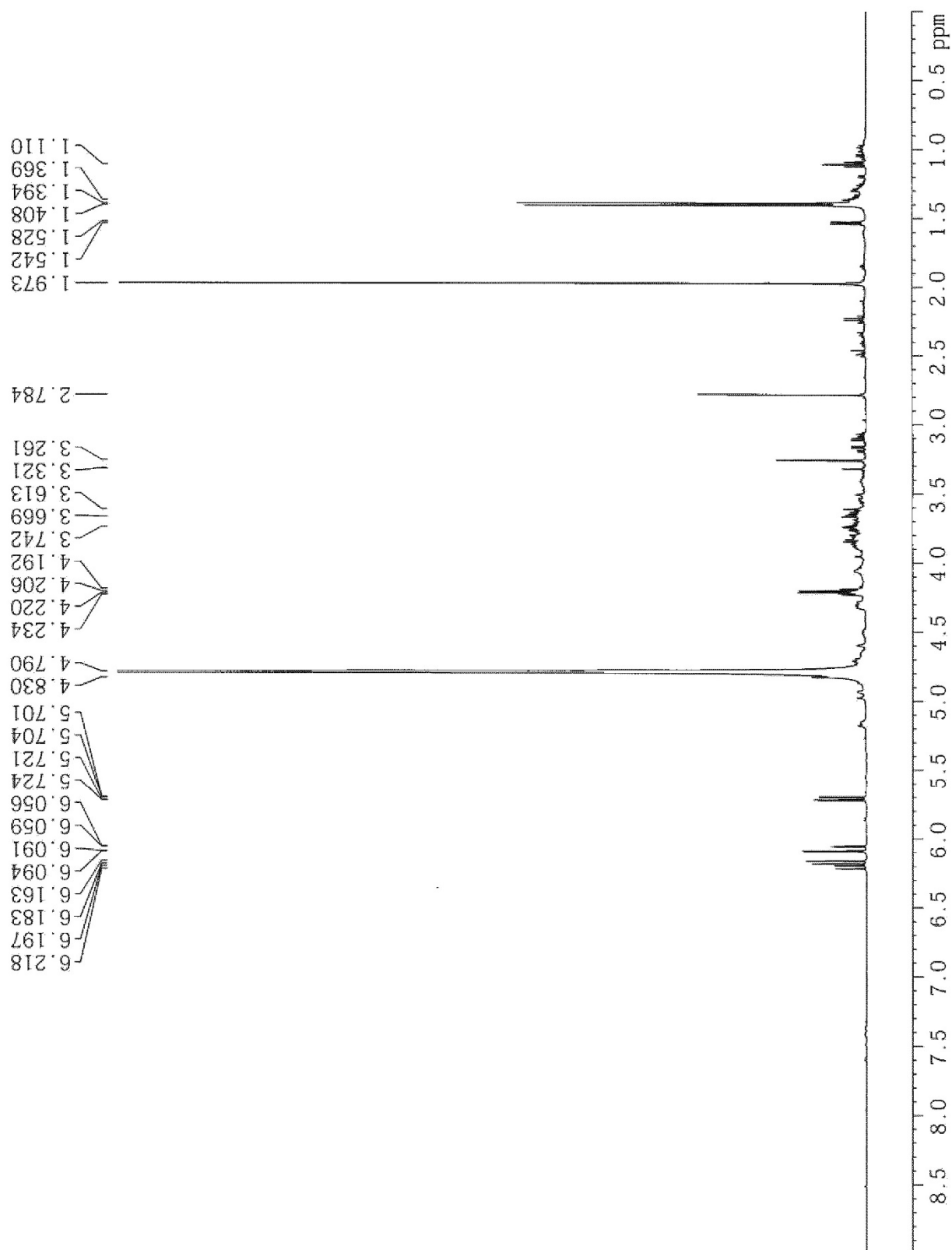
15 16. Extracto de algas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho extracto de algas es tal que puede obtenerse por un procedimiento de preparación en el que:

- a) las algas se lavan y se les quita la arena;
- b) dichas algas se trituran;
- 20 c) la fase sólida del triturado se separa de su fase líquida;
- d) dicha fase líquida se clarifica;
- e) el jugo obtenido en la etapa d) se ultrafiltra con una membrana de 50 kDa o menos; y
- f) el jugo de filtración obtenido en la etapa e) se concentra y después se seca.

25 17. Extracto de algas para su uso según una de las reivindicaciones 7 o 16, en el que el jugo obtenido en la etapa d) del procedimiento de preparación se ultrafiltra en una membrana de 15 kDa o menos.

18. Extracto de algas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7, 16 o 17, en el que el extracto de algas obtenido en la etapa f) del procedimiento de preparación se purifica, especialmente por ultrafiltración.

FIG.1



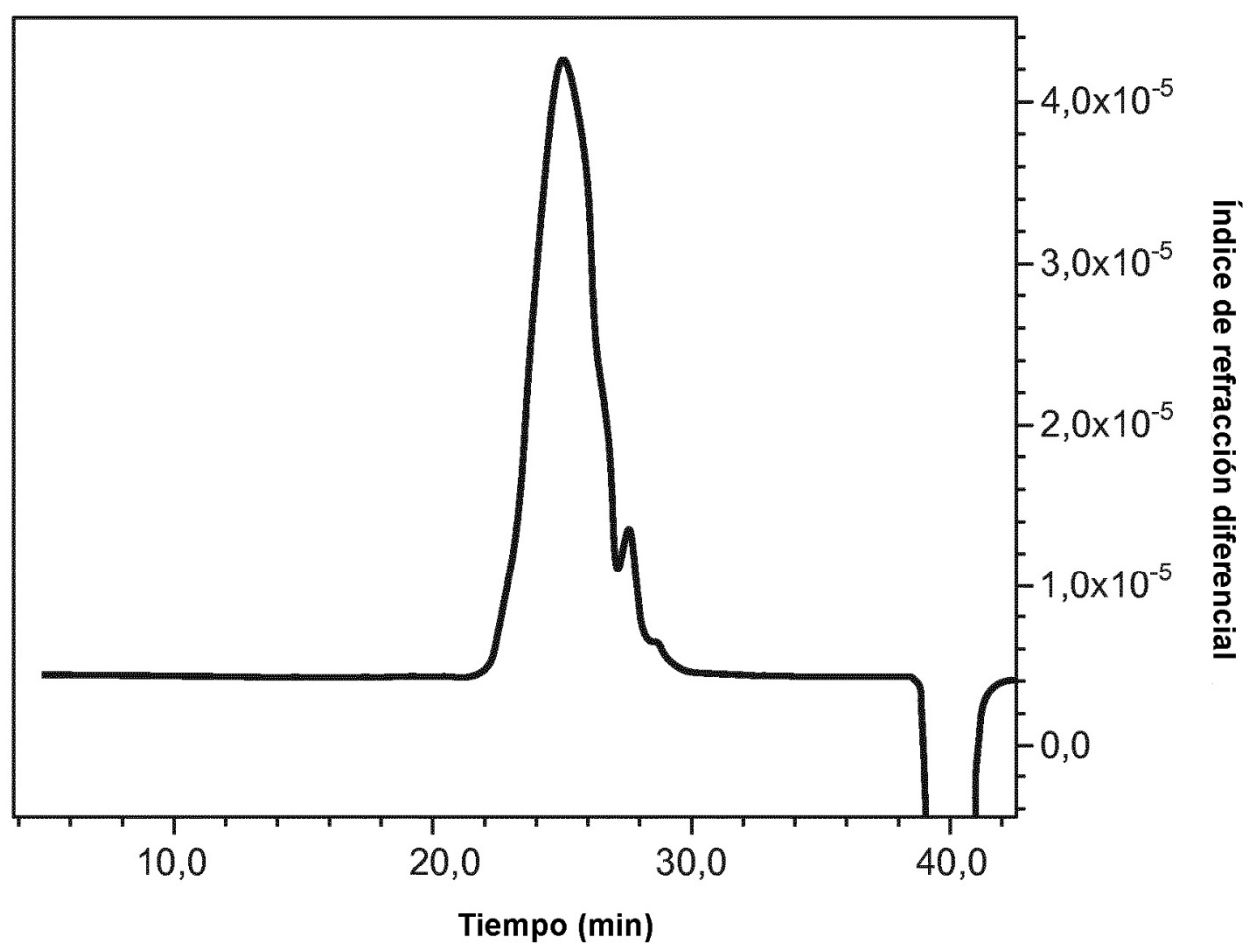
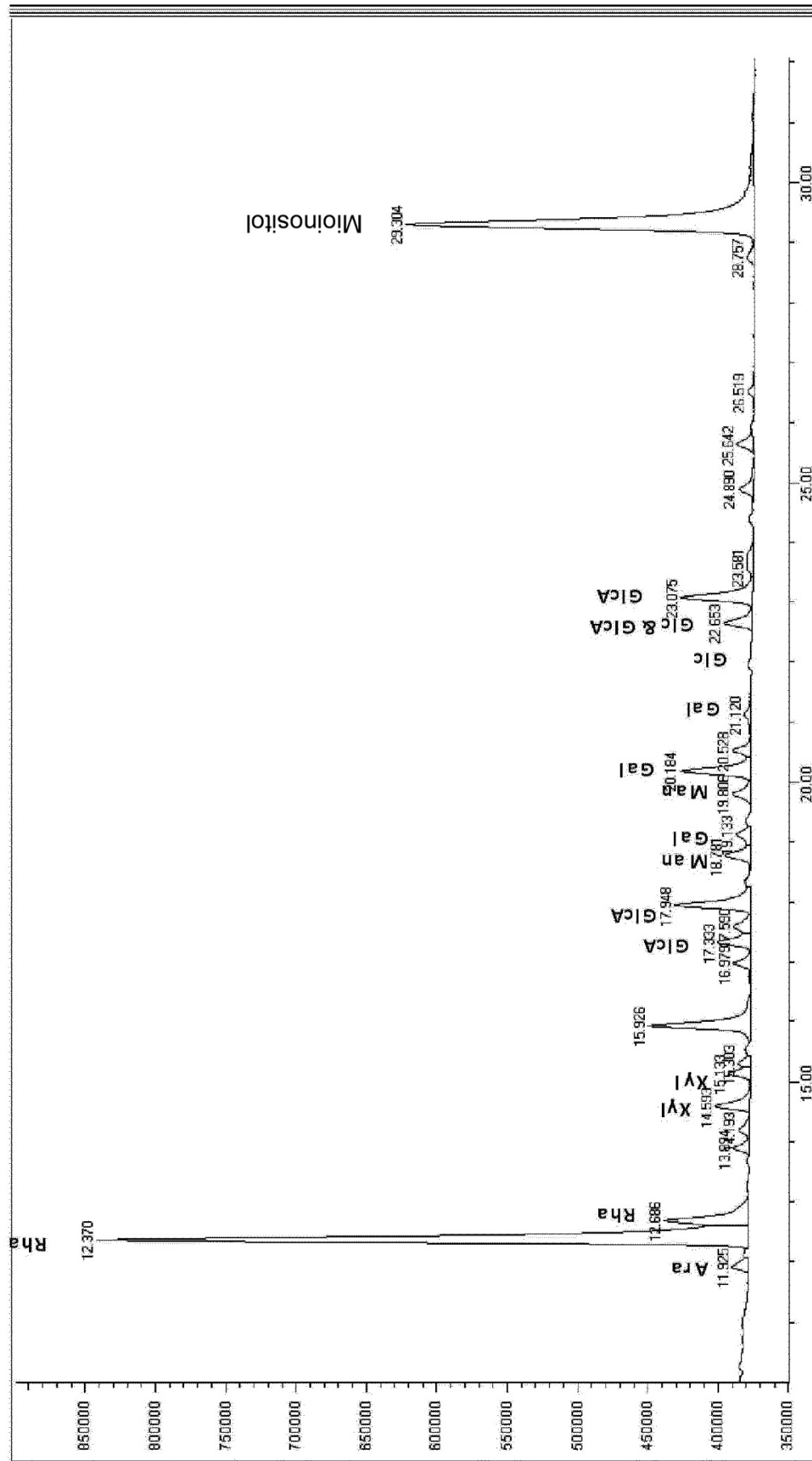


FIG.2



Ara: arabinosa; Gal: galactosa; Glc: glucosa; Xyl: xilosa; Man: manosa; Rha: ramnosa; GlcA: ácido glucurónico

FIG.3

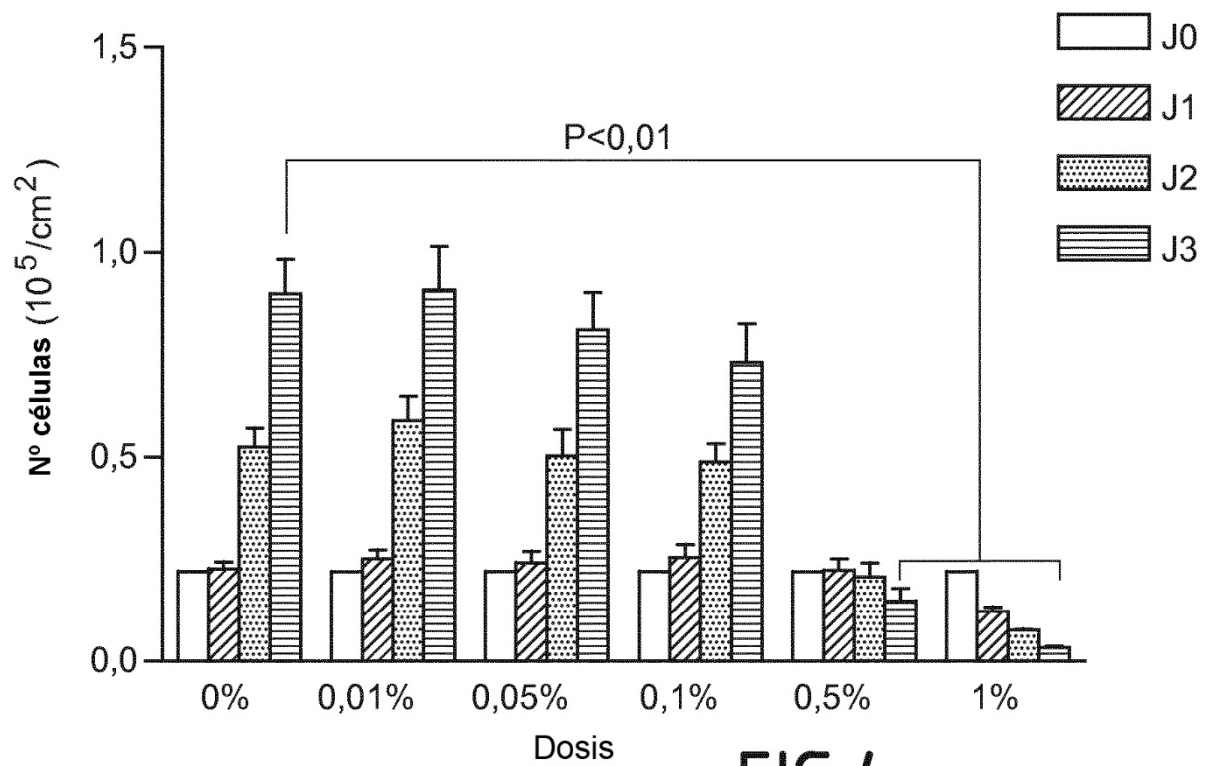


FIG.4

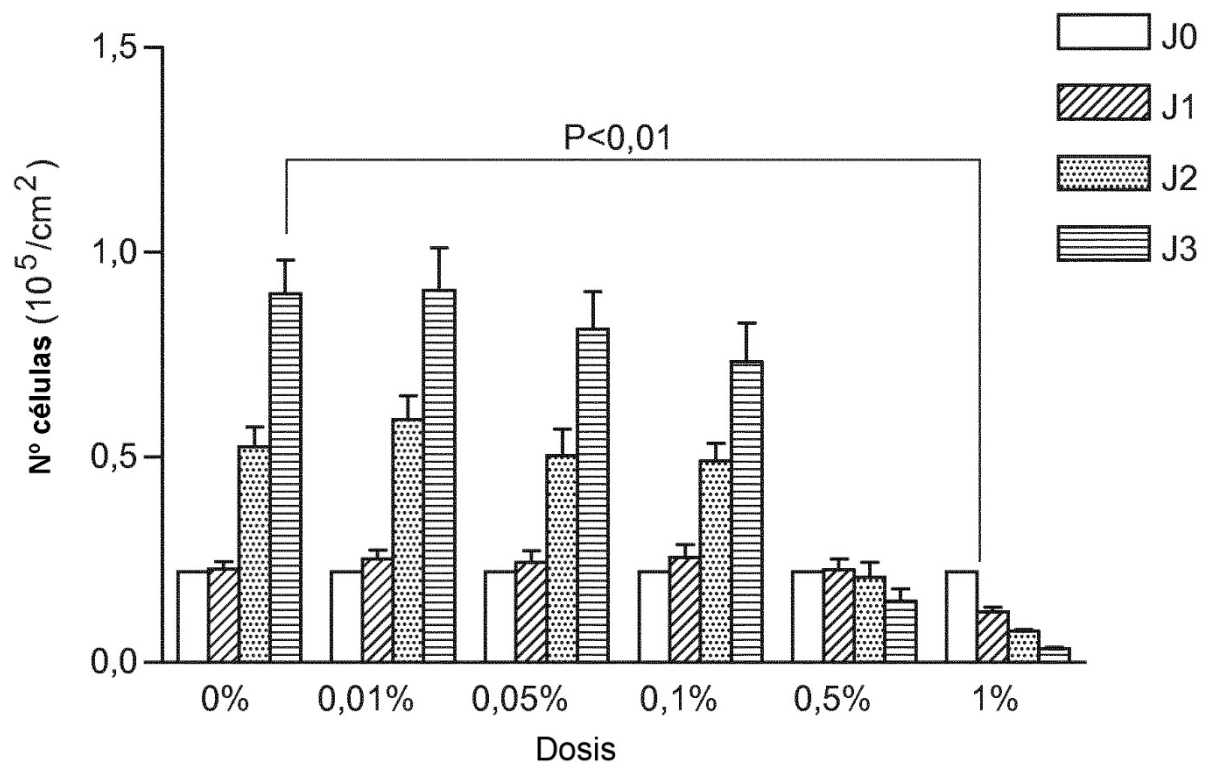


FIG.5

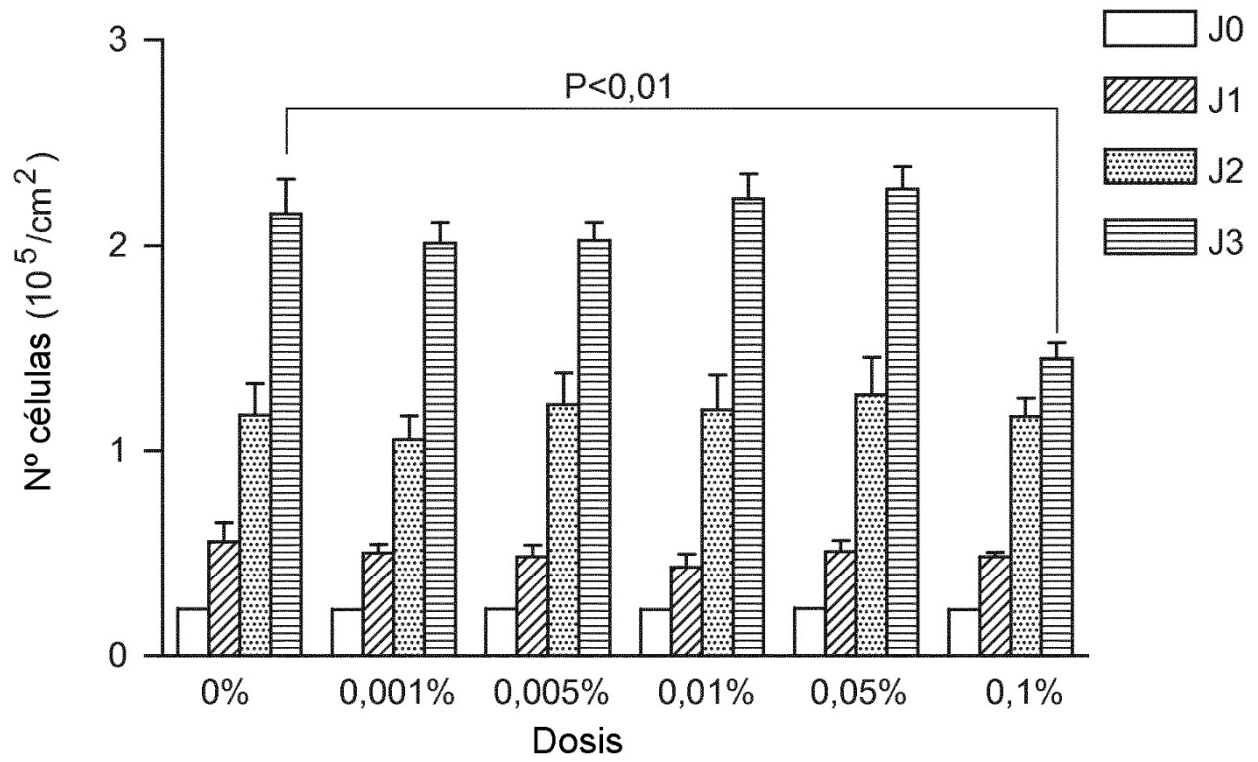


FIG.6

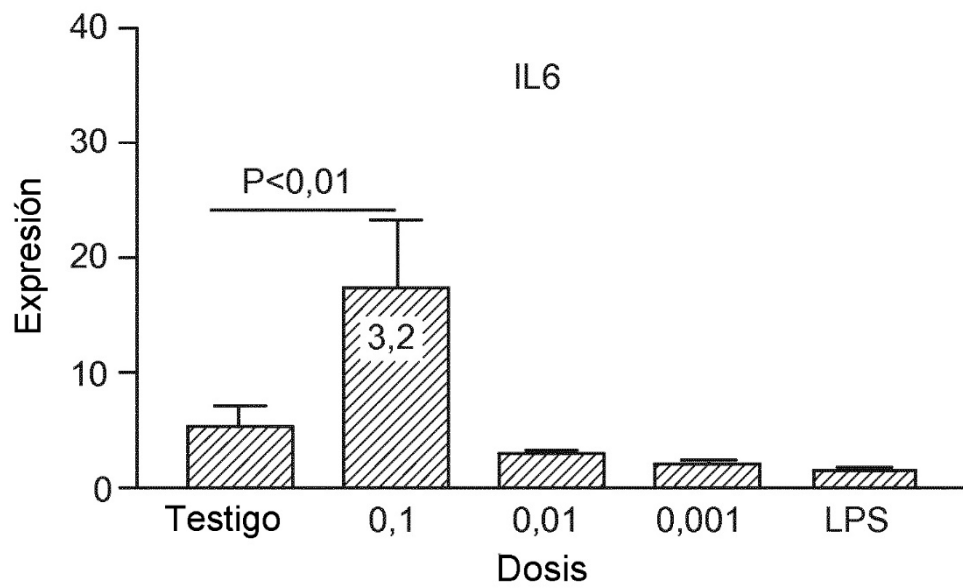
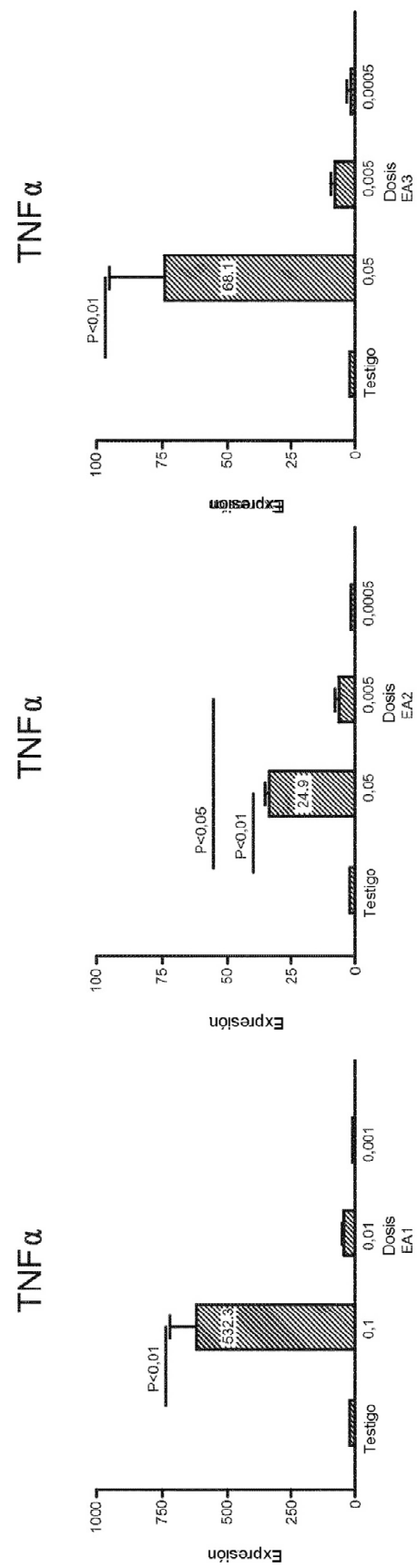
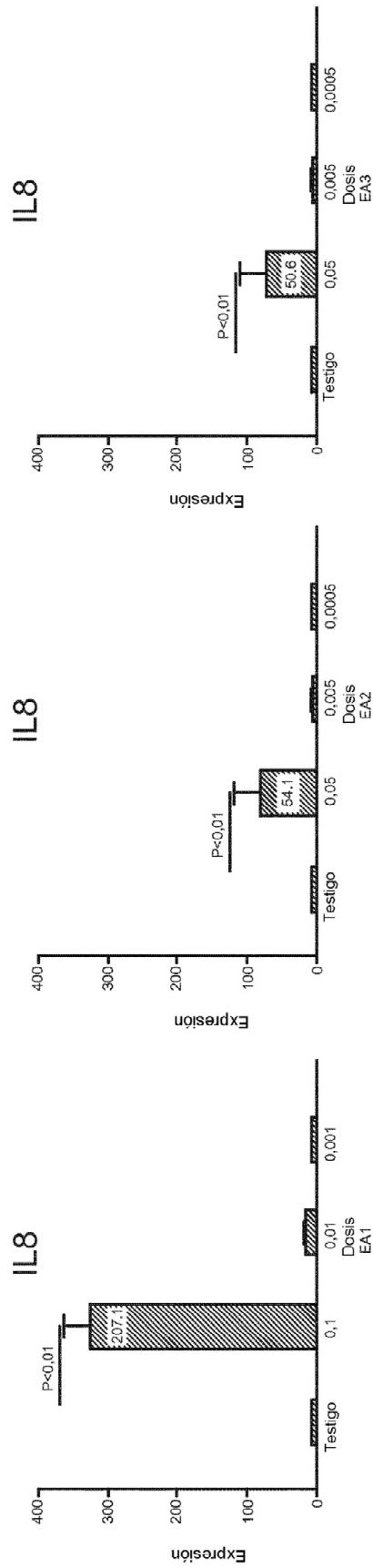


FIG.10



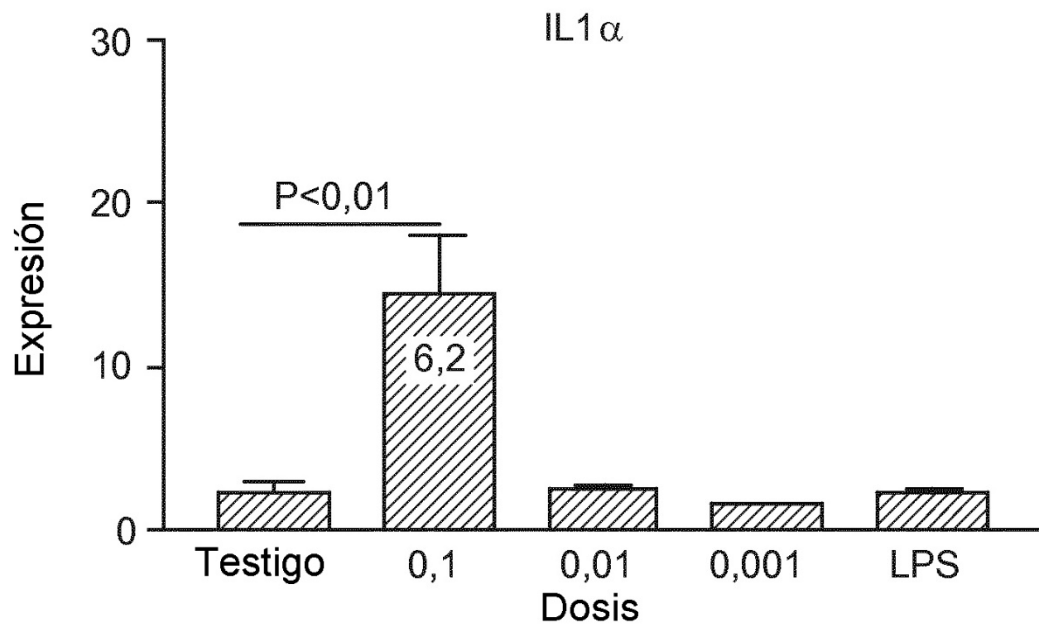


FIG.11

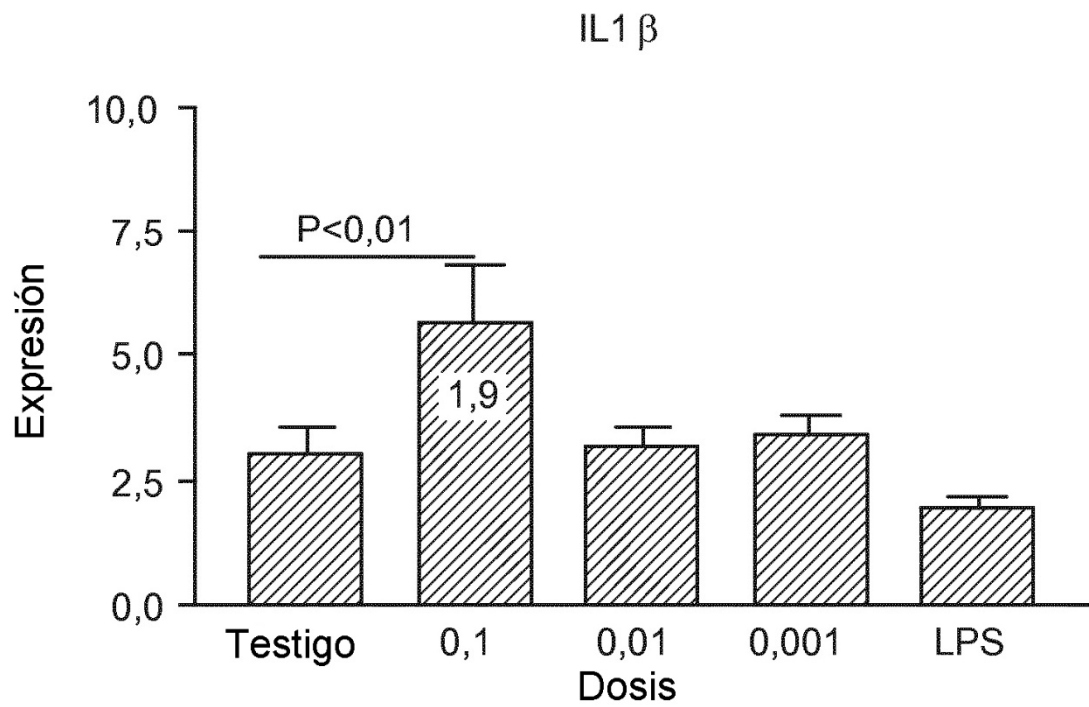


FIG.12

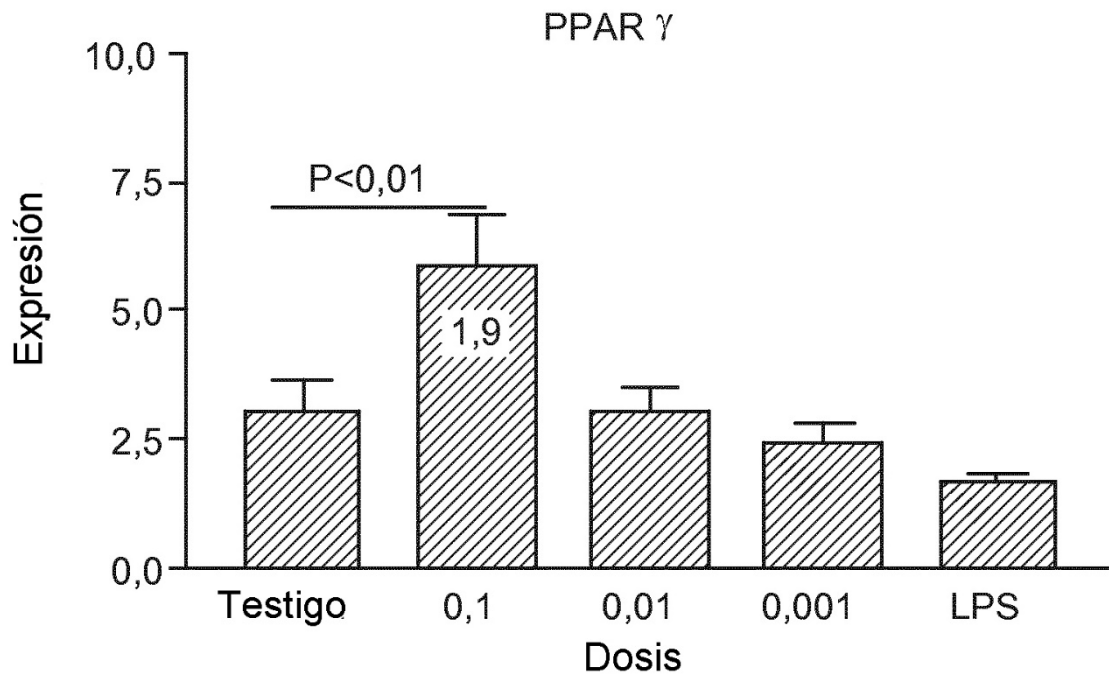


FIG.13

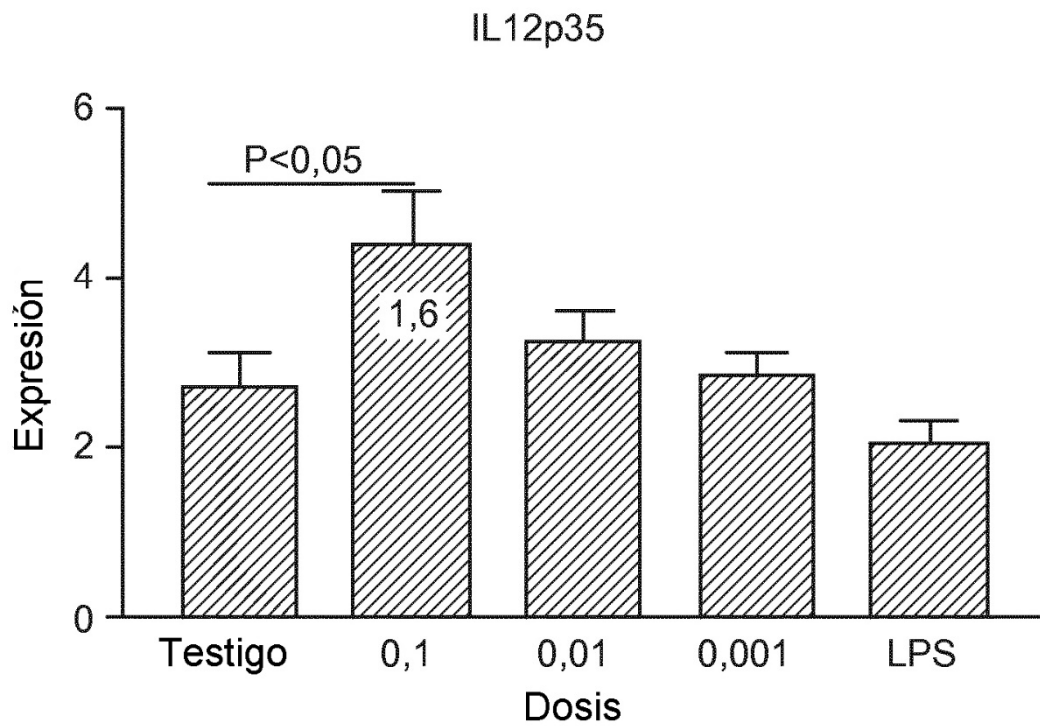


FIG.14

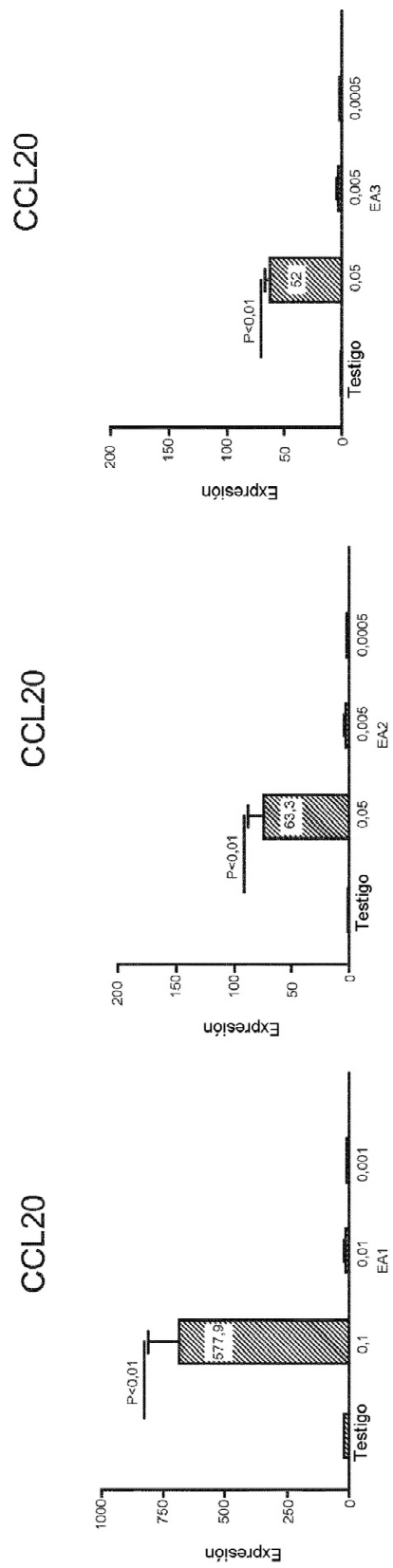


FIG.9

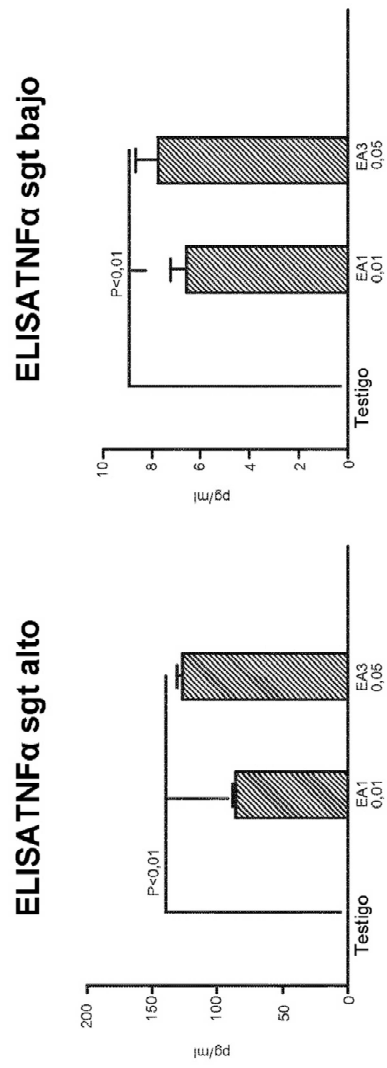


FIG.15

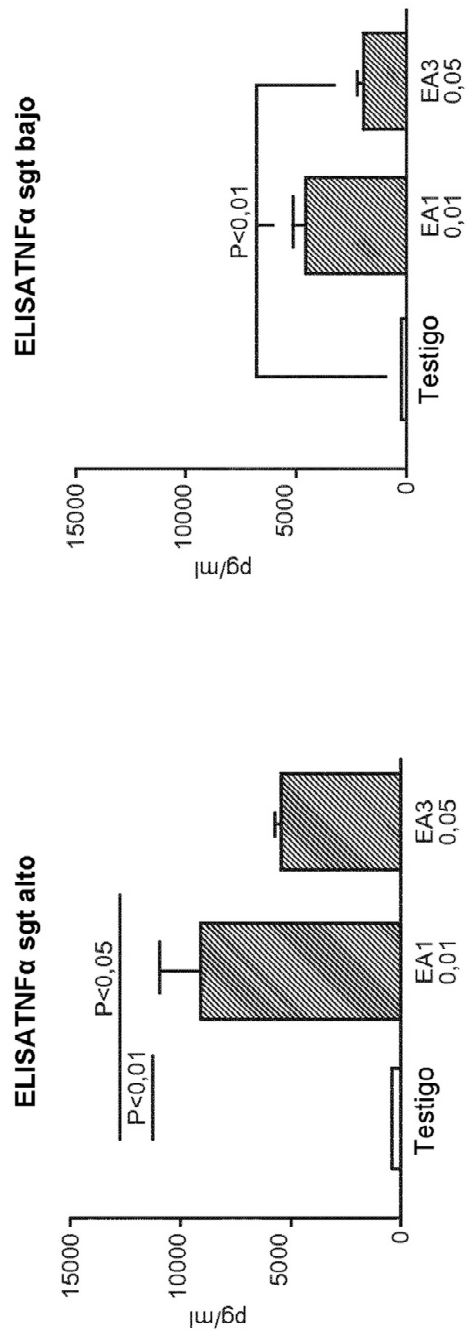


FIG.16