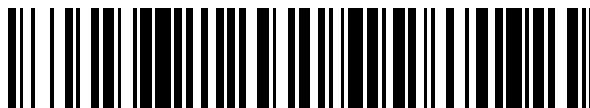


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 055 280**

21 Número de solicitud: 202430643

51 Int. Cl.:

A61K 36/05 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.07.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.02.2026

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ALICANTE (100,00%)
CARRETERA SAN VICENTE DEL RASPEIG, S/N
03690 SAN VICENTE DEL RASPEIG (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**VALVERDE URREA, Miguel Rodrigo;
LÓPEZ MOYA, Federico;
TERRADAS FERNÁNDEZ, Marc y
LÓPEZ LLORCA, Luis Vicente**

54 Título: **Extracto de *Ulva australis* con actividad antioxidante y actividad proliferativa celular**

57 Resumen:

Extracto de *Ulva australis* con actividad antioxidante y actividad proliferativa celular para su uso como medicamento para la prevención y/ o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la retina, especialmente aquellas que cursan con estrés oxidativo o con la pérdida de fotorreceptores, como la degeneración macular asociada a la edad, glaucoma, distrofias hereditarias de retina, retinopatía diabética y la retinosis pigmentaria.

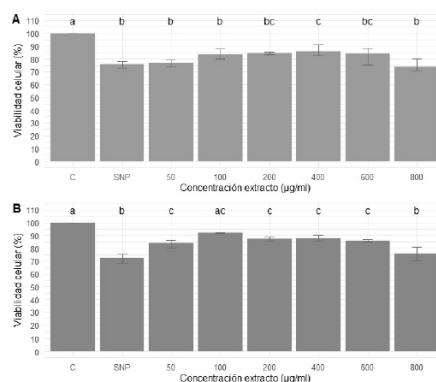


FIG. 1

DESCRIPCIÓN

Extracto de *Ulva australis* con actividad antioxidante y actividad proliferativa celular

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se enmarca en el campo de la biomedicina, en concreto proporciona
5 una fuente natural de compuestos antioxidantes que además presentan capacidad de potenciar la proliferación celular de los fotorreceptores de la retina, por lo que se propone su uso para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, especialmente de aquellas que afectan a la retina.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 Una característica común a todas las enfermedades neurodegenerativas es la presencia de un alto grado de estrés oxidativo, tal y como se ha descrito previamente en diversas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad del Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, entre otras.

El estrés oxidativo tiene también un papel fundamental en las enfermedades
15 neurodegenerativas de la retina, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), el glaucoma o las distrofias hereditarias de retina.

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad neurodegenerativa crónica compleja y progresiva caracterizada por depósitos de drusenoides en la retina, depósitos de lipofusina, pérdida de células del epitelio pigmentario de la retina y
20 neovascularización coroidea.

El glaucoma es una neuropatía óptica caracterizada por la degeneración progresiva de las células ganglionares de la retina (CGR). Muchos enfoques terapéuticos modernos se han centrado en la reducción del aumento de la presión intraocular. Se ha demostrado que la presión intraocular elevada en la patogénesis del glaucoma aumenta las especies reactivas
25 de oxígeno endógenas dentro de la malla trabecular. Se ha postulado que este aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno crea un desequilibrio entre la capacidad prooxidante y antioxidante y que es como factor crucial en la lesión celular temprana.

Las distrofias hereditarias de retina se caracterizan por la degeneración progresiva de la retina, el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la coriocapilar, la fuente vascular de

nutrientes y oxígeno. La degeneración de la retina implica inflamación, estrés oxidativo y muerte celular.

Otras enfermedades neurodegenerativas de la retina que, como las ya citadas, también cursan con la pérdida de células de la retina son la retinopatía diabética (RD) o la retinosis pigmentaria (RP).

La retinopatía diabética (RD) es una complicación crónica progresiva de la diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2 caracterizada por la neurodegeneración retiniana en el contexto de la diabetes crónica. Se trata de una complicación microvascular de la diabetes resultante del daño capilar, muestra una pérdida de pericitos y células endoteliales por apoptosis acelerada. La reducción del número de pericitos deriva en diversos síntomas que incluyen: la presencia de células fantasma, el aumento del número de capilares acelularmente ocluidos, el desarrollo de microaneurismas y el engrosamiento de la membrana basal capilar.

La retinosis pigmentaria (RP) es un grupo de trastornos oculares genéticos caracterizados por la degeneración progresiva de las células fotorreceptoras de la retina, lo que provoca la pérdida de visión. Los síntomas incluyen problemas para ver por la noche y disminución de la visión periférica (lateral y del campo visual superior o inferior). A medida que empeora la visión periférica, las personas pueden experimentar "visión de túnel"

La retina es uno de los tejidos más activos metabólicamente, y está expuesta a altos niveles de luz y oxigenación, un ambiente que propicia un alto grado de estrés oxidativo. Los fotorreceptores son neuronas especializadas sensibles a la luz, localizadas en la retina externa de los vertebrados y que se catalogan en dos subtipos: conos y bastones. Los fotorreceptores son unos de los mayores consumidores de oxígeno del sistema nervioso central, debido principalmente a la gran acumulación de mitocondrias en el elipsoide. Debido a la relación entre el estrés oxidativo y la progresión en las enfermedades neurodegenerativas de la retina, el uso de antioxidantes se postula como un posible tratamiento para evitar la progresión de estas enfermedades [1]. La administración de gran variedad de sustancias antioxidantes, como N-acetilcisteína, N-acetilcisteína, Amida, Tioredoxina, Azafrán, Minociclina, Melatonina, Curcumina, Quercetina, Luteína (L) Zeaxantina (Z), Catequinas, Resveratrol, Antioxidantes dietéticos, Fructus lycii, ácido alfa-lipoico, (Z)-7,40-Dimetoxi-6-hidroxi-aurona-4-O-_-glucopiranosido (DHAG), quelantes de hierro multiobjetivo, creatina, sulforafano, inhibidores de la NOS; Ligando Sigma1R (+)-Pentazocina (PTZ); Norbixina (bixina extraída de Bixa Orellana), (3R)-5,6,7-trihidroxi-3-isopropil-3-metilisocroman-1-ona, Ácido glicirrónico/Glicirricina; Tudca, Rasagilina, Norgestrel/ Progesterona, Proinsulina,

Antocianina Cianidina-3-glucósido (C3G) Extracto de arándano, Ácido 4-fenilbutírico, Celastrol, Salvia miltiorrhiza Bunge, Vitamina A y/o E. ha sido probada en modelos preclínicos y ensayos clínicos [2, 3, 4].

Aunque existen compuestos como el ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) o compuestos naturales del azafrán con propiedades antioxidantes y que aumentan la proliferación de las células de la retina, estos son costosos y no siempre son respetuosos con el medio ambiente. [5]

Las algas de diversas especies se han mostrado como un reservorio de compuestos antioxidantes. De hecho, compuestos obtenidos a partir de las algas verdes, rojas y pardas han mostrado ser una terapia efectiva para prevenir y tratar enfermedades neurodegenerativas. En el caso de las algas verdes, son numerosos los estudios que han mostrado su capacidad de protección contra enfermedades neurodegenerativas. Diferentes extractos *Caulerpa racemosa* [6], que contenían compuestos fenólicos y flavonoides, han probado aumentar la viabilidad celular en la línea SH-SY5Y (línea celular de neuroblastoma humano utilizada como modelo *in vitro* de función y diferenciación neuronal). Extractos de otras especies, como el de *Codium fragile* [7], ha mostrado capacidad de inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2, y la reducción de especies reactivas de nitrógenos y factores relacionados con el estrés molecular.

En cuanto al género *Ulva*, los extractos de metanol y de metanol/agua de *U. fasciata* han mostrado actividad antifúngica y antibacteriana [8], y el extracto etanol actividad antioxidante *in vitro* [9]. Por su parte, el extracto metanólico de *U. reticulata* ha mostrado capacidad para inhibir la acetilcolinesterasa, implicada en la progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas [10] y el extracto de *U. lactuca*, ha mostrado propiedades curativas del tejido óseo [11]. Los polisacáridos sulfatados de *U. pertusa* han mostrado una reducción de radicales superóxidos en estudios *in vitro* [12].

Sin embargo, el potencial antioxidante de estos extractos no ha sido probado en células de la retina, las cuales están sometidas a un estrés oxidativo mucho mayor.

Ulva australis Areschoug, 1854 o *U. australis* es especie del género *Ulva* muy abundante en el Mediterráneo, especialmente en ambientes con altos niveles de nutrientes. Aunque se ha probado capacidad antioxidante y quelante de los extractos de *U. australis* sobre diversos metales (hierro y cobre) [13], no existen estudios sobre la capacidad antioxidante de los extractos de *U. australis* en cultivos celulares o tejidos biológicos. En concreto, no se ha

realizado ningún tipo de estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de esta alga sobre células de la retina.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se propone el uso del extracto del alga *U. australis*, para proteger del daño oxidativo las 5 células de la retina y aumentar su proliferación celular, efecto no descrito en ninguno de los otros extractos algales con efectos antioxidantes mencionados.

La presente invención prueba la capacidad antioxidante del extracto del *U. australis* sobre células de la línea celular 661W, una línea celular inmortalizada de retina derivada de fotorreceptores murinos de tipo cono. También se demuestra la capacidad de dicho extracto 10 de promover su proliferación celular.

El extracto obtenido de *U. australis* es un extracto con capacidad antioxidante natural, respetuoso con el medio ambiente, de gran disponibilidad y fácil obtención.

Gracias a su capacidad antioxidante, probada sobre cultivos celulares *in vitro*, el uso del extracto de *U. australis* permite reducir los efectos de enfermedades neurodegenerativas que 15 cursan con estrés oxidativo, especialmente en enfermedades degenerativas de la retina. Este efecto se ve potenciado por su capacidad para promover proliferación celular en células de la retina, lo que propicia la regeneración celular de dicho órgano.

Por tanto, el extracto de *U. australis* descrito en la presente invención ayuda a prevenir, retrasar el avance y tratar diversas enfermedades neurodegenerativas que cursan con estrés 20 oxidativo, en concreto de las enfermedades degenerativas de la retina, actuando por un lado previniendo la muerte celular de conos y bastones, y por otro lado promoviendo su proliferación.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención describe un extracto de *Ulva australis* para su uso como medicamento.

25 El extracto obtenido de *U. australis* es de color verde intenso. Para su obtención se utilizan preferentemente solventes orgánicos, como el metanol o el acetato de etilo, en vez de los solventes acuosos comúnmente utilizados en el estado de la técnica anterior. Preferiblemente, el extracto se obtiene mediante un método de cocción-maceración. La cocción permite extraer compuestos con un rendimiento medio, mientras que la maceración 30 permite obtener compuestos termosensibles. Otras técnicas de extracción, como el Soxhlet, daña las moléculas termosensibles al necesitar temperaturas mayores a 60 grados.

Por tanto, el presente método permite obtener un rendimiento mayor, un mayor número de moléculas termosensibles, así como una mayor integridad molecular.

Independientemente del solvente usado para su preparación, metanol o el acetato de etilo, el extracto de la invención está compuesto por lípidos de diferentes tipos, fenoles y flavonoides.

5 La cantidad de fenoles varia de 35 a 50 µg equivalentes de ácido gálico/mg peso seco extracto, y la cantidad de flavonoides varia de 40 a 65 µg equivalentes de quercetina/mg peso seco extracto. Los lípidos, fenoles y flavonoides del extracto son preferentemente disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO).

Un **segundo aspecto** de la invención describe la composición que comprende el extracto de
10 *Ulva australis* para su uso como medicamento.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención es una composición farmacéutica. Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "composición farmacéutica" se refiere a cualquier sustancia utilizada para el diagnóstico, prevención, alivio, tratamiento o curación de una enfermedad en un ser humano o en
15 animales. La composición farmacéutica puede incluir una composición única o composiciones separadas. La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse sola o en combinación con otras composiciones farmacéuticas, preferiblemente, que comprenda otro compuesto útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, más preferiblemente de enfermedades neurodegenerativas de la retina, en cuyo caso, también puede incluir una
20 composición única o composiciones separadas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende además un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que ayuda a la absorción de la composición farmacéutica que comprende la composición de la invención,
25 estabiliza dicha composición farmacéutica o ayuda en la fabricación de esta en el sentido de darle consistencia, forma, sabor o cualquier otra característica funcional específica. Así, los excipientes podrían tener la función de mantener unidos los ingredientes, como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, una función edulcorante, una función colorante, una función protectora, como por ejemplo aislarla del aire y/o de la humedad, una función de relleno para
30 un comprimido, cápsula o cualquier otra forma de formulación, como por ejemplo fosfato cálcico dibásico, una función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otros tipos de excipientes no mencionados en este párrafo.

Un "soporte farmacéuticamente aceptable" (o "farmacológicamente aceptable") se refiere a cualquier sustancia, o combinación de sustancias, conocida en el sector farmacéutico, utilizada en la fabricación de formas farmacéuticas de administración e incluye, entre otros, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El portador puede ser una sustancia inerte o
5 tener una acción similar a cualquiera de los compuestos de la presente invención, teniendo la función de facilitar la incorporación del fármaco, así como de otros compuestos, permitiendo una mejor dosificación y administración o proporcionando consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma farmacéutica es líquida, el portador es el diluyente. El término "farmacológicamente aceptable" se refiere al hecho de que el compuesto
10 al que se refiere está permitido y evaluado para que no cause daño a los organismos a los que se administra.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse a través de cualquier vía de administración, y como tal, dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. Así, la composición farmacéutica de la invención
15 puede administrarse por vía oral, nasal, ocular, tópica, intradérmica, intracraneal, intravenosa o intraperitoneal. Preferiblemente, se administra por vía ocular.

La composición de la invención puede incluir una cantidad eficaz del extracto de *Ulva australis*. El término "cantidad eficaz" utilizado en el presente documento se refiere a una cantidad suficiente para tratar de forma efectiva de enfermedades neurodegenerativas, más
20 preferiblemente de enfermedades neurodegenerativas de la retina. La cantidad eficaz puede seleccionarse adecuadamente por un experto en la materia en función del individuo seleccionado y pueden intervenir factores como la edad, las condiciones de salud, la duración de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción y otros, incluido el uso de un fármaco en combinación con la composición farmacéutica o al mismo tiempo que ésta, y
25 otros factores conocidos en el campo de la medicina. La terapia se considera "personalizada" cuando el compuesto que se administra al individuo para tratar una enfermedad está especialmente adaptado a las características tanto genotípicas como fenotípicas del individuo que va a ser tratado, evitando así la pérdida de tiempo con terapias no efectivas.

Un **tercer aspecto** de la invención describe el extracto de *Ulva australis* y las composiciones
30 que lo comprenden para su uso como medicamento para la prevención y/ o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, preferentemente, de enfermedades neurodegenerativas de la retina, y más preferentemente, de enfermedades neurodegenerativas de la retina que cursan con estrés oxidativo y/o en las que se produce pérdida de fotorreceptores. Estas enfermedades degenerativas de la retina comprenden, pero no se limitan a, la degeneración

macular asociada a la edad, glaucoma, distrofias hereditarias de retina, retinopatía diabética y la retinosis pigmentaria.

Los términos "prevenir" y "prevención" se refieren a evitar total o parcialmente, o minimizar los efectos adversos o la gravedad de los mismos, de una enfermedad o afección, en este caso, enfermedades neurodegenerativas, y más preferentemente, enfermedades neurodegenerativas de la retina.

Los términos "tratar" y "tratamiento", tal como se utiliza aquí, se refieren a evitar, disminuir o eliminar por completo los efectos de una enfermedad o afección, en este caso, enfermedades neurodegenerativas, y más preferentemente, enfermedades neurodegenerativas de la retina.

10 Un **cuarto aspecto** de la invención describe el uso del extracto de *U. australis* como antioxidante y como potenciador de la proliferación celular en cultivos celulares *in vitro*, especialmente en cultivos de células nerviosas o neuronas, y más concretamente, de fotorreceptores.

Un **último aspecto** de la invención, refiere a un kit que comprende el extracto de *U. australis* para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas, preferentemente, de enfermedades neurodegenerativas de la retina.

El término "paciente", "individuo" o "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores como ratas y ratones. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. En la práctica de la presente invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o podrán conocerse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Efecto antioxidante. Viabilidad de las células de la línea 661W sometidas a estrés oxidativo por la incubación con NSP 0,1 mM, mantenido durante 24 h, tras incubar con A) extracto de metanol y B) extracto de acetato de etilo a las distintas concentraciones indicadas y evaluada mediante el ensayo de XTT. Se muestra como control la viabilidad de las células en ausencia de NPS. C: control. NPS: nitroprusiato sódico 0,1 mM. Las concentraciones de cada extracto están expresadas en µg/ml. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas. Valor medio del ensayo de viabilidad celular (XTT) en % con respecto al control, células no lesionadas ± DS (n = 8 pocillos en cada condición). * p < 0,05, ANOVA y test post-hoc (TukeyHSD). Las letras a, b, y c marcan condiciones donde no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos. Todas ellas muestran diferencias significativas con el resto de condiciones no marcadas con esa letra en concreto.

Figura 2: Proliferación celular. Viabilidad celular de la línea 661W tras la incubación con A) extracto de metanol y B) extracto de acetato de etilo a las concentraciones indicadas. C: control. Las concentraciones del extracto están expresadas en µg/ml. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas. Valor medio del ensayo de viabilidad celular (XTT) en % con respecto al control, células no lesionadas ± DS (n = 8 pocillos en cada condición). * p < 0,05, ANOVA y test post-hoc (TukeyHSD). Las letras a, b, y c marcan condiciones donde no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos. Todas ellas muestran diferencias significativas con el resto de condiciones no marcadas con esa letra en concreto.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

Obtención del extracto de *U. australis*

Para la realización del extracto de *U. australis* la biomasa algal se limpia preferiblemente con agua de ósmosis varias veces hasta eliminar epífitos y sales. A continuación, se liofiliza durante 48 horas. Una vez liofilizada, se tritura con nitrógeno líquido, y se extrae en metanol o acetato de etilo en proporción 1:10 (peso seco/volumen). Se realiza una cocción a 40 °C durante 2 horas, en agitación. Posteriormente, se deja macerar durante 48 horas, a 4 °C en continua agitación. Transcurrida la maceración, la mezcla se filtra con un filtro Whatman nº1. El extracto obtenido se filtra por un diámetro de poro de 0,22 µm. El disolvente se evapora con un rotavapor o *speedvac*, a 35°C hasta obtener un residuo sólido. Finalmente, el residuo sólido se resuspende en DMSO para obtener una concentración final de 100 mg de residuo seco/ml.

La composición de lípidos del extracto de metanol, analizados con HPLC masas-masas, en orden decreciente de proporción es: diacilgliceroltrimetilhomoserina (22,70 %), triacilglicerol (17,46 %), ácidos grasos (11,79 %), liso-diacilgliceroltrimetilhomoserina (8,73 %), ceramida ácido graso alfa-hidroxilado-dihidroesfingosina (5,24 %), ceramida ácido graso alfa-hidroxilado-fitoesfingosina (4,80 %), ceramida ácido graso no hidroxilado-dihidroesfingosina (3,93 %), diacilglicerol (3,93 %), ácido graso hidroxilado de ácido graso (3,05 %), sulfoquinovosil diacilglicerol (3,05 %), monogalactosildiácilglicerol (2,62 %), ceramida ácido graso alfa-hidroxilado-esfingosina (2,18 %), ceramida ácido graso no hidroxilado-fitoesfingosina (2,18 %), digalactosildiácilglicerol (1,74 %), liso-fosfatidilglicerol (1,31 %), fosfatidilglicerol (1,31 %), sulfoquinovosil diacilglicerol (1,31 %), ceramida ácido graso no hidroxilado-esfingosina (0,87 %), fosfatidilinositol (0,87 %), liso-fosfatidilinositol (0,43 %), fosfatidilglicerol (0,43 %).

La composición de lípidos del extracto de acetato de etilo, analizados con HPLC masas-masas, en orden decreciente de proporción es: diacilgliceroltrimetilhomoserina (21,05 %), triacilglicerol (17,54 %), ácidos grasos (15,79 %), ceramida ácido graso alfa-hidroxilado-Dihidroesfingosina (5,84 %), ceramida ácido graso no hidroxilado-dihidroesfingosina (5,26 %), ceramida ácido graso alfa-hidroxilado-Fitoesfingosina (5,26 %), diacilglicerol (4,09 %), monogalactosildiácilglicerol (4,09 %), liso-diacilgliceroltrimetilhomoserina (3,50 %), ácido graso hidroxilado ácido graso (3,50 %), ceramida ácido graso alfa-hidroxilado-esfingosina (2,92 %), fosfatidilinositol (2,92 %), digalactosildiácilglicerol (2,34 %), ésteres acílicos grasos de ácidos grasos (1,75 %), ceramida ácido graso no hidroxilado-Esfingosina (1,75 %), fosfatidilglicerol (0,58 %), glucosilacilglicerol acilado (0,58 %), sulfoquinovosil diacilglicerol (0,58 %) y homólogo de monogalactosildiácilglicerol (0,58 %).

Efectos del extracto de *U. australis* en la línea celular 661W derivada de retina

Los efectos antioxidantes del extracto y su protección frente a la degeneración retiniana del extracto se estudiaron en la línea celular 661W, derivada de fotorreceptores. La línea celular 661W se obtuvo de tumores retinales de ratones transgénicos que expresan el antígeno T de SV40 bajo el control del promotor del gen IRBP (PBR-3). Es una línea celular homogénea que expresa varios marcadores de los fotorreceptores de tipo cono: opsinas, transducina y X-arrestina. Hay una gran cantidad de información disponible sobre las rutas que se activan en estas células en diversos estímulos apoptóticos y se han utilizado con éxito como herramienta para en la investigación asociada con las distrofias retinianas.

La línea celular 661W se cultivó en medio DMEM-glutamax suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) al 10% a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

Para valorar el efecto antioxidante de los extractos de metanol y de acetato de etilo de *U. australis*, la línea celular 661W fue sometida a daño por el agente oxidante nitroprusiato sódico (SNP), midiendo la viabilidad celular en presencia y ausencia de los extractos. Los cultivos celulares fueron pre-incubados durante 2 h con diferentes concentraciones de los extractos (50-800 µg/ml). Transcurrido el periodo de pre-incubación, las células en tratamiento fueron expuestas a estímulo tóxico (nitroprusiato sódico 100 µM) y tras 24 h de incubación con el estímulo tóxico se midió la supervivencia celular.

Para valorar la capacidad de aumentar la proliferación celular de los extractos de metanol y de acetato de etilo de *U. australis*, la línea celular 661W fue incubada durante 2 h con diferentes concentraciones de los extractos (50-800 µg/ml). Transcurrido el periodo de incubación se midió la viabilidad celular.

En ambos casos, la viabilidad celular se evaluó mediante medida de la capacidad reductora del compuesto XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-tetrazolio hidróxido), que se cuantificó espectrofotométricamente según las instrucciones del fabricante.

Efecto antioxidante

El extracto de metanol (**Figura 1A**) aumentó la supervivencia celular neuronal de forma estadísticamente significativa a la concentración de 400 µg/ml, mientras que el extracto de acetato de etilo (**Figura 1B**) lo hizo a una concentración de 50 a 600 µg/ml.

Proliferación celular

El extracto de metanol (**Figura 2A**) aumentó la proliferación celular de forma estadísticamente significativa a la concentración de 100-400 µg/ml, mientras que el extracto de acetato de etilo (**Figura 2B**) lo hizo a la concentración de 200 µg/ml.

Se concluye, por tanto, que el extracto de *U. australis* tiene actividad antioxidante *in vitro* en cultivos celulares, lo que hace posible su uso como antioxidante en el campo médico.

Además, su efecto reductor del daño oxidativo en la línea celular 661W apoya su uso para prevenir y tratar enfermedades neurodegenerativas que cursan con estrés oxidativo,

especialmente aquellas que afectan a los fotorreceptores (células neuronales especializadas), como serían las enfermedades neurodegenerativas de la retina.

Por otro lado, su acción promotora de la proliferación celular refuerza el interés de este extracto para su uso en la prevención y tratamiento de enfermedades de la retina, especialmente en las de tipo neurodegenerativo donde se produce pérdida de fotorreceptores.

Referencias

1. Wang P, Chin EK, Almeida D. Antioxidants for the Treatment of Retinal Disease: Summary of Recent Evidence. Clin Ophthalmol. 2021 Apr 19;15:1621-1628. doi: 10.2147/OPTH.S307009. PMID: 33907376; PMCID: PMC8064715.
- 10 2. Pinilla I, Maneu V, Campello L, Fernández-Sánchez L, Martínez-Gil N, Kutsyr O, Sánchez-Sáez X, Sánchez-Castillo C, Lax P, Cuenca N. Inherited Retinal Dystrophies: Role of Oxidative Stress and Inflammation in Their Physiopathology and Therapeutic Implications. Antioxidants (Basel). 2022 May 30;11(6):1086. doi: 10.3390/antiox11061086. PMID: 35739983; PMCID: PMC9219848.
- 15 3. B Domènech E, Marfany G. The Relevance of Oxidative Stress in the Pathogenesis and Therapy of Retinal Dystrophies. Antioxidants (Basel). 2020 Apr 23;9(4):347. doi: 10.3390/antiox9040347. PMID: 32340220; PMCID: PMC7222416.
4. Pinilla I, Maneu V. Oxidative Stress as a Main Contributor of Retinal Degenerative Diseases. Antioxidants (Basel). 2022 Jun 17;11(6):1190. doi: 10.3390/antiox11061190. PMID: 35740087; PMCID: PMC9229683.
- 20 5. Fernández-Sánchez L, Lax P, Noailles A, Angulo A, Maneu V, Cuenca N. Natural Compounds from Saffron and Bear Bile Prevent Vision Loss and Retinal Degeneration. Molecules. 2015 Jul 31;20(8):13875-93. doi: 10.3390/molecules200813875. PMID: 26263962; PMCID: PMC6332441.
- 25 6. Yang P, Liu DQ, Liang TJ, Li J, Zhang HY, Liu AH, Guo YW, Mao SC. Bioactive constituents from the green alga *Caulerpa racemosa*. Bioorg Med Chem. 2015 Jan 1;23(1):38-45. doi: 10.1016/j.bmc.2014.11.031. Epub 2014 Nov 27. PMID: 25497963.
7. Lee C, Park GH, Ahn EM, Kim BA, Park CI, Jang JH. Protective effect of *Codium fragile* against UVB-induced pro-inflammatory and oxidative damages in HaCaT cells and BALB/c

mice. *Fitoterapia*. 2013 Apr;86:54-63. doi: 10.1016/j.fitote.2013.01.020. Epub 2013 Feb 7. PMID: 23396144..

8. Stirk, Wendy & Reinecke, Diana & van Staden, Johannes. (2007). Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 19. 271-276. 10.1007/s10811-006-9134-7.
9. Rengasamy, Kannan & Amoo, Stephen & Aremu, Adeyemi & Stirk, Wendy & Gruz, Jiří & Šubrtová, Michaela & Doležal, Karel & van Staden, Johannes. (2014). Phenolic profiles, antioxidant capacity, and acetylcholinesterase inhibitory activity of eight South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 27. 10.1007/s10811-014-0438-8.
10. Suganthi N, Karutha Pandian S, Pandima Devi K. Neuroprotective effect of seaweeds inhabiting South Indian coastal area (Hare Island, Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve): Cholinesterase inhibitory effect of *Hypnea valentiae* and *Ulva reticulata*. *Neurosci Lett*. 2010 Jan 14;468(3):216-9. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.001. Epub 2009 Nov 6. PMID: 19897016.
11. Premarathna AD, Wijesekera SK, Jayasooriya AP, Waduge RN, Wijesundara RRMKK, Tuvikene R, Harishchandra DL, Ranahewa TH, Perera NAND, Wijewardana V, Rajapakse RPVJ. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the wound healing properties and safety assessment of two seaweeds (*Sargassum ilicifolium* and *Ulva lactuca*). *Biochem Biophys Rep*. 2021 Mar 31;26:100986. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100986. PMID: 33869809; PMCID: PMC8044651.
12. Qi H, Zhang Q, Zhao T, Chen R, Zhang H, Niu X, Li Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *Int J Biol Macromol*. 2005 Dec 15;37(4):195-9. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2005.10.008. Epub 2005 Nov 28. PMID: 16310843.
13. Trentin, Riccardo & Custódio, Luísa & Rodrigues, Maria João & Moschin, Emanuela & Sciuto, Katia & Da Silva, José & Moro, Isabella. (2020). Exploring *Ulva australis* Areschoug for possible biotechnological applications: In vitro antioxidant and enzymatic inhibitory properties, and fatty acids contents. *Algal Research*. 50. 10.1016/j.algal.2020.101980.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de *Ulva australis* para su uso como medicamento.
2. Composición que comprende el extracto de *Ulva australis* según la reivindicación anterior para su uso como medicamento.
- 5 3. Composición para su uso según la reivindicación anterior caracterizada por que es una composición farmacéutica.
4. Extracto de *Ulva australis* según la reivindicación 1 y composiciones según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 para su uso como medicamento para la prevención y/ o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.
- 10 5. Extracto de *Ulva australis* según la reivindicación 1 y composiciones según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 para su uso como medicamento para la prevención y/ o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la retina.
6. Extracto de *Ulva australis* según la reivindicación 1 y composiciones según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 para su uso como medicamento para la prevención y/ o el
15 tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la retina que cursan con estrés oxidativo.
7. Extracto de *Ulva australis* según la reivindicación 1 y composiciones según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 para su uso como medicamento para la prevención y/ o el
20 tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la retina que cursan con pérdida de fotorreceptores.
8. Extracto de *Ulva australis* según la reivindicación 1 y composiciones según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 para su uso para su uso como medicamento para la prevención y/o
tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina caracterizado por que las
enfermedades se seleccionan de la lista que comprende: degeneración macular asociada a
25 la edad, glaucoma, distrofias hereditarias de retina, retinopatía diabética y la retinosis pigmentaria.
9. Extracto de *Ulva australis* para su uso según las reivindicaciones 5 a 8 caracterizado por que es un extracto de metanol o de acetato de etilo.

10. Extracto de *Ulva australis* para su uso según las reivindicaciones 5 a 9 caracterizado por que es obtenido por maceración-cocción.

11. Extracto de *Ulva australis* para su uso según las reivindicaciones 5 a 10 caracterizado por estar resuspendido en DMSO.

5 12. Uso no terapéutico del extracto de *Ulva australis* como antioxidante en cultivos celulares *in vitro*.

13. Uso no terapéutico del extracto de *Ulva australis* como potenciador de la proliferación celular *in vitro*.

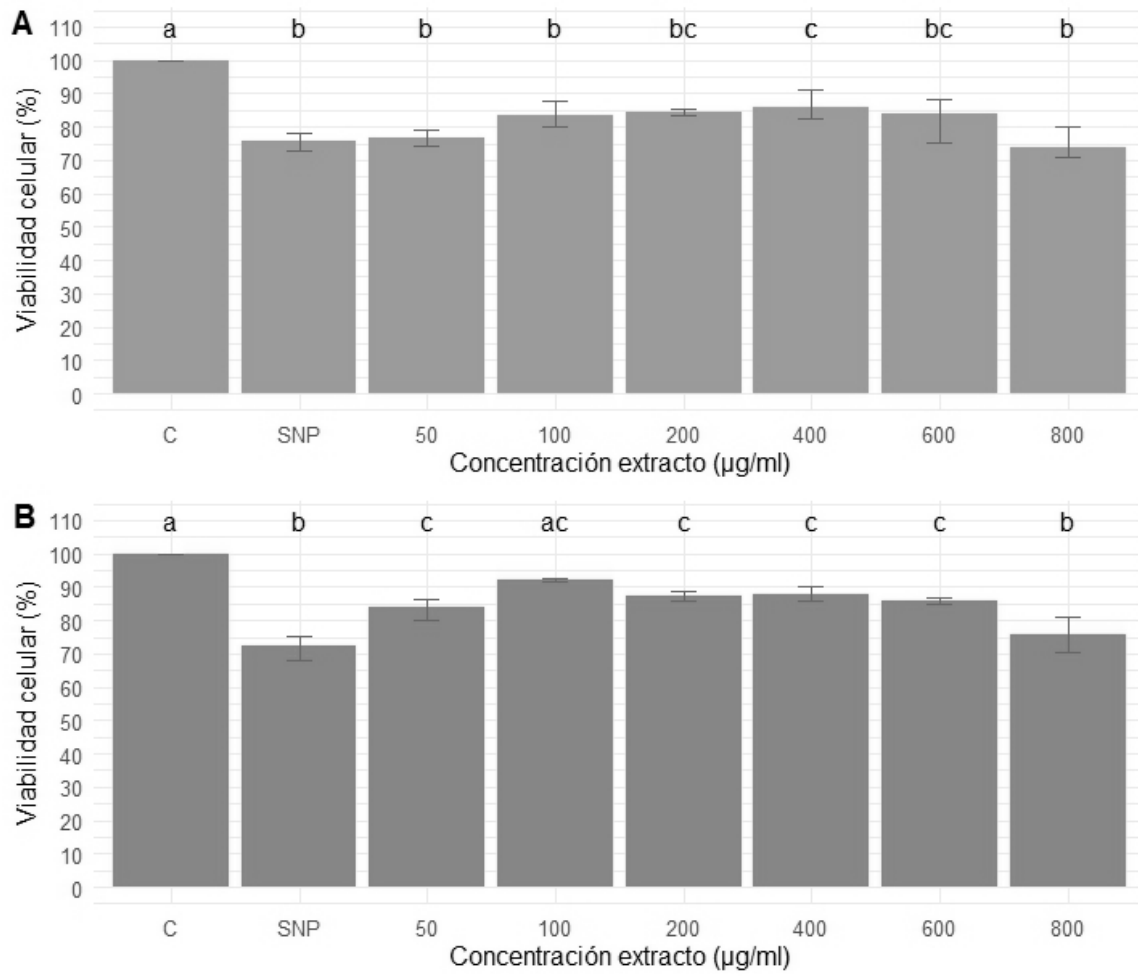


FIG. 1

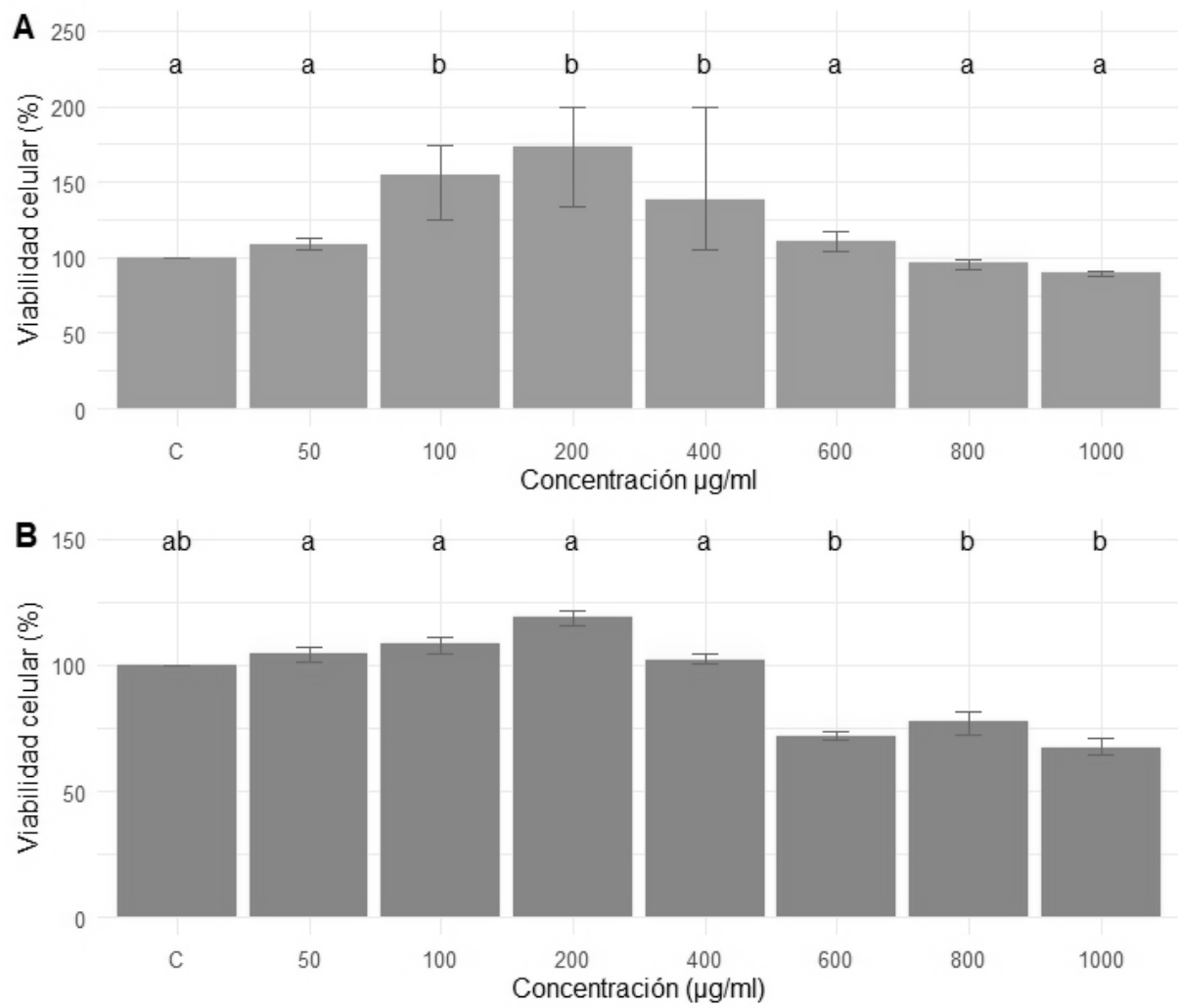


FIG. 2



21 N.º solicitud: 202430643
22 Fecha de presentación de la solicitud: 29.07.2024
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: A61K36/05 (2006.01)
A61P27/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TRENTIN, RICCARDO, et al. Exploring <i>Ulva australis</i> Areschoug for possible biotechnological applications: <i>In vitro</i> antioxidant and enzymatic inhibitory properties, and fatty acids contents. Algal Research, 2020, Vol. 50, artículo nº 101980, punto 3.4	1-4, 12
A	CINDANA MO'O, FARADILA RATU, et al. Ulvan, a polysaccharide from macroalga <i>Ulva</i> sp.: a review of chemistry, biological activities and potential for food and biomedical applications. Applied Sciences, 2020, Vol. 10, Nº 16, artículo nº 5488, resumen	1-13
A	US 2019365760 A1 (KURIHARA TOSHIHIDE et al.) 05/12/2019, descripción	1-13
A	KR 20230163048 A (JEJU TECHNOPARK et al.) 30/11/2023, reivindicaciones	1-13
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:		
Fecha de realización del informe 18.03.2025	Examinador I. Rueda Molíns	Página 1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, INTERNET, SEARCH