

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 261**

51 Int. Cl.:

A61K 36/748	(2006.01)	A23L 33/105	(2006.01)
A61K 36/896	(2006.01)	A61K 31/732	(2006.01)
A61K 36/8966	(2006.01)		
A61K 36/074	(2006.01)		
A61K 36/24	(2006.01)		
A61K 36/344	(2006.01)		
A61K 36/41	(2006.01)		
A61K 36/481	(2006.01)		
A61K 36/539	(2006.01)		
C08B 37/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2012 PCT/NL2012/050292**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12148277**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 12720687 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2701714**

54 Título: **Método para el aislamiento de polisacáridos**

30 Prioridad:

29.04.2011 EP 11164258

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

12.11.2018

73 Titular/es:

**NUTRILEADS B.V. (100.0%)
Bronland 12-N
6708 WH Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

**HELIN, JARI y
KOEK, JEAN HYPOLITES**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 689 261 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

Método para el aislamiento de polisacáridos

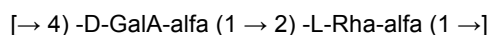
[0001] La presente invención se refiere a un método para el aislamiento de polisacáridos que se puede usar para tratar o prevenir el resfriado o la gripe.

[0002] La pectina es una mezcla compleja de polisacáridos coloidales que se encuentran en las paredes celulares primarias de monocotiledóneas y dicotiledóneas (dicotiledóneas) en el reino vegetal. Junto con celulosa, hemicelulosa y proteínas constituyen las paredes celulares de la planta. Se caracteriza por la presencia de residuos de ramnosilo, ácido galacturonilo, arabinosilo y galactosilo como componentes principales, y al menos ocasionalmente residuos de xilosilo, manosilo, glucosilo y apiosilo. Tradicionalmente, la pectina es conocida por sus propiedades gelificantes y viscosificantes utilizadas en preparaciones industriales y domésticas de gelatinas, mermeladas y confituras, y es ampliamente utilizada por sus propiedades espesantes y viscosificantes.

[0003] Generalmente, se considera que la pectina es ácido poli-D-galacturónico (homogalacturonano), en el que las fracciones de ácido galacturonilo están unidas a través de enlaces alfa (1-4). El grupo carboxilo de un residuo de ácido galacturonilo se puede esterificar con metanol, para crear pectinas con contenidos de metoxilo alto y bajo. El grado de esterificación de metilo influye en el comportamiento gelificante de la pectina. La distinción habitual es entre la pectina LM (metoxilo bajo, menos del 50 % de los grupos carboxilo esterificados) y la pectina HM (metoxilo alto, más del 50 % de los grupos carboxilo esterificados). La pectina LM forma geles tras la adición de cationes divalentes, especialmente calcio. La pectina HM no requiere cationes para formar geles. Además, el ácido galacturónico puede estar acetilado, y también contar con la presencia de ésteres metílicos. En ese caso, una de las posiciones de los grupos hidroxilo 2-OH y 3-OH se sustituye mediante esterificación para producir acetatos. La acetilación generalmente evita la formación de gel pero aumenta los efectos estabilizadores y emulsionantes de la pectina.

[0004] Se considera que el polisacárido péptico es un grupo heterogéneo de polisacáridos que incluye varias cantidades de diversos componentes, a veces presentes o ausentes, tales como (i) homogalacturonano (HG) tal como se ha descrito anteriormente, (ii) xilogalacturonano (XGA), (iii) esqueleto de ramnogalacturonano-I, que abarca cadenas laterales de arabinano y arabinogalactano I y II (RG-I), y (iv) ramnogalacturonano-II (RG-II) (Ralet et al., Carbohydrate Research, volumen 344, 2009, páginas 1798-1807; Sila D.N. et al., Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2009, volumen 8, 86-104). La composición y la estructura fina de los polisacáridos pépticos varían ampliamente dependiendo de la fuente vegetal y las condiciones de extracción aplicadas. El núcleo homogalacturonano puede tener una longitud de hasta aproximadamente 100 residuos D-GalA consecutivos. El núcleo RG-I que contiene las cadenas laterales generalmente se denomina «región ramificada» o «región vellosa», mientras que el núcleo homogalacturonano (entre dos núcleos RG-I) no se sustituye típicamente con oligosacáridos.

[0005] Los ramnogalacturonanos son un grupo de polisacáridos pépticos de la pared celular estrechamente relacionados que contienen un esqueleto del disacárido que se repite:



(que también se puede representar como: [-4) -D-GalA- α (1-2) -L-Rha (p) - α (1-])

[0006] Los ramnogalacturonanos -I (RG-I) se refieren a regiones con 30-40 repeticiones de pares de GalA y ramnosa (Rha) [Westereng et al., Mol. Nutr. Food Res. 2009, vol. 53, p. 780-789], con un número variable de residuos de Rha. Los residuos de GalA están unidos a los residuos de Rha a través de las posiciones 1 y 4, mientras que el residuo de Rha está unido al residuo de GalA a través de las posiciones anoméricas y 2-OH. En general, alrededor del 20-80 % de los residuos de Rha se ramifica en la posición 4-OH (dependiendo de la fuente vegetal y el método de aislamiento), con cadenas laterales neutras y ácidas (o la posición 4-OH). Estas cadenas laterales consisten principalmente en residuos de Ara y Gal enlazados de diversas maneras, que constituyen polímeros conocidos como arabinogalactano I (AG-I) y/o AG-II. AG-I está compuesto de un esqueleto de D-Gal beta (1,4) enlazado con sustituciones en 3-OH de grupos alfa-L-arabinosilo; el esqueleto de Gal puede tener unidades interesaciales alfa (1,5)-L-Ara. AG-II consiste en galactano altamente ramificado con un esqueleto de D-Gal beta (1,3) enlazado predominantemente interior con sustituciones de cadenas cortas (1,6) enlazadas exteriormente. Este último tiene adjuntos adicionales de L-Ara (1,3) y/o alfa (1,5) enlazados. Las cadenas laterales de oligosacáridos pueden ser lineales o ramificadas, y algunas de estas cadenas laterales pueden estar terminadas con alfa-L-fucósidos, beta-D-glucurónidos y residuos de 4-O-metil-beta-D-glucuronilo.

[0007] Algunos de los polisacáridos pépticos son conocidos por su modulación del sistema inmune después de la administración. US 6.432.454 B1 describe un procedimiento para el aislamiento de polisacáridos

inmunoactivadores. Este procedimiento se describe específicamente para el ginseng y produce un rendimiento de aproximadamente el 10 %. Los polisacáridos activos tienen un peso molecular relativamente alto.

5 [0008] WO 2009/071425 A1 describe un método para aislar polisacáridos inmunoactivadores de plantas de la subfamilia *Asclepiadoideae*, más en particular de la especie *Hoodia*. El método consiste en cortar material vegetal en trozos y lavar el material con una mezcla de metanol y agua. El material que era insoluble en el metanol se mezcló adicionalmente y se calentó en una mezcla de etanol-agua. A continuación, el material que era insoluble en etanol se mezcló con agua desmineralizada y se coció durante 3 horas. El sobrenadante contenía los polisacáridos de interés.

10 [0009] Krachanova et al. (Composition and properties of biologically active pectic polysaccharides from leek (*Allium porrum*), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (1), (10010), 2046-2051) describen la composición y las propiedades de los polisacáridos pécticos biológicamente activos del puerro (*Allium porrum*). Se menciona que el polisacárido péctico de puerro extraíble con agua tiene un peso molecular de 106 Da y presenta actividades inmunoestimulantes.

15 [0010] Ele Ekouna J.-P. et al. (*Carbohydrate Polymers*, 2011, volumen 83, páginas 1232-1239) describen un método para el aislamiento de polisacáridos (pectina) del té verde (*Camellia sinensis*).

20 [0011] Una desventaja de estos métodos es que el rendimiento de los polisacáridos inmunomoduladores es relativamente bajo (del 5 al 10 %).

25 [0012] Las pectinas generalmente se extraen de materiales vegetales usando condiciones ácidas o aplicando quelantes para facilitar la eliminación de la matriz, por ejemplo como en May C.D. (*Carbohydrate Polymers* 1990, volumen 12, 79-99).

30 [0013] La extracción de agua caliente y/o las condiciones ácidas tienen la desventaja de que se forman geles en el proceso de extracción, y esto solo permite condiciones diluidas que disminuyen la eficiencia del uso del reactor aumentando los costes de procesamiento. Otra desventaja es que al aplicar las condiciones ácidas habituales, los rendimientos son comparables o inferiores a los de la extracción solo con agua caliente, probablemente debido a problemas de gelificación. Además, debido al calentamiento, puede producirse beta eliminación, que es una división catalizada por bases de las cadenas de ácido homopoligalacturónico en partes más pequeñas. La beta eliminación aumenta cuando la temperatura aumenta, y con un pH > 4,5 (Sila D.N. et al., *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2009, vol. 8, 86-104) Como en la mayoría de los casos, la se pectina requiere por sus propiedades estructurantes, la tendencia normal es evitar o limitar el proceso de beta eliminación para retener una molécula relativamente larga de tramos de ácido homopoligalacturónico. La rotura de la cadena de las pectinas se produce fácilmente para los fragmentos esterificados pero no para los desesterificados debido a la naturaleza de la beta eliminación inducida por la base, que requiere un grupo carboximetiléster en la posición alfa (Diaz J.V. et al., *Agric Food Chem.*, 2007, vol. 55, 5131-5136).

40 [0014] WO 2004/020472 A2 describe un proceso para tratar material vegetal que contiene pectina, calentando a una temperatura inferior a 90 °C y pH 3,2-3,9 para inactivar pectina esterasa presente de forma natural. De esta forma, se produce una desesterificación mínima de la pectina.

45 [0015] Con el fin de superar las desventajas de las condiciones ácidas, la extracción de pectina y la identificación de la composición de los polisacáridos extraídos se han llevado a cabo en condiciones de neutras a alcalinas.

50 [0016] Sila D.N. et al. (*Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 2005, volumen 70 (2), 19-22) revelan que se pueden usar soluciones acuosas de carbonato de sodio a alta temperatura (90-110 °C) en el procesamiento de pectina, con el fin de inducir la fragmentación de la cadena principal para reducir la gelificación. La fragmentación conducirá a la reducción del peso molecular de los polisacáridos. La beta eliminación se ve favorecida al aumentar el pH (de 3,5 a 9), debido a la presencia de grupos metil éster. Por preprocesamiento, se produce la desesterificación para disminuir el contenido de metil éster, lo que conduce a la disminución de la cantidad de pectina extraíble con agua, al tiempo que aumenta la cantidad de pectina no esterificada, extraíble con carbonato, que es resistente a la beta eliminación.

60 [0017] Dobias J. et al. (*Sbornik Vysoke Skoly Chemicko-Technologicke v Praze* 1986, E60, 51-59) revelan que la desesterificación de la pectina de manzana se puede lograr aplicando álcali frío (amoníaco) para controlar las propiedades gelificantes, mediante la hidrolización los ésteres metílicos.

65 [0018] US 7.691.986 describe el aislamiento de fibras tratadas con alcohol a partir de BAM (manano acetilado bruto: un extracto de pulpa de aloe vera) mediante centrifugación. El BAM se disolvió en agua a 2 mg/ml. El gránulo, que consiste en fibras de pared celular, se recolectó y se lavó tres veces con agua antes de secarse. A continuación, estas fibras se tratan con soluciones con diferentes valores de pH que contienen agente quelante

EDTA a altas y bajas temperaturas, para extraer las pectinas de Aloe. En la columna 12, la línea 54-56 se indica que la extracción con EDTA a pH 7,0-8,5 es el método de extracción más eficaz para la pectina de Aloe.

[0019] JP 2009-165452 A describe el uso de agua termal o una solución de bicarbonato para la extracción de pectina, durante un periodo de tiempo de 5-150 minutos, en lugar de usar un paso ácido a pH 1,5-2,5 durante un periodo que va de 30 minutos a varias horas.

[0020] UA75734C describe un proceso para la producción de pectina a partir de hojas de manzano, en donde se usa una solución de bicarbonato de sodio al 2 % en combinación con hidrato de sodio 2M, por lo tanto se aplica un pH alto en este proceso.

[0021] US 3.971.858 describe el uso de amoniaco o bicarbonato de amonio para la extracción de sólidos de hojas de té para la preparación de extractos de té para producir té instantáneo soluble. Debido a la alta temperatura preferida (100 °C) es de esperar que el bicarbonato de amonio se convierta en dióxido de carbono, agua y amoniaco, y se puede deducir que el amoniaco es el ingrediente activo responsable del aumento del rendimiento al 30 %.

[0022] Deng C. et al. (Carbohydrate Research, 2006, volumen 341, 474-484) describen la despolimerización de los ramnogalacturonanos mediante primera esterificación de metilo y luego la escisión de los residuos de ácido galacturónico en polisacáridos pécticos mediante beta eliminación. El último paso se realiza a pH 7,3 y 125 ° C en borato de sodio 0,2 M. Los fragmentos que se obtuvieron incluían oligosacáridos de bajo peso molecular (con un peso molecular de hasta aproximadamente 1300 Da) procedentes del núcleo RG-I.

[0023] Lin H.Y. et al. (Food Hydrocolloids, 2009, volumen 23, páginas 840-848) describen el aislamiento de hidrocoloides de las morera (*Morus alba* L.) se va. Las hojas se extrajeron usando una solución de bicarbonato de sodio 0,14 M a 95 °C durante 4 horas. El extracto contenía principalmente carbohidratos con un alto nivel de ácido urónico, 28-33 % basado en el peso seco. Las composiciones neutras de azúcar del extracto constituidas principalmente por ramnosa (23-27 % molar), arabinosa (20-21 % molar), galactosa (23-24 % molar), glucosa (21-26 % molar), xilosa (6- 7 % molar) y trazas de manosa (<0,3 % molar). Basándose en el alto peso molecular promedio de los carbohidratos obtenidos (alrededor de 6100 kDa y 6600 kDa) y la insensibilidad de los polisacáridos a cationes divalentes (la viscosidad de una solución del extracto no aumenta con la adición de cationes), se puede concluir que el polisacárido que se extrae aquí es diferente de una estructura típica de ramnogalacturonano I, debido a su alto nivel de glucosa, muy alto peso molecular, y los ácidos urónicos no se especifican como ácido galacturónico. Katayama H. et al. (Protoplasma, 2008, vol. 233, página 157-163) revelan que los polisacáridos mucilaginosos ácidos están ubicados entre la membrana plasmática y la pared celular, y no son parte de la pared celular vegetal.

[0024] Xia W. et al. (Chemical Journal of Chinese Universities, 2008, volumen 29, página 2205-2208) describen la extracción de polisacáridos de hojas de morera, usando una solución de NaOH en agua (0,5 M, condiciones altamente alcalinas, 4 °C, pH> 13). Los polisacáridos tenían un peso molecular medio de 54 kDa y eran eficaces para reducir los niveles de glucosa en sangre.

[0025] Redgwell R.J. et al. (European Food Research and Technology, 2008, volumen 227, página 1025-1033) describen el agotamiento de la pectina del material de la pared celular de la manzana usando un paso de extracción con una solución de carbonato de sodio. El uso del carbonato de sodio conduce a la extracción de polisacárido péctico de la pared celular primaria, y los polisacáridos son desesterificados por el pH alcalino. Los autores no proporcionan detalles sobre las estructuras de las moléculas obtenidas.

[0026] Zhu et al. (Phytochemistry, 2005, vol 66, páginas 1067-1076) describen el aislamiento del polisacárido de ramnogalacturonano-I de *Panax notoginseng*, que es una planta medicinal utilizada en China. Se realiza un primer paso de extracción usando metanol, y el residuo insoluble en alcohol se somete a extracción usando ácido acético y fenol. A continuación, el residuo de esa etapa se trata en agua caliente (100 °C durante 30 minutos). Este paso probablemente dará lugar a la beta eliminación de polisacáridos pécticos, debido a la alta temperatura. Luego el residuo se extrae con una solución de carbonato de sodio (suplementado con borohidruro de sodio (NaBH₄) y azida sódica (NaN₃)). En un primer paso, la extracción se realiza durante la noche a 4 °C, a un pH de al menos 11 (0,5 M Na₂CO₃), seguido de un segundo paso durante 6 horas a temperatura ambiente. El primer paso conducirá a la desmetilación de los ésteres metílicos del ácido galacturónico. El segundo paso a la temperatura más alta es entonces solubilizar el polisacárido péctico desesterificado. Los autores no proporcionan detalles sobre el peso molecular de los fragmentos RG-I, se espera que sean bajos basándose en las condiciones alcalinas del paso de extracción en la primera etapa de la noche a 4 °C, en la que se producirá la degradación de las moléculas. Esto conduce a la suposición de que el método aplicado aquí es adecuado para determinar estructuras que estaban presentes en las materias primas, mientras que no es adecuado extraer polisacáridos con un alto peso molecular para estimular la respuesta inmune. Además, las fracciones obtenidas solo contienen cantidades muy bajas de RG-I (de un 3 a un 5 %).

[0027] Ryden P. (Biochemical Journal, 1990, volumen 269, página 393-402) describen la extracción de

polisacáridos de la pared celular del judías pintas (*Phaseolus coccineus*), usando una solución de carbonato de sodio con borohidruro de sodio. Se aplican dos pasos de extracción: Na_2CO_3 0,05M durante 20 h a 1 °C, y posteriormente Na_2CO_3 0,05M durante 2 horas a 20 °C. Los autores indican que el principal problema es estudiar la estructura de los polisacáridos de la pared celular con una degradación mínima tras la extracción, lo que indica implícitamente que en estas condiciones los polisacáridos se degradan. No se proporciona ninguna indicación sobre el peso molecular de los materiales obtenidos.

[0028] Fischer M. et al. (Carbohydrate Polymers, 1994, volumen 25, páginas 167-175) describen el aislamiento de polisacáridos pécticos usando dos pasos de extracción, el primero con ácido *trans*-1,2-diaminociclohexano-*N,N,N',N'* tetraacético (CDTA), y como segundo paso una extracción doble de carbonato de sodio. El paso de doble extracción con carbonato de sodio comprende primero Na_2CO_3 0,05M a 1 °C durante 16 h (minimizando la beta eliminación), y segundo 0,05M Na_2CO_3 a 20 ° C durante 3 h. El pH en este paso será de al menos 10, debido a la alta concentración de carbonato.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0029] La técnica anterior indica que el tratamiento de materiales vegetales en condiciones alcalinas conducirá al aislamiento y la fragmentación de polisacáridos a pesos moleculares relativamente bajos. Aplicando estas condiciones alcalinas no se extraen polisacáridos inmunoestimulantes. Además, si fuera necesario obtener polisacáridos más grandes, se requerirían largos tiempos de extracción a bajas temperaturas para minimizar la beta eliminación, y aún alto habría alto riesgo de fragmentación de polisacáridos. Esto disminuye drásticamente la eficiencia de un recipiente de extracción. Por lo tanto, existe la necesidad de aumentar la eficacia de la extracción para obtener polisacáridos a partir de materiales vegetales que tienen un efecto inmunomodulador, en particular para obtener polisacáridos que contienen núcleos de ramnogalacturonano I y tienen un peso molecular que es activo en la estimulación del sistema inmune.

[0030] El peso molecular debe ser lo suficientemente alto como para influir aún en el sistema inmune, mientras que, por otro lado, el polisacárido no debe gelificar, o hacerlo solo de forma limitada, después de la extracción para evitar un procesamiento difícil y, en consecuencia, disminuir el rendimiento del proceso de extracción. Además, la implementación a gran escala de los procedimientos ha demostrado que los productos deseados no tienen en todos los casos una actividad biológica constante, por lo que es esencial lograr resultados reproducibles.

[0031] Ahora descubrimos que al aplicar altas temperaturas en un tiempo relativamente corto, el uso de una solución acuosa tamponada con un pH entre 7 y 8 permitió aislar los polisacáridos que contienen tanto los núcleos RG-I como el núcleo RG-I y los tramos del ácido poligalacturónico en la proporción correcta para obtener un efecto inmunomodulador, y con un peso molecular entre 40 kDa y 2000 kDa. Además, el rendimiento fue mayor que con condiciones de uso neutras o ácidas. También el procesamiento fue más fácil debido a la ausencia de gelificación incluso para las fuentes vegetales que tras la extracción con agua caliente o ácido dieron gelificación a las mismas concentraciones utilizadas. Esto permite realizar la extracción a concentraciones más altas y, por lo tanto, lograr una mayor eficiencia en la extracción.

[0032] Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción de un preparado a partir de un material vegetal enriquecido en un polisacárido, en el que el esqueleto del polisacárido comprende núcleos de ramnogalacturonano-I y opcionalmente tramos de ácido homogalacturónico alfa (1,4) enlazado, en el que la proporción molar de residuos de ácido galacturonilo con respecto a residuos de ramosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 30: 1 a 1: 1, y en el que el polisacárido tiene un peso molecular entre 40 kDa y 2000 kDa, que comprende los pasos:

- a) mezclar el material vegetal con un disolvente alcohólico polar, preferiblemente etanol; y
- b) separar un residuo sólido obtenido en el paso a) del disolvente; y
- c) mezclar el residuo sólido obtenido en el paso b) con una solución acuosa tamponada que tiene un pH entre 7 y 8; y
- d) separar opcionalmente el residuo sólido de la solución acuosa según se obtiene del paso c); y
- e) purificar opcionalmente la solución acuosa del paso d) para producir el polisacárido.

[0033] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un preparado para su uso en el tratamiento o prevención del resfriado o la gripe que tiene un contenido de materia seca de al menos un 20 % en peso, con un contenido en dicho preparado de al menos un 50 % en peso de materia seca de una mezcla de polisacáridos pécticos, que incluye al menos un 20 % calculado en peso de los polisacáridos pécticos, de pectinas de ramnogalacturonano I que tienen un peso molecular de más de 40 kDa. Dicha mezcla se caracteriza por:

- un grado de metilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %;

- un grado de acetilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %;

en el que el preparado no forma un gel cuando se diluye con una solución acuosa de bicarbonato de amonio 50 mM hasta un contenido de sólidos de 2,5 % en peso.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0034] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entendería comúnmente un experto en la técnica.

10 [0035] Todos los porcentajes, a menos que se indique lo contrario, se refieren al porcentaje en peso.

[0036] En el caso de que se proporcione un intervalo en el contexto de la presente invención, el intervalo indicado incluye los puntos finales mencionados.

15 [0037] Abreviaturas: kDa - kilodalton; Gal - D - galactosa; GalA - ácido D-galacturónico; Rha - L - ramnosa; Ara - L-arabinosa; Fuc - L-fucosa; Glc-D-glucosa; GlcA - ácido D-glucurónico. Las formas L y D de estos monómeros tal como se indican aquí también se aplican a los monómeros como se indican en el resto de esta especificación (que pueden no estar abreviadas sino escritas en su totalidad).

20 [0038] El término « polisacáridos pécticos » abarca los homogalacturonanos, xilogalacturonanos, pectinas de ramnogalacturonano-I y ramnogalacturonano-II, y combinaciones de los mismos.

[0039] El término « pectinas de ramnogalacturonano-I » o « pectinas RG-I » se refiere a polisacáridos pécticos que comprenden uno o más núcleos de ramnogalacturonano-I.

25 [0040] El término « núcleo de ramnogalacturonano-I » o « núcleo RG-I » se refiere a tramos lineales de 10-200, preferiblemente 30-40 repeticiones de pares de ácido galacturónico (GalA) y ramnosa (Rha), donde los residuos de GalA están relacionados con el Restos de Rha a través de las posiciones 1 y 4, mientras que el residuo de Rha está ligado al residuo GalA a través de las posiciones anoméricas y 2-OH, es decir, residuos alternantes de alfa (1 → 4)-galacturonil-alfa (1 → 2)-ramnosilo.

30 [0041] Material vegetal: en el contexto de la presente invención, un material vegetal se refiere a material de origen vegetal, y este material puede proceder de una verdura o de una fruta (tal como se entiende habitualmente en el contexto de la cocina o de las recetas).

35 [0042] Bicarbonato se refiere al anión HCO_3^- , que se puede agregar a un preparado en forma de una sal, como bicarbonato sódico o bicarbonato potásico.

Respuesta inmunitaria

40 [0043] Por el término « respuesta inmunitaria moduladora » tal como se usa en este documento, se entiende que la actividad o capacidad del sistema inmunitario para defender el cuerpo está modulada. Esto puede estar relacionado con inmunoestimulación o inmunosupresión. La tarea principal del sistema inmunológico es proteger contra patógenos como hongos, bacterias, virus, protozoos y parásitos. En este contexto, modular la respuesta inmunitaria preferiblemente significa la estimulación de la respuesta inmunitaria. Apropiadamente, la estimulación de la respuesta inmunitaria contribuye a una defensa natural mejorada del cuerpo humano. Por otro lado, el sistema inmunitario a veces crea una respuesta inmunitaria contra sustancias inofensivas, como el ácaro doméstico, el polvo o el polen, lo que da lugar a alergias. Además, muchos trastornos fisiológicos, como la hipercolesterolemia y la obesidad, dan como resultado un estado inflamatorio de bajo grado. La modulación inmunitaria en el contexto de las respuestas inmunitarias anormales, como la alergia o la inflamación (crónica), significa amortiguar o contrarrestar la respuesta inmunitaria hipersensible. La presente invención no solo se refiere a la tarea principal del sistema inmunitario, sino también a esta segunda respuesta inmunitaria « anormal ».

45 [0044] Se pueden usar varios ensayos para identificar componentes que podrían modificar la inmunidad. Aquí utilizamos las células fagocíticas y células asesinas naturales (NK) para ayudar a la identificación de compuestos inmunoestimulantes, ya que estas células son parte del sistema inmunitario innato, que es una primera línea de defensa no específica de activación rápida contra los patógenos.

50 [0045] Las células fagocíticas como los neutrófilos, monocitos y macrófagos pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) para matar patógenos como hongos y bacterias. El efecto de los ingredientes sobre la actividad de la fagocitosis se puede medir *ex vivo* con sangre fresca de voluntarios humanos sanos después de la incubación con bacterias *E. coli* marcadas con FITC. El porcentaje de células fagocitarias en la población de granulocitos se puede determinar mediante citometría de flujo. Los resultados típicamente se normalizan con el efecto del lipopolisacárido (LPS), que es un potente compuesto inmunoestimulante de referencia conocido.

Apropiadamente, un porcentaje normalizado de granulocitos fagocitados de más del 40 % se considera un efecto estimulante inmunitario significativo.

5 [0046] Las células NK pueden matar células diana que han perdido o expresan cantidades insuficientes de CMH clase I, un suceso frecuente en células infectadas por tumores o virus. El efecto de los ingredientes sobre la actividad de las células NK puede medirse *ex vivo* con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de sangre fresca de voluntarios humanos sanos. Después de la preincubación de las PBMC con el ingrediente, habitualmente se añaden las células diana K562 previamente marcadas y después de la incubación posterior se puede añadir yoduro de propidio para la detección de células muertas. El porcentaje de células
10 diana muertas se puede determinar con citometría de flujo. Los resultados se normalizan típicamente al efecto de la interleucina-2 (IL-2), que es un potente compuesto estimulante de referencia bien conocido de las células NK. Apropiadamente, una actividad de células NK de % normalizado de más del 17 % se considera un efecto estimulante inmunitario significativo.

Método para la producción del preparado de material vegetal

15 [0047] En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción de un preparado a partir de un material vegetal enriquecido en un polisacárido, en el que el esqueleto del polisacárido comprende núcleos de ramnogalacturonano I y opcionalmente tramos de ácido homogalacturónico alfa (1,4) enlazado, en el que la proporción molar de residuos de ácido galacturonilo con respecto a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 30: 1 a 1: 1, y en el que el polisacárido tiene un peso molecular entre 40 kDa y 2000 kDa, que comprende los pasos:

- 25 a) mezclar el material vegetal con un disolvente alcohólico polar, preferiblemente etanol; y
b) separar un residuo sólido obtenido en el paso a) del disolvente; y
c) mezclar el residuo sólido obtenido en el paso b) con una solución acuosa tamponada que tiene un pH entre 7 y 8; y
d) separar el residuo opcionalmente sólido de la solución acuosa según se obtiene del paso c); y
e) purificar opcionalmente la solución acuosa del paso d) para producir el polisacárido.

30 [0048] El método de acuerdo con la invención se usa para la producción de un extracto que está enriquecido en un polisacárido tal como se ha definido. El polisacárido se puede usar para modular la respuesta inmunitaria cuando se ingiere, se inhala o se inyecta (preferiblemente los dos últimos cuando se usa como adyuvante).

35 [0049] Las plantas que son adecuadas como material de partida para la extracción de los polisacáridos según la presente invención incluyen cualquier planta, pero se prefieren especialmente las plantas u órganos vegetales comestibles, tal como se describe mediante el término general «frutas y verduras». Una verdura es una planta que se cultiva para obtener una parte comestible, como la raíz de remolacha, la hoja de espinaca o los capullos de brócoli o coliflor. Por lo general, se considera que una verdura es cualquier producto vegetal salado o no dulce o de bajo dulzor. Por lo general, en el contexto culinario, el término verdura excluye los frutos dulces, semillas, nueces, granos y hierbas y especias. La definición de fruta depende de si el término se usa en el contexto culinario o botánico. En términos culinarios, la fruta es generalmente un órgano de reproducción vegetal de sabor dulce, como una manzana o fresa. Algunas partes de plantas que se consideran frutas en sentido botánico, se consideran verduras en el contexto culinario, porque no son dulces (o no lo son tanto), por ejemplo, el pepino y el tomate.

45 [0050] El órgano vegetal que puede servir como fuente del preparado según la invención depende de la especie real que se utiliza como fuente de los polisacáridos. Estos órganos pueden ser cualquier parte de la especie, como las hojas (definidas como el órgano vegetal especializado en la fotosíntesis), incluidas las agujas; flores y cabezuelas; brotes; semillas; vainas; frutas; bayas, tubérculos y raíces, y el tallo incluyendo la corteza. Por ejemplo, se prefieren los órganos siguientes de las especies preferidas como fuente para obtener los polisacáridos usando el método de la invención.

- 55
 - *Daucus carota* subsp. *sativus* (zanahoria): la raíz.
 - *Malus domestica* (manzana): el fruto, especialmente la piel del fruto.
 - *Capsicum annuum* (pimiento morrón o pimiento rojo o verde, o pimentón): el fruto. Se prefiere especialmente el pimiento rojo.

[0051] Para facilitar la extracción de polisacáridos que comprenden núcleos de RG, se prefiere emplear un material vegetal que se ha tratado para destruir las paredes celulares. Ejemplos de tratamientos que pueden usarse adecuadamente para destruir las paredes celulares contenidas en los materiales vegetales incluyen la molienda, fresado, corte, osmólisis, ciclo de congelación-descongelación, interrupción al vacío, cocción y tratamientos enzimáticos. Naturalmente, estas técnicas también se pueden usar en combinación. Cuando se usa

el tratamiento enzimático para destruir paredes celulares, se debe tener cuidado de no degradar los polisacáridos pécticos que el presente método pretende aislar. Por lo tanto, el preparado enzimático debería tener muy poca o ninguna actividad de pectinasa. Las enzimas que pueden usarse para degradar las paredes celulares incluyen celulasas, proteasas, amilasas y combinaciones de las mismas.

5

[0052] El material vegetal que se mezcla con el disolvente alcohólico polar puede ser material vegetal seco o fresco. Preferiblemente, el material vegetal es material vegetal seco, p. ej., material vegetal que tiene una actividad acuosa de menos de 0,9, incluso más preferiblemente de menos de 0,6 y lo más preferible de menos de 0,5.

10

[0053] El polisacárido que se obtiene mediante el método de la invención puede comprender un núcleo RG-I que puede estar flanqueado en uno o dos de sus lados por uno o dos tramos de ácido homogalacturónico. Alternativamente, los polisacáridos pueden contener fragmentos alternos de RG-I y tramos de ácido homogalacturónico.

15

[0054] Los materiales vegetales especialmente adecuados como fuente del preparado según la invención comprenden manzana, zanahoria, pimiento morrón o combinaciones de los mismos. Otras fuentes pueden ser cultivos como tomate, cebolla, hierbas y especias, ginseng y hojas de té (*Camellia sinensis*).

20

[0055] Generalmente, los polisacáridos de base vegetal se componen de polímeros insolubles grandes, como componentes de la pared celular (por ejemplo, celulosa), oligosacáridos solubles pequeños, como monómeros (por ejemplo, glucosa) y dímeros (por ejemplo, celobiosa) y polisacáridos solubles grandes. Por lo tanto, antes de preparar el extracto acuoso tamponado, el material vegetal se mezcla con un disolvente alcohólico polar, preferiblemente etanol, preferiblemente durante un período de entre 15 minutos y 6 horas. En este paso a), se eliminan pequeñas moléculas orgánicas como mono y disacáridos, pequeños ácidos orgánicos y sus sales metálicas, aminoácidos y oligopéptidos, polifenoles, moléculas que contribuyen al color como carotenoides, antocianos y clorofila, y sustancias grasas como glicéridos, colinas, fosfolípidos y esteroides, para aumentar el contenido relativo de polisacáridos en el material vegetal que no se disuelve en el disolvente.

25

30

[0056] El disolvente alcohólico polar empleado en el paso a) es de manera ventajosa un alcohol C1-4. Incluso más preferiblemente, el disolvente alcohólico polar se selecciona entre etanol, iso-propanol, metanol y combinaciones de los mismos. En el caso más preferible, el disolvente alcohólico polar es etanol.

35

[0057] Preferiblemente, en el paso a), el material vegetal se combina con una mezcla de etanol/agua, p. ej., una mezcla del 50 % al 95 % de etanol y agua, más preferiblemente una mezcla del 70 % al 85 % de etanol y agua, y en el caso más preferible una mezcla del 70 % al 80 % de etanol y agua.

40

[0058] Según otra realización preferida, el material vegetal se mezcla con una cantidad total del disolvente alcohólico polar que es al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 8 veces y en el caso más preferible al menos 12 veces mayor que el peso seco del material vegetal, preferiblemente dividido en dos o más pasos de lavado. La mezcla del material vegetal con el disolvente alcohólico polar y la subsiguiente separación de residuo sólido se lleva a cabo de manera ventajosa como una secuencia de etapas de lavado, p. ej., mezclando de nuevo el residuo sólido obtenido en el paso b) con disolvente alcohólico polar y separando el residuo sólido. Este ciclo puede repetirse varias veces antes de que el residuo sólido se mezcle con la solución acuosa tamponada en el paso c). De hecho, se prefiere que el presente método emplee al menos 2, incluso más preferiblemente al menos 3 de estos pasos de lavado antes de que el residuo sólido se mezcle con la solución acuosa tamponada.

45

50

[0059] Preferiblemente, la temperatura en el paso a) está entre 30 °C y 100 °C a presión atmosférica, preferiblemente entre 50 °C y 95 °C, preferiblemente entre 60 °C y 80 °C. Preferiblemente, esta fase a) tiene lugar durante un período de entre 15 minutos y 6 horas, preferiblemente entre 1 y 3 horas. En el paso b), el residuo sólido obtenido en el paso a) se separa del disolvente. El residuo sólido que no se disuelve durante esta extracción alcohólica se separa del líquido por cualquier método adecuado, tal como filtración o centrifugación. Los sólidos que quedan después de este paso de separación son la base de los pasos adicionales del método según la invención. Opcionalmente, se puede llevar a cabo un segundo paso de extracción en el que el material sólido obtenido después de la primera extracción alcohólica se pone en contacto con un alcohol o cualquier otro disolvente orgánico adecuado, que comprenda preferiblemente etanol. Las condiciones de este segundo paso opcional de extracción con disolvente son preferiblemente similares al primer paso de extracción con disolvente a). Por ejemplo, los pasos primero y segundo de extracción con disolvente se realizan poniendo en contacto el material vegetal con etanol al 85 % en agua a 80 °C, durante 2,5 horas a presión atmosférica. La presión atmosférica es aproximadamente 1013 bar a nivel del mar. Las variaciones naturales en la presión pueden ocurrir debido a las condiciones climáticas y la altitud y están dentro del ámbito de la invención.

55

60

[0060] En el paso c), el residuo sólido obtenido en el paso b) se mezcla con una solución acuosa tamponada que tiene un pH entre 7 y 8, preferiblemente durante un periodo de entre 15 minutos y 3 horas.

65

[0061] De acuerdo con una realización particularmente preferida, la solución acuosa tamponada contiene (está

tamponada por) un ácido débil o una base débil que tiene un pK_a en el intervalo de 6,0 a 8,8, incluso más preferiblemente de 6,1 a 8,5 y en el caso más preferible de 6,2 a 7,5.

[0062] Los ejemplos de ácidos/bases débiles que pueden usarse adecuadamente incluyen:

5

Citrato	pK3:	6,39
Bicarbonato	pK2:	6,35
Dihidrógeno fosfato	pK2	7,20
Bisulfito	pK2	7,20
EGCG	pK1	7,6
Teobromina	pK	7,89
Hidroxipurina	pK	8,26
Cisteína	pK	8,37

10

[0063] Incluso más preferiblemente, dichos ácidos débiles o bases débiles se seleccionan de entre bicarbonato, citrato, fosfato y combinaciones de los mismos, en el caso más preferible la solución acuosa contiene bicarbonato, especialmente iones de bicarbonato. El pH de la solución acuosa tamponada se puede ajustar adecuadamente al nivel deseado (por ejemplo, en el intervalo de pH 7,0 a 8,0), añadiendo por ejemplo hidróxido potásico/sódico y/o ácido clorhídrico.

15

[0064] La fuente del bicarbonato en el paso c) es preferiblemente bicarbonato sódico o bicarbonato potásico, o combinaciones de los mismos. Por lo tanto, preferiblemente la solución acuosa comprende bicarbonato de sódico o bicarbonato potásico o combinaciones de los mismos. La concentración de bicarbonato es tal que el pH en este paso está entre 7 y 8. Preferiblemente, el pH en el paso c) está entre 7,5 y 8. Preferiblemente, la solución acuosa está libre de bicarbonato de amonio.

20

[0065] Preferiblemente, la temperatura en el paso c) está entre 30 °C y 100 °C a presión atmosférica, preferiblemente al menos a 60 °C, preferiblemente al menos a 80 °C. El caso más preferible es que la temperatura sea de al menos 90 °C. La extracción tiene lugar preferiblemente durante un período de entre 15 minutos y 3 horas, preferiblemente entre 30 minutos y 2 horas, y más preferiblemente entre 30 minutos y 1 hora. La extracción preferiblemente se realiza a la temperatura de ebullición del agua, lo que significa aproximadamente 100 °C a presión atmosférica. La extracción también se puede realizar a una presión mayor que la presión atmosférica, lo que puede conducir a un menor tiempo de extracción. La ventaja de una temperatura más alta es que la extracción de los polisacáridos es más rápida que a temperaturas relativamente bajas. Por otro lado, se deben evitar las reacciones secundarias indeseadas, por lo tanto, la presión a la que se realiza la reacción es preferiblemente la presión atmosférica máxima. La presión atmosférica es aproximadamente 1.013 bar a nivel del mar. Las variaciones naturales en la presión pueden ocurrir debido a las condiciones climáticas y la altitud y están dentro del ámbito de la invención. Además, a temperaturas de aproximadamente 70 °C, las enzimas endógenas presentes en el material vegetal generalmente se desactivan, lo que significa que estas enzimas ya no ejercen ninguna actividad.

25

30

35

[0066] El material vegetal del residuo sólido obtenido en el paso b) y aplicado en el paso c) se trata preferiblemente usando al menos una cantidad de solución acuosa tamponada que es tres veces mayor que la del residuo sólido (p/p). Más preferiblemente, la concentración del residuo sólido en el paso c) es al menos aproximadamente del 2 % en peso de la solución acuosa tamponada, más preferiblemente al menos del 3 % en peso. Preferiblemente, la concentración es como máximo un 25 % en peso de la solución acuosa tamponada, más preferiblemente como máximo un 15 % en peso, y en el caso más preferible como máximo un 10 % en peso. Una ventaja de una concentración relativamente baja del extracto en el paso c) es que el rendimiento de la extracción puede aumentar. Se puede extraer más material vegetal que comprende los polisacáridos de interés usando una concentración relativamente baja de residuo.

40

45

[0067] El polisacárido de interés se disuelve en la solución acuosa durante el proceso de mezcla en el paso c). Por lo tanto, esta solución es el material que forma la base para otros pasos de proceso opcionales. Se puede obtener un residuo sólido del paso c), que entonces es el material que no se disuelve en la fase acuosa. Si tal residuo sólido se obtiene en el paso c), entonces en el paso d) opcionalmente el residuo sólido se separa de la solución acuosa tal como se obtiene a partir del paso c). Esta separación opcional puede realizarse por cualquier método adecuado, tal como filtración o centrifugación.

50

[0068] Opcionalmente, se puede aplicar un segundo paso como el paso c) para extraer el polisacárido de interés del residuo sólido, si este se obtiene en el primer paso c). En ese caso, las condiciones preferidas de dicho segundo paso c) son las mismas que para el (primer) paso c). También entonces puede requerirse un segundo

paso de separación, si también el segundo paso c) produjera un residuo sólido. Además, dicho segundo paso opcional de extracción acuosa puede realizarse sin la presencia de bicarbonato, lo que significa que solo se realiza una extracción acuosa.

5 [0069] En el paso e) opcional, finalmente el extracto acuoso del paso d) puede purificarse para concentrar el polisacárido del extracto acuoso. Esta concentración puede realizarse secando el extracto para obtener un residuo sólido que contenga el polisacárido de interés. El extracto acuoso también se puede usar como tal, sin concentración o purificación adicional. Si el extracto se seca, el método de secado aplicado puede incluir secado por pulverización, o evaporación al vacío, secado por cinta, liofilización y cualquier otro método adecuado.

10 [0070] Opcionalmente, los dos o más extractos acuosos, si se ha llevado a cabo un segundo etapa de extracción, pueden mezclarse para obtener un único extracto que contiene el polisacárido de según la invención. Se aplica opcionalmente un paso de diálisis al extracto, para eliminar las moléculas pequeñas que tienen un peso molecular inferior, por ejemplo, a 10 kDa. El extracto obtenido después del primer paso es adecuado para ser utilizado para modular el sistema inmunitario. Opcionalmente, los compuestos coloreados pueden eliminarse mediante el tratamiento del extracto con carbón activo, para absorber los compuestos coloreados.

15 [0071] Un paso de proceso adicional opcional es añadir al extracto acuoso del paso d) un volumen de etanol hasta una concentración final en el volumen combinado del 40 % (u opcionalmente una cantidad mayor que el 70 %). Después de reposar a aproximadamente 4°C, se puede aislar un precipitado que contiene el polisacárido de interés. Este aislamiento se puede hacer de varias maneras, p. ej., centrifugación, filtración, decantación y posterior secado produciendo un polvo que podría ser sometido a métodos de purificación adicionales.

20 [0072] El preparado obtenido a partir del método de la invención contiene preferiblemente entre un 0,5 % y un 99 % de polisacárido en peso del preparado, más preferiblemente entre un 1 % y un 95 % en peso del preparado.

25 [0073] El polisacárido de interés, que se ha enriquecido en el extracto obtenido al realizar el método de acuerdo con la invención, tiene un esqueleto que comprende núcleos de ramnogalacturonano-I y opcionalmente tramos de ácido homogalacturónico alfa (1,4) enlazados. La proporción molar de residuos de ácido galacturonilo respecto a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 30: 1 a 1: 1. Si esta proporción es 1: 1, entonces el polisacárido contiene solo un núcleo RG-I en el que los pares de ácido galacturónico y ramnosa están presentes como se ha descrito anteriormente. Si la proporción es mayor que 1: 1, entonces el polisacárido contiene además del núcleo RG-I tramos de ácido homogalacturónico alfa (1,4) enlazados. Estos tramos pueden ser núcleos de ácido oligogalacturónico alfa (1,4) enlazado o de ácido poligalacturónico alfa (1,4) enlazado. Se considera que el ácido poligalacturónico es (parte de) un polímero de al menos 10 residuos de ácido galacturonilo enlazados entre sí; se considera que el ácido oligogalacturónico es (parte de) una molécula de 2 a 10 residuos de ácido galacturonilo unidos entre sí. El polisacárido puede comprender núcleos de ramnogalacturonano-I y tramos de ácido homogalacturónico alternantes. El polisacárido puede contener un núcleo RG-I, con uno o dos tramos de ácido homogalacturónico conectados a cada lado del núcleo RG-I. El núcleo RG-I también puede contener en uno de los extremos o en ambos extremos un único residuo de ácido galacturónico. También puede contener más de un núcleo RG-I, y dos de estos núcleos RG-I están conectados entre sí a través de un núcleo de ácido homogalacturónico. El número exacto de núcleos RG-I y núcleos de ácido homogalacturónico, y el tamaño de las cadenas laterales que pueden estar conectadas al núcleo RG-I 35 40 45 determinarán el peso molecular del polisacárido de interés.

[0074] Preferiblemente, la proporción molar de residuos de ácido galacturonilo respecto a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 20: 1 a 1: 1, preferiblemente de 15: 1 a 1: 1, preferiblemente de 12: 1 a 1,5: 1, preferiblemente de 10: 1 a 2: 1. Sobre la base de estas proporciones, es esencial que el polisacárido comprenda un núcleo RG-I, y posiblemente un núcleo de ácido homogalacturónico. El polisacárido tiene un peso molecular entre 70 kDa y 2000 kDa. Preferiblemente, el polisacárido tiene un peso molecular entre 110 kDa y 2000 kDa, preferiblemente entre 110 kDa y 1000 kDa, preferiblemente entre 500 kDa y 1000 kDa.

55 [0075] El polisacárido que está enriquecido en el preparado que se produce usando el método de la invención puede comprender una o más cadenas laterales unidas al núcleo RG-I. Esta(s) cadena(s) lateral(es) comprende(n) preferiblemente un esqueleto de al menos uno o más residuos de arabinosilo alfa (1,5) enlazados y en donde la(s) cadena(s) lateral(es) está(n) sustituida(s) en la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo. Dicha cadena lateral preferida que comprende residuos de arabinosilo alfa (1,5) enlazados puede ser sustancialmente lineal o ramificada. En el caso de que la cadena lateral sea principalmente lineal, la cadena lateral comprende principalmente restos de arabinosilo alfa (1,5) enlazados, que forman el esqueleto de la cadena lateral. En el caso de que dicha cadena lateral sea una cadena lateral ramificada, entonces uno o más residuos de alfa-arabinosilo están enlazados a los 2-OH y/o 3-OH a los arabinanos alfa (1,5) enlazados.

65 [0076] Alternativamente, la cadena o cadenas laterales comprenden preferiblemente un esqueleto de al menos uno o más residuos de galactosilo beta (1,4) enlazados y en donde dicha cadena o cadenas laterales están sustituidas en la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo. Si el polisacárido preferido según la invención

comprende una cadena lateral que comprende uno o más residuos de galactano beta (1,4) enlazados, entonces la cadena lateral es principalmente una cadena lineal no sustituida. Preferiblemente otros galactanos como galactano beta (1,3) enlazado y/o galactano beta (1,6) enlazado están ausentes, o al menos sustancialmente ausentes, lo que significa que preferiblemente menos del 10 % molar de residuos de galactano que están presentes en la cadena lateral son residuos de galactano beta (1,3) enlazados o beta (1,6) enlazados, preferiblemente menos del 5 % molar, preferiblemente menos del 2 % molar, preferiblemente menos del 1 % molar.

[0077] El polisacárido también puede comprender cadenas laterales que comprenden un esqueleto de al menos uno o más residuos de arabinosilo alfa (1,5) enlazados y en donde la cadena o cadenas laterales están sustituidas en la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo, así como las cadenas laterales que comprenden un esqueleto de al menos uno o más residuos de galactosilo beta (1,4) enlazados y en donde la cadena o cadenas laterales están sustituidas en la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo.

[0078] Las cadenas laterales preferidas de los residuos de arabinosilo alfa (1,5) enlazados y/o de galactosilo beta (1,4) enlazados pueden tener diversas longitudes. El peso molecular preferido de la cadena lateral preferida que comprende un residuo de arabinosilo alfa (1,5) enlazado o residuos de galactosilo beta (1,4) enlazados puede expresarse como un número relativo: la relación molar entre el número de residuos de arabinosilo o galactosilo y el número de residuos de ramnosilo en el núcleo RG-I. Preferiblemente, la relación molar de residuos de arabinosilo respecto a residuos de ramnosilo es como máximo de 50: 1, y/o la relación molar de residuos de galactosilo respecto a residuos de ramnosilo es como máximo de 50: 1. Preferiblemente, la relación molar es menor que esta relación, preferiblemente la relación molar de restos de arabinosilo respecto a residuos de ramnosilo es como máximo 20: 1, preferiblemente como máximo 10: 1, preferiblemente como máximo 5: 1, preferiblemente como máximo 1: 2; y/o la relación molar de residuos de galactosilo respecto a residuos de ramnosilo es como máximo de 20: 1, preferiblemente como máximo 10: 1, preferiblemente como máximo 5: 1, preferiblemente como máximo 1: 2.

[0079] Si hay cadenas laterales presentes que comprenden los monómeros de arabinosilo, la longitud de las cadenas laterales (expresadas como número de unidades monoméricas) está preferiblemente entre 1 y 100 unidades monoméricas, más preferiblemente entre 1 y 50 unidades, incluso más preferiblemente entre 1 y 30 unidades.

[0080] Si hay cadenas laterales presentes que comprenden los monómeros de galactosilo, la longitud de las cadenas laterales (expresadas como número de unidades monoméricas) está preferiblemente entre 1 y 100 unidades monoméricas, más preferiblemente entre 1 y 50 unidades, incluso más preferiblemente entre 1 y 30 unidades.

[0081] Si el polisacárido según la invención comprende cadenas laterales que están sustituidas en la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo del núcleo de ramnogalacturonano-I, entonces preferiblemente como máximo el 5 % de las cadenas laterales son cadenas laterales de arabinogalactano, más preferiblemente como máximo el 1 % de las cadenas laterales son cadenas laterales de arabinogalactano. Esto significa que preferiblemente el polisacárido según la invención está sustancialmente libre de cadenas laterales de arabinogalactano, más preferiblemente libre de cadenas laterales de arabinogalactano. Las cadenas laterales de arabinogalactano son cadenas laterales que comprenden residuos arabinosilo y galactosilo. El arabinogalactano-I y el arabinogalactano-II se han descrito anteriormente.

[0082] Si el núcleo RG-I del polisacárido de la invención comprende cadenas laterales, entonces al menos un 20 % en moles de los residuos de ramnosilo está sustituido en la posición 4-OH, preferiblemente al menos un 30 % molar, preferiblemente al menos un 40 % molar, preferiblemente al menos un 45 % molar, y preferiblemente como máximo un 90 % molar, preferiblemente como máximo 80 % molar.

[0083] En otra realización preferida, el polisacárido que está enriquecido en el extracto que se obtiene usando el método de la invención tiene un núcleo RG-I que está sustancialmente libre de cadenas laterales que comprende una cadena principal de al menos uno o más residuos de arabinosilo alfa (1,5) enlazados y/o en donde el núcleo de ramnogalacturonano-I está sustancialmente libre de cadenas laterales que comprenden un esqueleto de al menos uno o más residuos de galactosilo alfa (1,5) enlazados.

[0084] En el contexto de la presente invención, la frase «el núcleo de ramnogalacturonano-I está sustancialmente libre de» debe entenderse como que el esqueleto es una molécula recta sin largas cadenas laterales; sin embargo, residuos pequeños de monómeros de azúcar (como arabinosa y/o galactosa) todavía pueden unirse al residuo ramnosilo del núcleo RG-I. Estos residuos pueden ser salientes que pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de monómeros de arabinosilo o galactosilo. El número de estos salientes por núcleo RG-I preferiblemente es pequeño, lo que significa menos de 30 salientes por núcleo RG-I, preferiblemente menos de 15, preferiblemente menos de 5. Por lo tanto, la frase «el núcleo de ramnogalacturonano-I está sustancialmente libre de» puede entenderse que significa que la relación molar de los residuos de arabinosilo respecto a residuos de ramnosilo es como máximo 1:10, preferiblemente como máximo

1:20; y la relación molar de residuos de galactosilo respecto a restos ramnosilo es como máximo 1:10, preferiblemente como máximo 1:20.

[0085] Preferiblemente, en general, el polisacárido según la invención tiene un efecto pequeño, si es que existe, sobre la viscosidad o el espesamiento de las composiciones líquidas cuando se disuelve, en comparación con las pectinas estándar. Al aumentar el peso molecular, el efecto espesante aumenta preferiblemente por unidad de peso, sin embargo, este efecto espesante preferiblemente es todavía pequeño. Preferiblemente, el efecto espesante depende del grado de ramificación de las posibles cadenas laterales y/o la longitud promedio de las cadenas laterales del núcleo RG-I: al aumentar la ramificación y/o aumentar la longitud promedio de las cadenas laterales, el efecto espesante se reduce.

[0086] El polisacárido según la invención comprende residuos de los monómeros de ramnosa, ácido galacturónico, y si el polímero comprende una o más cadenas laterales, entonces el polisacárido también puede contener residuos de arabinosa y/o galactosa. Además, el polisacárido puede contener cantidades menores de residuos de los monómeros fucosa, glucosa, ácido glucurónico, xilosa y/o ácido urónico. Estos monómeros pueden, por ejemplo, terminar cadenas laterales, si están presentes. En una realización preferida, la invención se refiere a polisacáridos que comprenden xilosa.

[0087] Los métodos para determinar las estructuras de los polisacáridos de la presente invención son conocidos por los expertos. Estos métodos incluyen análisis usando ^1H y ^{13}C RMN.

[0088] Con el fin de verificar el éxito del aislamiento de polisacáridos, se puede determinar un contenido global de carbohidratos usando el método de Dubois (Dubois, Analytical Chemistry, vol. 28, 1956, p. 350-356) Puede obtenerse un primer conocimiento aproximado del éxito de la eliminación de oligosacáridos pequeños mediante el grado de polimerización (valor GP) promedio que se determina comparando el resultado del análisis sobre grupos finales reductores de carbohidratos (método DNSA) con el contenido total de carbohidratos determinado por el Método Dubois. La eliminación satisfactoria de oligosacáridos pequeños (por ejemplo, mono y disacáridos) daría un alto valor medio de GP (por ejemplo, al menos mayor de 2). Una forma más precisa es determinar la distribución del peso molecular del extracto enriquecido por cromatografía de exclusión por tamaño.

[0089] La purificación opcional del extracto acuoso en el paso e) implica preferiblemente dos pasos de purificación adicionales: primero una separación de compuestos ácidos en el extracto de compuestos no ácidos; y un segundo paso opcional para separar compuestos ácidos en fracciones que tienen diferentes pesos moleculares, para obtener el polisacárido de interés que tiene un peso molecular de al menos 50 kDa, preferiblemente al menos 70 kDa, y como máximo 2000 kDa. En un primer paso de purificación opcional, la fracción ácida se separa de los compuestos no ácidos. El polisacárido según la invención contiene residuos de ácido galacturonilo en el núcleo RG-I, y estos residuos hacen que el polisacárido según la invención sea ácido. La fracción ácida se puede separar de la fracción no ácida usando intercambio iónico. La fracción no ácida puede contener, por ejemplo, polisacáridos neutros tales como almidón. A continuación, la fracción ácida se separa en compuestos que tienen diferentes pesos moleculares, por ejemplo mediante filtración en gel. El valor de corte de la separación en el peso molecular es de 70 kDa, lo que significa que solo se retienen las moléculas que tienen un peso molecular de al menos 70 kDa. Preferiblemente, el corte está en un peso molecular de al menos 110 kDa, preferiblemente con un máximo de 2000 kDa. El material resultante es el polisacárido de acuerdo con el primer aspecto de la invención. También se pueden hacer fracciones, por ejemplo, una fracción de compuestos que tienen un peso molecular entre 70 y 110 kDa, y de más de 110 kDa. Las condiciones requeridas para el intercambio iónico y la filtración en gel pueden ser determinadas por la persona experta.

[0090] Preferiblemente, para intercambio iónico se usan materiales de intercambio aniónico como fase estacionaria tales como resinas básicas fuertes, p. ej., Amberlite, Dowex y Mitsubishi (DIAION), ya sea como geles o como perlas, o alternativamente como intercambiador de iones básico débil como DEAE-sepharose o WK10/WK40 de DIAION, también como perlas o geles. Mediante la aplicación de un gradiente de concentración de pH, tampón (Tris, fosfato) o sal (NaCl), la pectina ácida se separa de los polisacáridos neutros. Apropiadamente, primero se lava una fracción neutra y la fracción ácida subsiguiente se recoge, se concentra y se desalifica, p. ej., por ultrafiltración a través de una membrana de 10 kDa o diálisis antes de GPC. También se puede usar el fraccionamiento por exclusión iónica, p. ej., mediante UBK530 (ex Mitsubishi); en la elución con agua primero se recogen los componentes ácidos desprotonados y posteriormente los (poli) sacáridos neutros. Preferiblemente, la filtración en gel usa materiales de exclusión de tamaño como fase estacionaria, p. ej., Sephacryl 100-HR y 200-HR, Sephadex G-100, Superdex 200. De manera adecuada, la muestra se eluye isocráticamente en un tampón de fuerza entre 0,01 y 0,2 M. La columna de exclusión de tamaño se puede calibrar mediante patrones de Pm usando proteínas o polisacáridos. Para esto se prefiere utilizar un conjunto de dextranos.

[0091] La cantidad total de polisacáridos y la composición de monosacáridos de los extractos se puede determinar mediante cualquier técnica analítica conocida por los expertos. Tanto para el intercambio iónico como para la filtración en gel, el método de detección preferido es monitorizando la absorbancia UV entre 210 y 220 nm ya que los grupos carboxilato de los compuestos muestran absorbancia en esta región espectral. Otros

métodos de detección podrían ser mediante índice de refracción (IR), detección amperométrica pulsada (PAD), espectroscopía de masas o análisis fuera de línea de las fracciones mediante reacciones específicas de detección de sacáridos como el método de ácido sulfúrico/fenólico descrito por Dubois.

5 [0092] Finalmente, el extracto purificado obtenido se puede secar usando cualquier método adecuado, tal como liofilización, secado en bandeja, secado por evaporación rotatoria o secado por pulverización.

10 [0093] Un método preferido para obtener los polisacáridos según la invención es el siguiente. Una muestra de un material vegetal seco o fresco, p. ej., manzana, zanahoria o pimiento, se lava dos veces con etanol al 85 % en agua durante 2,5 horas a 80 °C y una vez con etanol al 85 % en agua durante 1,5 horas a 80 °C. Después de decantar el etanol, los gránulos se secan. Los polisacáridos de interés se extraen del gránulo añadiendo agua desmineralizada, bicarbonato sódico a un pH entre 7,5 y 8 e hirviendo (a aproximadamente 100 °C a presión atmosférica) durante 30 a 90 minutos. Después de la separación del material dispersado de la fase acuosa, p. ej., mediante centrifugación, se vuelve a suspender un sedimento en agua desmineralizada que contiene bicarbonato sódico a un pH entre 7,5 y 8, y se hierve nuevamente entre 30 y 90 minutos. Los sobrenadantes de la primera y segunda extracciones se recogen, liofilizan y almacenan a temperatura ambiente.

20 [0094] En una etapa posterior preferida, los extractos liofilizados enriquecidos en polisacárido se suspenden a una concentración del 2 % (p/ p) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se filtran y esterilizan a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Como los polisacáridos según la invención son solubles en agua, el filtrado contiene el polisacárido según la invención.

25 [0095] Preferiblemente, la separación efectiva se realiza usando la fase estacionaria de intercambio iónico débil DEAE-sepharose usando un tampón Tris-HCl pH 7,5 y aplicando un gradiente de sal. La fracción ácida se desala por ultrafiltración a través de una membrana de 10 kDa antes de GPC y se liofiliza. Posteriormente, la fracción se vuelve a disolver en tampón volátil (por ejemplo, carbonato de amonio 0,1 M) y se aplica la distribución del peso molecular por cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200 usando un flujo de 5 ml/min. Detección mediante absorbancia a 21 nm de UV y columna Superdex calibrada por estándares de dextrano Pm.

30 [0096] La opción más preferida para algunos cultivos, como las zanahorias y las manzanas, es omitir el primer procedimiento de cromatografía en columna y realizar solo la cromatografía de exclusión por tamaño (distribución del peso molecular) mediante filtración en gel. El extracto enriquecido en polisacárido se disuelve en tampón volátil (por ejemplo, carbonato de amonio 0,1 M) y se aplica la distribución del peso molecular por cromatografía de exclusión molecular en Superdex 200 usando un flujo de 5 ml/min. Detección mediante absorbancia a 21 nm de UV y columna Superdex calibrada por estándares de dextrano Pm.

40 [0097] A medida que la naturaleza de la materia prima a partir de la cual varían los polisacáridos según la invención, las condiciones en las que pueden realizarse los pasos de extracción opcionales también pueden variar. Por ejemplo, las cantidades de disolvente y agua por gramo de un material de partida dado pueden ser diferentes para diversos materiales vegetales. Estas modificaciones están al alcance de los expertos.

45 [0098] El peso molecular de los polisacáridos obtenidos es relativamente alto (> 70 kDa), lo cual se requiere para obtener una respuesta inmunomoduladora positiva. Las fracciones aisladas usando el procedimiento de bicarbonato mostraron una actividad inmunomoduladora *in vitro* similar o mejor en comparación con las condiciones ácidas neutras. Se puede obtener un equilibrio, por un lado, evitando la beta eliminación para obtener polisacáridos relativamente grandes y, por otro lado, mediante los polisacáridos que contienen tanto un núcleo RG-I como tramos de ácido poligalacturónico en la cantidad correcta. Parte de las grandes cadenas de esqueleto en los polisacáridos pécticos se degradan debido al proceso de beta eliminación y esto puede usarse para influir en las propiedades físicas (estructuración) de los polisacáridos obtenidos.

50 [0099] Las ventajas de la extracción de bicarbonato sobre las extracciones acuosas y ácidas como las realizadas en la técnica anterior son que el rendimiento es mayor, y que la proporción de polisacáridos del extracto total con un peso molecular superior a 70 kDa o incluso superior a 110 kDa es mayor. Además, la actividad inmunomoduladora de los polisacáridos obtenidos es al menos tan alta o incluso mayor que la de los polisacáridos usando los métodos de extracción de la técnica anterior. Por lo tanto, el método tiene la ventaja de que el rendimiento de las extracciones, y por lo tanto la eficacia, es mayor que el de los métodos de la técnica anterior y, por consiguiente, usar el método de la invención es ventajoso en comparación con los métodos de la técnica anterior.

60 [0100] El preparado que se puede obtener mediante el método descrito anteriormente contiene preferiblemente al menos un 50 % en peso de materia seca de una mezcla de polisacáridos pécticos, que incluye al menos un 20 %, calculado en peso de los polisacáridos pécticos, de pectinas RG-I que tienen un peso molecular de más de 40 kDa. Dicha mezcla de polisacáridos pécticos se caracteriza por:

- un grado de metilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %, preferiblemente de no más del 10 %;
- un grado de acetilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %, preferiblemente de no más del 15 %;

5 en el que el preparado no forma un gel cuando se diluye con una solución acuosa de bicarbonato de amonio 50 mM hasta un contenido de sólidos de 2.5 % en peso.

[0101] El preparado tiene preferiblemente un contenido de materia seca de al menos un 40 % en peso, incluso más preferiblemente de al menos un 80 % en peso. Según una realización preferida, el preparado es un material seco, p. ej., un polvo, que tiene una actividad de agua de menos de 0,6, preferiblemente de menos de 0,5.

[0102] Los polisacáridos pécticos representan típicamente al menos un 60 %, más preferiblemente al menos un 70 % en peso de la materia seca del preparado. Las pectinas RG-I que tienen un peso molecular de más de 70-2000 kDa preferiblemente representan al menos un 20 %, más preferiblemente al menos un 35 % y en el caso más preferible un 50-99 %, calculado en peso de los polisacáridos pécticos.

[0103] El presente método ofrece la ventaja de que produce un preparado que es en gran medida soluble en agua de pH neutro. Por consiguiente, según una realización preferida, al menos un 90 % en peso, más preferiblemente un 95 % en peso del preparado se disuelve cuando se añaden 25 g del preparado a 1 l de agua destilada que está a una temperatura de 20°C.

[0104] La mezcla de polisacáridos pécticos contenida en el preparado de la presente invención contiene una cantidad relativamente pequeña de restos de galacturonilo metilados y/o acetilados. Preferiblemente, menos de un 30 %, más preferiblemente menos de un 20 % y en el caso más preferible menos de un 15 % de los residuos de ácido galacturonilo en la mezcla de polisacáridos pécticos está metilado o acetilado.

[0105] Una fracción sustancial de residuos de ramnosilo en el esqueleto de las pectinas RG-1 en el preparado puede estar sustituido en la posición 4-OH con una cadena lateral. Típicamente, un 20-80 %, más preferiblemente un 22-70 % y en el caso más preferible un 25-60 % de los residuos de ramnosa contenidos en el preparado están sustituidos en la posición 4-OH.

[0106] El preparado de la presente invención contiene típicamente no más de una cantidad limitada de polisacáridos con largas cadenas laterales que contienen residuos de arabinosilo alfa (1,5) enlazados. Por consiguiente, en una realización preferida, el preparado tiene una proporción [Ara]/[Rha] de menos de 20. Donde [Ara] representa la concentración molar de residuos de arabinosilo alfa (1,5) enlazados y [Rha] representa la concentración molar de residuos de ramnosilo.

[0107] El preparado típicamente tiene una proporción [Gal]/[Rha] de 0 a 10, donde [Gal] representa la concentración molar de residuos de galactano beta (1,4) enlazados.

[0108] La proporción [GalA]/[Rha] típicamente está en el intervalo de 3-20, donde [GalA] representa la concentración molar del residuo de ácido galacturonilo alfa (1,4) enlazado. Más preferiblemente, dicha proporción está en el rango de 4-15.

[0109] El preparado de la presente invención preferiblemente es un extracto obtenido de una planta seleccionada entre manzana, zanahoria, pimiento, tomate, cebolla, ginseng, hojas de té y combinaciones de las mismas.

[0110] De acuerdo con una realización particularmente preferida, el preparado se puede obtener mediante el método descrito anteriormente.

[0111] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un preparado para su uso en el tratamiento o prevención del resfriado o la gripe que tiene un contenido de materia seca de al menos un 20 % en peso, con un contenido en dicho preparado de al menos un 50 % en peso de materia seca de una mezcla de polisacáridos pécticos, que incluye al menos un 20 % calculado en peso de los polisacáridos pécticos, de pectinas de ramnogalacturonano I que tienen un peso molecular de más de 40 kDa. Dicha mezcla se caracteriza por:

- un grado de metilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %;
- un grado de acetilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %;

60 en el que el preparado no forma un gel cuando se diluye con una solución acuosa de bicarbonato de amonio 50 mM hasta un contenido de sólidos de 2.5 % en peso.

[0112] Preferiblemente, el preparado es adecuado para tratar o prevenir el resfriado o la gripe en animales o humanos, más preferiblemente en humanos. Un método adecuado para la ingesta de los polisacáridos o de dicho preparado según la invención puede ser la ingesta oral, por ejemplo, mediante la ingesta de un producto comestible o composición farmacéutica. Alternativamente, el polisacárido o dicho preparado se pueden tomar como ingredientes en una composición farmacéutica común en el campo. Pueden existir diferencias entre los efectos inmunomoduladores entre diferentes especies animales, incluidos los humanos. Los efectos inmunomoduladores se han establecido utilizando células inmunitarias humanas y, por lo tanto, son más relevantes para la inmunomodulación en humanos y mamíferos relacionados.

[0113] La respuesta inmunitaria fisiológica de un consumidor que toma el preparado para prevenir o tratar el resfriado o la gripe, puede determinarse mediante análisis *ex vivo* de la actividad de las células fagocíticas y las células asesinas naturales (NK) de ese consumidor. La respuesta inmunomoduladora tras la ingestión de los polisacáridos según la invención generalmente se produce en unas pocas horas, p. ej., 2 o 3 horas. El efecto puede durar alrededor de 24 horas o más. De manera adecuada, tras el consumo continuado de productos que contienen el polisacárido según la invención, por ejemplo, una o dos veces al día en días consecutivos, la respuesta inmune puede ser estimulada y prolongada, y la defensa natural del consumidor contra la gripe o el resfriado puede reforzarse.

[0114] La dosis diaria de un polisacárido que se enriquece en el preparado obtenido a partir del método de la invención, para obtener el efecto modulador de la respuesta inmunitaria preferida, preferiblemente está entre 1 y 10 000 miligramos por día. Más preferiblemente, la cantidad de polisacárido dosificado está entre 5 y 10 000 miligramos por día, preferiblemente entre 10 y 10 000 miligramos por día, incluso más preferiblemente entre 10 y 5 000 miligramos por día. Más preferiblemente, la cantidad dosificada está entre 10 y 1000 miligramos por día y más preferiblemente entre 10 y 500 miligramos por día. Esta cantidad se puede dosificar como una sola dosis por día, o como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 dosis por día. Preferiblemente, la cantidad adecuada de polisacáridos según la invención se administra en 1 o 2 dosis por día.

[0115] El preparado se puede usar en el tratamiento de un paciente para recuperarse de una enfermedad como el resfriado común, y también por un consumidor para evitar enfermarse o contraer un resfriado. El preparado para el uso en el tratamiento o la prevención del resfriado o la gripe se debe explicar como término amplio, y abarca, entre otros, medicamentos recetados, medicamentos sin receta, medicamentos de venta libre, suplementos dietéticos, alimentos dietéticos, alimentos clínicos, productos comestibles, pastillas, cápsulas, píldoras y productos alimenticios tales como bebidas o cualquier otro producto alimenticio adecuado, y cualquier otra composición que sea comúnmente conocida por los expertos. Alternativamente, dicho preparado puede ser una pomada o una sustancia inyectable o una sustancia inhalable, tal como un aerosol nasal.

[0116] Preferiblemente, el preparado es para uso en terapia o tratamiento. La terapia o el tratamiento pueden implicar no solo el tratamiento de una persona en el sentido clásico, es decir, el tratamiento de un paciente para recuperarse de una enfermedad. El tratamiento también incluye profilaxis, lo que significa evitar que un consumidor se enferme, o contraiga un resfriado o la gripe. Las personas que padecen un resfriado o gripe pueden recibir tratamiento para recuperarse antes que sin tratamiento, y/o de esta manera las personas pueden disminuir la probabilidad de contraer un resfriado o la gripe. La presente invención proporciona un método para el tratamiento de un resfriado o la gripe o la prevención contra un resfriado o la gripe mediante la administración del preparado según la invención.

[0117] La dosificación preferida del polisacárido ya ha sido indicada.

[0118] El uso del preparado para tratar o prevenir el resfriado o la gripe también puede incluir el uso veterinario, modulando así la respuesta inmunitaria en animales, preferiblemente mamíferos.

[0119] Entre el público en general, existe el deseo de aumentar la defensa natural del cuerpo humano contra los intrusos que pueden causar un resfriado o la gripe. Los preparados según la invención están indicados preferiblemente para la protección a) del tracto respiratorio, el oído interno y medio contra, p. ej., infecciones localizadas y/o respiratorias o del oído medio y/o b) del tracto gastrointestinal, contra infecciones del tracto gastrointestinal. Las infecciones generalmente son causadas por virus o bacterias. Esto es especialmente relevante para sujetos con una defensa inmunitaria subóptima contra tales patógenos, por ejemplo, debido a la función dañada de las células NK o la producción de interferones antivirales. El deterioro de estas funciones se ha asociado con una mayor susceptibilidad a tales infecciones comunes y ha sido bien documentada en ancianos así como en sujetos que experimentan estrés fisiológico (por ejemplo, ejercicio extenuante, trabajo por turnos, privación del sueño) o psicológico (por ejemplo, estrés por exámenes, preparación para boda, pérdida de un familiar, cuidado de un familiar con enfermedad crónica).

[0120] La invención es especialmente adecuada para tratar o prevenir el resfriado o la gripe potenciando la respuesta inmunitaria a patógenos o antígenos en sujetos con una capacidad de respuesta inmunitaria (parcialmente) inferior a la óptima debido a, p. ej., el deterioro de la función inmunitaria relacionado con la edad,

la dieta o el estilo de vida. La aplicación de las estructuras como las descritas en la presente invención puede usarse para ayudar a su sistema inmune a generar una respuesta adecuada y así aumentar la resistencia del sujeto a infecciones comunes, mejorar su respuesta a una vacuna y en otras aplicaciones reducir afecciones inflamatorias y/o alérgicas. .

5

[0121] El preparado de la presente invención se puede usar en el tratamiento para la prevención del resfriado o la gripe como adyuvante para vacunas. La mayoría de las vacunas en uso hoy en día emplean microbios o fragmentos microbianos muertos o atenuados para estimular una respuesta inmune protectora contra el agente infeccioso relacionado. Sin embargo, los problemas asociados con la fabricación de vacunas convencionales han conducido al desarrollo de antígenos sintéticos más definidos usando técnicas químicas y recombinantes. Estos antígenos definidos tienen por sí mismos una potencia e inmunogenicidad más bajas y típicamente necesitan combinarse con un adyuvante para formar una vacuna eficaz. Un adyuvante es un agente que estimula el sistema inmunitario y aumenta la respuesta a un antígeno, sin tener un efecto antigénico específico en sí mismo (M. Singh (ed.), *Vaccine adjuvants and delivery systems*, Wiley-Interscience 2007) Los preparados se pueden combinar con un antígeno específico en una vacuna para aumentar la respuesta inmune contra el antígeno, a fin de mejorar la funcionalidad de la vacuna. Para este uso, el material antigénico de una vacuna se combina con una cantidad de preparado que estimula el inicio de una respuesta inmunitaria adaptativa específica contra el(los) antígeno(s) específico(s) sin inducir respuestas adversas manifiestas. Otros aditivos como los establecidos en el campo pueden agregarse a la vacuna, por ejemplo, para servir como un portador, un depósito o un conservante. El preparado de la presente invención se puede usar en vacunas para uso veterinario o humano y en vacunas para diferentes vías de aplicación que incluyen vacunas que se inyectan, vacunas que se aplican por vía oral o que se aplican por vía nasal.

10

15

20

25

30

[0122] La invención reveló que los materiales obtenidos a partir del método de la invención son altamente activos en la modulación inmunitaria, preferiblemente la estimulación inmune. La invención reveló que los son activos con respecto a las células inmunitarias humanas (especialmente bajo condiciones de fagocitosis o activación de células NK), dependiendo del proceso seleccionado, a concentraciones de 300 microgramos por mililitro o menores, más preferiblemente 100 microgramos por mililitro, más preferiblemente 50 microgramos por mililitro, más preferiblemente 30 microgramos por mililitro, incluso más preferiblemente 10 microgramos por mililitro, incluso más preferiblemente 3,0 microgramos por mililitro, incluso más preferiblemente 1,0 microgramo por mililitro, incluso más preferiblemente 0,3 microgramos por mililitro.

Producto comestible o composición farmacéutica

[0123] La presente invención también proporciona un método para preparar un producto comestible o composición farmacéutica, que comprende incorporar en dicho producto comestible o dicha composición farmacéutica un 0,5-25 % en peso de un preparado, el cual tiene un contenido de materia seca de al menos un 20 % en peso y que contiene al menos un 50 % en peso de materia seca de una mezcla de polisacáridos pécticos, la cual incluye al menos un 20 % calculado en peso de los polisacáridos pécticos, de pectinas de ramogalacturonano I con un peso molecular de más de 40 kDa. Dicha mezcla de polisacáridos pécticos se caracteriza por:

35

40

- un grado de metilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %;
- un grado de acetilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %;

en el que el preparado no forma un gel cuando se diluye con una solución acuosa de bicarbonato de amonio 50 mM hasta un contenido de sólidos de 2.5 % en peso.

45

[0124] La invención proporciona además un producto comestible o una composición farmacéutica que se puede obtener mediante el método mencionado anteriormente.

50

55

[0125] Dependiendo del producto comestible específico o composición farmacéutica, el producto comestible o composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende preferiblemente de un 0,0001 % a un 25 % en peso del presente preparado, más preferiblemente de un 0,0002 % a un 10 % en peso. Preferiblemente, la concentración del preparado en el producto comestible o composición farmacéutica según la invención está entre un 0,5 % y un 10 % en peso, preferiblemente entre un 1 % y un 10 % en peso, más preferiblemente entre un 2 % y un 10 % en peso, más preferiblemente entre un 3 % y un 10 % en peso, más preferiblemente entre un 4 % y un 10 % en peso y en el caso más preferido entre un 5 % y un 9 % en peso. Los polisacáridos que están enriquecidos en el preparado de acuerdo con la invención pueden estar presentes en el producto comestible o composición farmacéutica en su forma nativa, es decir, como un constituyente de un material vegetal que se usa en el producto comestible o la composición farmacéutica. Sin embargo, el producto comestible o composición farmacéutica también se enriquece con el preparado según la invención. Esto significa que el polisacárido posiblemente no solo esté presente en su forma nativa como constituyente de un material vegetal, sino que

además también se agrega el polisacárido como parte del preparado de la invención como un ingrediente para el producto comestible o composición farmacéutica.

5 [0126] El producto comestible según la presente invención puede tomar cualquier forma física. En particular, puede ser un producto alimenticio, una bebida, un producto alimenticio dietético o un producto alimenticio clínico. También puede ser un suplemento dietético, en forma de una bebida, una pastilla, una cápsula o cualquier otra forma adecuada para un suplemento dietético. Los productos comestibles preferidos para la incorporación del preparado de la invención están en forma de líquido, tal como una sopa o una bebida, un producto para untar, un aderezo, un postre o un pan. Si el producto comestible preferido es una sopa, puede ser una sopa líquida o una
10 sopa seca a la que el consumidor puede agregar agua caliente. El producto comestible puede estar en forma líquida o untable, puede ser un producto sólido que se puede tomar con cuchara o un sólido suave, o puede ser un suplemento alimenticio. Preferiblemente, el producto comestible es un producto líquido. El producto comestible puede adecuadamente tomar la forma de, p. ej., una sopa, una bebida, un aderezo, un aderezo, un postre, un pan. Más preferiblemente, el producto comestible es una bebida, un postre o un producto para untar. Más preferiblemente, el producto comestible es una bebida o un producto para untar, especialmente un producto para untar en forma de una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. El término «producto para untar» como se usa en el presente documento abarca productos untables tales como margarina, margarina light, productos basados en queso untables, queso procesado, productos lácteos para untar y productos lácteos alternativos para untar. Los productos para untar tal como se usan en el presente documento (emulsiones de aceite en agua o agua en aceite) pueden tener una concentración de aceite y/o grasa aproximadamente de entre un 5 % y un 85 % en peso, preferiblemente entre un 10 % y un 80 % en peso, más preferiblemente entre un 20 % y un 70 % en peso. Preferiblemente, el aceite y/o la grasa son de origen vegetal (tal como, entre otras, aceite de girasol, aceite de palma, aceite de colza); también se pueden incluir en la composición aceites y/o grasas de origen no vegetal (tales como, entre otras, grasas lácteas, aceite de pescado).

25 [0127] Más preferiblemente, el producto es una bebida. Dicha bebida contiene típicamente al menos un 60 % en peso de agua y de un 0 a un 20 % en peso de aceite o grasa dispersados. Preferiblemente, tal bebida contiene al menos un 70% en peso de agua y de un 0 a un 10% en peso de aceite o grasa dispersados.

30 [0128] Un aderezo en el contexto de la presente invención generalmente es una emulsión de aceite en agua, que puede contener entre un 0,1 y un 85 % de aceite y/o grasa. La mayonesa es un ejemplo de un aderezo dentro del contexto de la presente invención. Los aderezos tal como se usan en el presente documento (emulsiones de aceite en agua) pueden tener una concentración de aceite y/o grasa aproximadamente de entre un 50,1 % y un 85 % en peso, preferiblemente entre un 5% y un 80 % en peso, más preferiblemente entre un
35 10% y un 70 % en peso. Preferiblemente, el aceite y/o la grasa son de origen vegetal (tal como, entre otras, aceite de girasol, aceite de palma, aceite de colza); también se pueden incluir en la composición aceites y/o grasas de origen no vegetal (tales como, entre otras, grasas lácteas, aceite de pescado).

40 [0129] Una composición farmacéutica en el contexto de la presente invención incluye, entre otros, medicamentos con receta, medicamentos sin receta, medicamentos de venta libre, suplementos dietéticos, alimentos dietéticos, alimentos clínicos, productos comestibles, pastillas, cápsulas, píldoras y productos alimenticios tales como bebidas o cualquier otro producto alimenticio adecuado, y cualquier otra composición comúnmente conocida por los expertos. Alternativamente, el medicamento puede ser una pomada o una sustancia inyectable o una sustancia inhalable, tal como un aerosol nasal. En el caso de una composición
45 farmacéutica, la composición puede contener más de un 25 % en peso del preparado de la invención, preferiblemente más de un 30 % en peso, preferiblemente más de un 40 % en peso, o preferiblemente más de un 50 % en peso, o preferiblemente incluso más del 75 % en peso.

50 [0130] Los productos comestibles adecuados para esta invención pueden ser cualquier producto alimenticio, incluidas bebidas, productos alimenticios dietéticos y productos alimenticios clínicos. La concentración del preparado de la invención debe ser tal que la modulación de la respuesta inmunitaria se produzca después del consumo del producto alimenticio en una cantidad normal. Una cantidad normal es la cantidad que consume un consumidor promedio de dicho producto alimenticio en un momento de consumo específico.

55 [0131] La dosis diaria preferida del preparado de la invención se ha indicado anteriormente, y también es aplicable a este aspecto de la invención. La concentración de preparado requerida en el producto comestible depende del producto comestible específico y de qué cantidad de dicho producto se consume habitualmente. Preferiblemente, los polisacáridos según la invención se incorporan a productos comestibles que habitualmente se consumen en una cantidad predefinida. Por ejemplo, una barra de cereal generalmente se empaqueta por
60 barras individuales, y también se consume por barras individuales. Por lo general, el peso de dicha barra es de entre 40 y 80 gramos. De manera similar, las mini bebidas lácteas se consumen en botellas pequeñas, que tienen un volumen de aproximadamente 100 mililitros.

65 [0132] Al incorporar el preparado a tales productos alimenticios, en principio la ingesta diaria de los polisacáridos puede controlarse. Preferiblemente, los polisacáridos se administran al consumidor en 1 o 2 dosis por día. El

experto en la materia puede calcular la concentración requerida del preparado en una cantidad unitaria del producto comestible, preferiblemente un producto alimenticio.

[0133] Una cantidad unitaria de un producto alimenticio es una cantidad de un producto alimenticio que generalmente se consume como una sola ración. La cantidad unitaria o el tamaño de la ración de dichos productos alimenticios depende del producto específico. Algunos ejemplos no limitantes de tamaños de porción típicos son: leche, yogur: 200 mL

queso natural: 43 gramos
 queso procesado: 57 gramos
 zumo de frutas: 177 ml
 refresco: 200 ml
 pan: 1 rebanada, 35 gramos
 café: 125 ml
 té: 150 ml
 barra de cereal, barra de caramelo: 50 gramos
 chocolate: 30 gramos
 helado: 100 ml
 producto untable: 15 gramos
 sopa: 250 ml
 bebida de cacao: 200 ml

[0134] Una cantidad unitaria de un producto alimenticio en el contexto de la presente invención se puede envasar y vender como una sola porción. Por ejemplo, el helado se puede envasar como unidades individuales, convirtiendo dicha porción individual en una cantidad unitaria en el contexto de la presente invención. El peso o volumen real de dicho producto envasado individualmente puede ser mayor o menor que el indicado anteriormente para un tamaño de porción estándar. Por ejemplo, las bebidas lácteas probióticas se consumen en botellas pequeñas, envasadas individualmente, con un volumen de aproximadamente 100 ml.

[0135] Típicamente, el método para preparar el producto comestible o el producto farmacéutico comprende incorporar en dicho producto comestible o dicho producto farmacéutico un 0,5-25%, más preferiblemente un 1-20 %, incluso más preferiblemente un 2-10 % y en el caso más preferible un 3-9% del preparado. La incorporación del preparado en el producto comestible o el producto farmacéutico típicamente comprende la etapa de mezclar el preparado con al menos uno, preferiblemente dos o más ingredientes comestibles o farmacéuticamente aceptables.

[0136] Los aspectos preferidos descritos en conexión con un aspecto particular de la presente invención también pueden ser aplicables a los otros aspectos de la presente invención, *mutatis mutandis*. Las diversas características y realizaciones de la presente invención, a las que se hace referencia en las secciones individuales a continuación, se aplican, según corresponda, a otras secciones, *mutatis mutandis*. En consecuencia, las características especificadas en una sección se pueden combinar con las características especificadas en otras secciones, según corresponda.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0137]

Figura 1: Efecto inmunomodulador del extracto obtenido del *pimiento* del ejemplo 2; ensayo de células sanguíneas enteras. Concentración de extracto en microgramos por mililitro (eje x) frente a porcentaje de fagocitosis (eje y)

Figura 2: Efecto inmunomodulador del extracto obtenido de la *zanahoria* del ejemplo 2; ensayo de células sanguíneas enteras. Concentración de extracto en microgramos por mililitro (eje x) frente a porcentaje de fagocitosis (eje y)

Figura 3: Efecto inmunomodulador del extracto obtenido de la *manzana* del ejemplo 2; ensayo de células sanguíneas enteras. Concentración de extracto en microgramos por mililitro (eje x) frente a porcentaje de fagocitosis (eje y)

EJEMPLOS

[0138] Los siguientes ejemplos no limitantes describen la extracción y preparación de polisacáridos obtenidos según el método de la invención.

Ejemplo 1: Preparación de extractos vegetales

Materiales y métodos

[0139] Los materiales vegetales utilizados como fuente de los polisacáridos fueron polvos secos:

- pimiento (pimentón, *Capsicum annuum*); Paprika Mild 80-100 (Asta St- Félix Reverte, S.A., Librilla (Murcia), España).
- 5 - Zanahoria (*Daucus carota* subsp. *sativus*); ex. R. Steinicke GmbH, Breitbrunn, Alemania.
- polvo de manzana (*Malus domestica*); ex Mahevi Oy, Polvijärvi, Finlandia.

[0140] A partir de los materiales vegetales, se prepararon los primeros residuos insolubles en alcohol (RIA) mediante lavados de etanol de estos materiales vegetales. Los materiales de RIA se sometieron a un conjunto de experimentos de extracción en agua, bicarbonato sódico o ácido clorhídrico diluido, respectivamente.

[0141] Cada material vegetal se extrajo primero con etanol acuoso al 80 % dos veces (80 °C, aproximadamente 2 h) y luego durante la noche a temperatura ambiente; usando cada vez un 12,5 % (p/v). El residuo insoluble se secó y este material se denomina «residuo insoluble en alcohol», RIA. Los materiales RIA se usaron en todos los experimentos de extracción que se describen aquí. Las extracciones se realizaron con la solución definida durante el tiempo especificado, y la fase líquida se recuperó después de la centrifugación.

[0142] Todos los extractos preparados en esta serie de muestras se dializaron usando un tubo de diálisis MWCO 6000-8000 para ayudar a la comparación entre tratamientos que llevan diferentes sales. Las muestras (5 g de residuo insoluble) se dializaron dos veces contra aproximadamente 1 litro de bicarbonato de amonio 50 mM durante aprox. 3-4 h y luego frente a bicarbonato de amonio 50 mM fresco durante la noche, y luego se liofilizó.

[0143] Además del rendimiento, los extractos también se analizaron mediante GPC en la columna Superdex200 para obtener su perfil de peso molecular. Además, los extractos se sometieron a análisis de RMN de protones, y el patrón de sustitución y la composición de cada extracto se dedujeron a partir de los espectros.

[0144] El % en masa de pectina en las fracciones se determinó mediante cromatografía de filtración en gel en columnas Superdex200 y se encontró que la fracción > 70 kD era principalmente RG-1 según lo confirmado mediante ¹H RMN e hidrólisis de monosacáridos/HPLC. El % en masa de pectina podría corregirse para la presencia de monosacáridos de tipo no pectínico, como la glucosa, que es indicativo de la presencia de almidón.

30 *Separación de polisacáridos por peso molecular*

[0145] Los polisacáridos obtenidos por extracción se separan por cromatografía de filtración en gel (GPC) en una columna de Superdex 200 (1x30 cm, GE Healthcare). Las muestras de polisacáridos se disuelven en bicarbonato de amonio 0,1 M y se procesaron alícuotas de 5 a 15 mg en la columna en el mismo tampón. Los componentes de elución se detectan mediante absorción a 214 nm.

[0146] Los polisacáridos se agrupan en tres fracciones: P_M > 110 kDa, 70-110 kDa y 40-70 kDa. Los límites de agrupación se determinan por comparación con las posiciones de elución de los estándares de dextrano 40 kDa, 70 kDa y 110 kDa (de GE Healthcare).

Análisis de sustitución y composición de polisacáridos

[0147] La composición de las fracciones de polisacáridos obtenidas a partir del proceso de extracción se determina usando análisis de RMN. Antes del análisis de RMN, se disuelven muestras de polisacáridos secos (1-10 mg) en óxido de deuterio (D₂O) y se secan en una centrifugadora de vacío. Las muestras se disuelven luego en 600 microlitros de D₂O. Los espectros se recogen en un espectrómetro Varian Unity 500 NMR a 296 K y se hace referencia al estándar interno de acetona (2225 ppm).

[0148] Haciendo referencia a la Tabla 3, la Tabla 6 y la Tabla 9, el nivel de sustitución de polisacáridos y la composición molar de las unidades de construcción se analizan usando los datos de RMN de la siguiente manera:

- Nivel de sustitución de ramnoglacturonano

[0149] La proporción de cuatro unidades de ramnosilo sustituidas y unidades no sustituidas se estima integrando la señales divididas de -CH₃ de ramnosa. Los protones de -CH₃ en cuatro unidades de ramnosilo sustituidas resuenan aproximadamente a 1,32 ppm, mientras que los de las unidades de ramnosilo no sustituidas resuenan a 1,25 ppm.

- Proporción molar de galactanos y arabinanos

5 [0150] La cantidad molar de galactanos y arabinanos se analiza integrando la señal H-1 observada de beta-1,4-galactano (4,64 ppm) y las señales H-1 de arabinano (-5 Ara H-1, 5,09 ppm; -3,5 Ara H -1 5,12 ppm; terminal Ara-alfa-1-3 5,15 ppm; terminal Ara-alfa-1-2 5,18 ppm; -2,3,5Ara H-1 5,26 ppm. Estos valores de integración se comparan con las señales integradas de -CH₃ de ramnosa.

- Metilación y acetilación de residuos de ácido galacturónico

10 [0151] Las señales -CH₃ del grupo O-acetilo del ácido galacturónico se encuentran alrededor de 2,07-2,18 ppm, y están integradas ya que no hay señales interferentes presentes en esta área. El nivel de O-acetilación se normaliza al 100 % con 1 grupo acetilo por residuo de ácido galacturónico. El nivel de esterificación metílica del ácido galacturónico se estima a partir de las señales H-4 integradas de ácido galacturónico. La señal H-4 de la unidad de ácido galacturónico esterificado con metilo se encuentra en 4,47 ppm, mientras que la señal H-4 de ácido galacturónico no esterificado está en 4,42 ppm.

- Proporción de ácido poligalacturónico/ramnosa

15 [0152] La proporción de ácido poligalacturónico respecto a la ramnosa se analiza de la siguiente manera: la cantidad total de señales H-4 de ácido galacturónico está integrada entre 4,42 y 4,47 ppm, y la cantidad de ramnosa se obtiene mediante la integración de las señales de -CH₃ (1,25-1,32 ppm). La señal H-4 de la unidad GalA-alfa-1-2 específica de RG-I se encuentra en la misma señal 4,42-4,47, y su porción debe deducirse de la señal H-4 total. Este valor es igual a la cantidad de ramnosa, ya que RG-I es un polímero 1: 1 de Rha y GalA. La señal H-4 restante representa el porcentaje de la señal GalA-alfa-1-4H-4 del tipo de ácido poligalacturónico.

20 - Análisis de monosacáridos (hidrólisis ácida + HPLC)

25 [0153] Las muestras de polisacáridos se disolvieron en ácido trifluoroacético acuoso 0,5 M y se hidrolizaron a 120 °C durante 2 horas. Después, las muestras se neutralizaron con NaOH y se mantuvieron congeladas hasta que se analizaron por cromatografía de intercambio aniónico de alto pH (HPAEC) en el sistema de cromatografía iónica DX600 (Dionex, Sunnyvale, EE. UU.) utilizando detección amperométrica pulsada (PAD). Las muestras se analizaron en dos columnas diferentes, CarboPacMA-1 y CarboPacPA-1 (Dionex, Sunnyvale, EE. UU.) Para obtener un análisis fiable de las especies de monosacáridos notificadas. Los ensayos en la columna MA-1 se llevaron a cabo usando una elución isocrática con NaOH 180 mM. Los ensayos de PA-1 se llevaron a cabo con los siguientes gradientes lineales: minuto 0-5, NaOH 50 mM, minuto 5-10 de NaOH 50 a 100 mM, minuto 10-35 de NaAc 0 a 200 mM en NaOH 100 mM, y minuto 35 -40 de NaAc de 200 a 400 mM en NaOH 100-240 mM.

Métodos de extracción

[0154] Se realizaron las siguientes extracciones de RIA de los materiales vegetales:

- 35
- Extracciones de agua durante 30, 60 y 90 minutos a 100 °C y a 70 °C. A menos que se indique lo contrario, se usaron suspensiones al 10 % (p/v) en estos experimentos. La extracción con agua se conoce en la técnica anterior, estos son experimentos comparativos.
 - Las extracciones con bicarbonato sódico (pH 7,5-8) se llevaron a cabo típicamente al 7,5 % (p/v), a menos que se indicara lo contrario. La razón para estudiar este método de extracción fue que la solución ligeramente alcalina podría promover la degradación de la cadena de ácido poligalacturónico esterificado con metilo a través de la escisión beta eliminativa. Esto produciría un producto RG-I enriquecido, ya que la beta eliminación sería mucho más lenta para el RG-I no esterificado de manera natural. Estas son extracciones según el método de la invención.
 - Las extracciones ácidas se realizaron con ácido clorhídrico a pH 2,5 y al 5 % (p/v) a menos que se indicara lo contrario, durante el tiempo especificado a 70 °C, después de lo cual las soluciones se enfriaron y neutralizaron con bicarbonato sódico. La pectina utilizada como material gelificante en la industria alimentaria se produce por extracción ácida de, p. ej., cáscaras de cítricos, seguida de la precipitación de alcohol. Por lo tanto, se estudió aquí si la extracción ácida podría también producir mayores cantidades de RG-I, y si el RG-I sería estable en la solución ácida. La extracción con ácido se conoce en la técnica anterior, estos son experimentos comparativos.

50 *Eficiencias de extracción*

[0155] Los rendimientos de extracción, análisis de composición y distribución del peso molecular de los extractos obtenidos de los tres materiales vegetales, extraídos usando agua, ácido o bicarbonato se dan en la Tabla 1 a la Tabla 9. La distribución del peso molecular se midió mediante GPC en Superdex 200. Se recopilieron las fracciones correspondientes a > 110 kDa (PMA), 70-110 kDa (PMM) y 40-70 kDa (PMB) y se midieron los rendimientos. El resto del extracto se considera que tiene un peso molecular inferior a 40 kDa, y esto se calcula restando del 100 % los porcentajes en peso de las 3 fracciones. Los rendimientos se presentan en porcentaje de peso/peso en comparación con el extracto inyectado en la columna. Típicamente, se disolvieron 10-15 mg de extracto en aproximadamente 400 microlitros de tampón de migración. El material no disuelto se eliminó antes de la inyección y no se tuvo en cuenta en el cálculo.

Tabla 1 Rendimiento de extracción de *pimiento* usando agua, ácido o bicarbonato.

Código	Tratamiento	Material de partida RIA [g]	volumen de extracción [ml]	rendimiento después de la extracción [g]	rendimiento [%]
P-W1	agua 100 °C, 30 min	5,00	50	0,41	8,2
P-W2	agua 100 °C, 60 min	5,03	50	0,44	8,7
P-W3	agua 100 °C, 90 min	5,03	50	0,45	9,0
P-W4	agua 70 °C, 30 min	5,00	50	0,48	9,5
P-W5	agua 70 °C, 60 min	5,05	50	0,53	10,4
P-W6	agua 70 °C, 90 min	5,05	50	0,46	9,1
P-A1	HCl 70 ° C, 30 min	5,02	100	0,33	6,7
P-A2	HCl 70 ° C, 60 min	5,00	100	0,38	7,6
P-A3	HCl 70 ° C, 90 min	5,02	100	0,48	9,5
P-B1	NaHCO ₃ 100° C, 30 min	5,04	66	0,63	12,5
P-B2	NaHCO ₃ 100° C, 60 min	5,04	66	0,67	13,4
P-B1	NaHCO ₃ 100° C, 30 min	5,04	66	0,59	11,6

Tabla 2 Distribución del peso molecular de extractos de *pimiento*.

Código	Tratamiento	P _M > 110 kDa [% en peso]	P _M 70-110 kDa [% en peso]	P _M >70 kDa [% en peso]	P _M 40-70 kDa [% en peso]	P _M <40 kDa [% en peso]
P-W1	agua 100 °C, 30 min	9	14	23	17	60
P-W2	agua 100 °C, 60 min	15	13	28	19	53
P-W3	agua 100 °C, 90 min	12	16	28	21	51
P-W4	agua 70 °C, 30 min	23	19,5	42,5	17	40,5
P-W5	agua 70 °C, 60 min	11	15	26	11	63
P-W6	agua 70 °C, 90 min	9	16	25	21	54
P-A1	HCl 70 °C, 30 min	N/A.*	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.
P-A2	HCl 70 ° C, 60 min	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.
P-A3	HCl 70 ° C, 90 min	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.
P-B1	NaHCO ₃ 100° C, 30 min	16	17,5	33,5	28	38,5
P-B2	NaHCO ₃ 100° C, 60 min	13	13,5	26,5	23	50,5

Código	Tratamiento	P _M > 110 kDa [% en peso]	P _M 70-110 kDa [% en peso]	P _M > 70 kDa [% en peso]	P _M 40-70 kDa [% en peso]	P _M < 40 kDa [% en peso]
P-B3	NaHCO ₃ 100° C, 90 min	18	13	31	27	42

* indica que el extracto no se ejecutó en GPC debido al carácter del gel.

Tabla 3 Análisis de composición de extractos de *pimiento* usando agua, ácido o bicarbonato.

Código	Rha subst ⁽¹⁾ [%]	Gal/Rha ⁽²⁾ [mol/mol]	Ara/Rha ⁽³⁾ [mol/mol]	GalA OCH ₃ ⁽⁴⁾ [%]	acetilación ⁽⁵⁾ [%]	GalA/Rha ⁽⁶⁾ [mol/mol]
P-W1	25	0	4,4	50	15	8,5
P-W2	30	0	10,5	50	20	6,8
P-W3	30	0	4,4	50	20	6,9
P-W4	20	0	16,2	50	35	4,8
P-W5	15	0	3,3	50	15	10,0
P-W6	20	0	6,5	50	20	9,2
P-A1	35	0	3,1	0	10	8,1
P-A2	40	0	5,0	0	10	7,3
P-A3	35	0	5,1	0	10	7,1
P-B1	30	0	0	0	5	13,9
P-B2	30	0	0	0	0	12,1
P-B3	45	0	0	0	0	5,3

Legenda: (1) *Rha subst* .: fracción molar de las porciones de Rha en el núcleo RG-I que está sustituido en la posición C-4 con una cadena lateral; tal como se mide desde el desplazamiento de señal CH₃ de Rha; (2) *Gal/Rha*: proporción molar de Gal beta (1,4) enlazado en comparación con Rha (mol/mol); se refiere a la longitud de las cadenas laterales que contienen residuos de galactano beta (1,4) enlazados; (3) *Ara/Rha*: proporción molar de arabinano alfa (1,5) enlazado en comparación con Rha (mol/mol); se refiere a la longitud de las cadenas laterales que contienen residuos de arabinosilo alfa (1,5) enlazado; (4) *GalA OCH₃*: grado de metilación de los residuos de ácido galacturónico (% en moles); (5) acetilación: grado de acetilación de los residuos de ácido galacturónico (% en moles), 1 grupo acetilo por residuo de ácido galacturónico se establece como 100 %; (6) *GalA/Rha*: residuos de ácido alfa-1,4-galacturonilo frente a residuos de ramnosilo (mol/mol); es decir, este número indica la proporción molar entre residuos de GalA en el ácido poligalacturónico alfa (1,4) enlazado o núcleos de ácido oligogalacturónico alfa (1,4) enlazado en el polisacárido y residuos de Rha en el núcleo RG-I del polisacárido;

Tabla 4 Rendimiento de extracción de *Zanahoria* usando agua al 3 % (p/v), ácido o bicarbonato.

Código	Tratamiento	Material de partida RIA [g]	volumen de extracción [ml]	rendimiento después de la extracción [g]	rendimiento [%]
C-W1	agua 100 °C, 30 min	5,01	50	0,43	8,6
C-W2	agua 100 °C, 60 min	5,01	50	0,25	5,0
C-W3	agua 100 °C, 90 min	5,00	50	0,26	5,2
C-W4	agua 100 °C, 3x vol., 30 min	1,00	30	0,14	14,0
C-W5	agua 100 °C, 3x vol., 60 min	1,00	30	0,16	16,0
C-W6	agua 100 °C, 3x vol., 90 min	1,07	30	0,18	16,4
C-W7	agua 70 °C, 30 min	5,00	50	0,37	7,5

Código	Tratamiento	Material de partida RIA [g]	volumen de extracción [ml]	rendimiento después de la extracción [g]	rendimiento [%]
C-W8	agua 70 °C, 60 min	5,04	50	0,42	8,3
C-W9	agua 70 °C, 90 min	5,02	50	0,42	8,3
C-A1	HCl 70 ° C, 30 min	5,06	100	0,65	12,9
C-A2	HCl 70 ° C, 60 min	5,09	100	0,67	13,2
C-A3	HCl 70 ° C, 90 min	5,04	100	0,56	11,2
C-B1	NaHCO ₃ 100° C, 30 min	5,04	66	0,86	17,1
C-B2	NaHCO ₃ 100° C, 60 min	5,04	66	0,92	18,2
C-B3	NaHCO ₃ 100° C, 90 min	5,04	66	1,03	20,4

Tabla 5 Distribución del peso molecular de extractos de zanahoria.

Código	tratamiento	P _M > 110 kDa [% en peso]	P _M 70-110 kDa [% en peso]	P _M >70 kDa [% en peso]	P _M 40-70 kDa [% en peso]	P _M <40 kDa [% en peso]
C-W1	agua 100 °C, 30 min	9	16	25	22	53
C-W2	agua 100 °C, 60 min	13	17,5	30,5	25,5	44
C-W3	agua 100 °C, 90 min	13	18	31	25,5	43,5
C-W4	agua 100 °C, 3x vol., 30 min	25	19,5	44,5	23	32,5
C-W5	agua 100 °C, 3x vol., 60 min	26	22	48	29	23
C-W6	agua 100 °C, 3x vol., 90 min	28	22	50	27	23
C-W7	agua 70 °C, 30 min	15	24	39	24	37
C-W8	agua 70 °C, 60 min	21	24	45	17	38
C-W9	agua 70 °C, 90 min	17	23	40	24,5	35,5
C-A1	HCl 70 ° C, 30 min	N/A.*	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.
C-A2	HCl 70 ° C, 60 min	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.
C-A3	HCl 70 ° C, 90 min	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.
C-B1	NaHCO ₃ 100° C, 30 min	27	19,5	46,5	13	40,5
C-B2	NaHCO ₃ 100° C, 60 min	34	25	59	14	27
C-B3	NaHCO ₃ 100° C, 90 min	33	23	56	17	27

* indica que el extracto no se ejecutó en GPC debido al carácter del gel.

Tabla 6 Análisis de composición de extractos de Zanahoria usando agua, ácido o bicarbonato.

Código	Rha subst ⁽¹⁾ [%]	Gal/Rha [mol/mol]	Ara/Rha [mol/mol]	GalA OCH ₃ [%]	acetilación [%]	GalA/Rha [mol/mol]
C-W1	45	5,0	12,3	60	25	9,4
C-W2	45	5,2	11,7	60	20	11,9

ES 2 689 261 T3

Código	Rha subst ⁽¹⁾ [%]	Gal/Rha [mol/mol]	Ara/Rha [mol/mol]	GalA OCH ₃ [%]	acetilación [%]	GalA/Rha [mol/mol]
C-W3	50	5,3	11,8	60	20	10,9
C-W4	45	4,0	10,0	60	20	8,5
C-W5	40	4,2	11,1	60	20	8,6
C-W6	45	4,2	9,7	60	20	8,8
C-W7	40	6,9	16,5	55	20	11,2
C-W8	45	4,7	13,0	55	25	8,3
C-W9	45	4,2	11,0	55	25	7,8
C-A1	60	4,2	10,5	0	15	6,7
C-A2	55	5,6	5,4	0	15	7,8
C-A3	55	5,8	10,9	0	10	7,3
C-B1	55	5,9	5,5	0	10	9,0
C-B2	50	5,5	3,2	0	10	5,1
C-B3	55	5,3	0,0	0	0	7,6

(1): para leyenda, ver *Tabla 3*

Tabla 7 Rendimiento de extracción de *manzana* usando agua al 3,3 % (p/v), ácido o bicarbonato al 6,7% (p/v).

Código	tratamiento	Material de partida RIA [g]	volumen de extracción [ml]	rendimiento después de la extracción [g]	rendimiento [%]
A-W1	agua 100 °C, 30 min	5,01	50	0,19	3,8
A-W2	agua 100 °C, 60 min	5,00	50	0,18	3,6
A-W3	agua 100 °C, 90 min	5,00	50	0,15	3,0
A-W4	agua 70 °C, 30 min	5,02	50	0,20	3,9
A-W5	agua 70 °C, 60 min	5,01	50	0,20	3,9
A-W6	agua 70 °C, 90 min	5,07	50	0,14	2,8
A-A1	HCl 70 ° C, 30 min	5,06	75	0,40	7,9
A-A2	HCl 70 ° C, 60 min	5,00	75	0,43	8,6
A-A3	HCl 70 ° C, 90 min	5,02	75	0,47	9,4
A-B1	NaHCO ₃ 100° C, 30 min	5,09	66	0,73	14,4
A-B2	NaHCO ₃ 100° C, 60 min	5,09	66	0,48	9,5
A-B3	NaHCO ₃ 100° C, 90 min	5,09	66	0,40	8,0
A-B4	NaHCO ₃ 100° C, 2,5x vol, 30 min	1,00	30	0,10	10,1
A-B5	NaHCO ₃ 100° C, 2,5x vol, 60 min	1,00	30	0,097	9,7
A-B6	NaHCO ₃ 100° C, 2,5x vol, 90 min	1,00	30	0,13	12,5
A-B7	NaHCO ₃ 100° C, 3x vol, 30 min	0,50	20	0,10	20,4

Código	tratamiento	Material de partida RIA [g]	volumen de extracción [ml]	rendimiento después de la extracción [g]	rendimiento [%]
A-B8	NaHCO ₃ 100° C, 3x vol, 60 min	0,50	20	0,11	22,6
A-B9	NaHCO ₃ 100° C, 3x vol, 90 min	0,52	20	0,11	20,7

Tabla 8 Distribución del peso molecular de extractos de manzana.

Código	tratamiento	P _M > 110 kDa [% en peso]	P _M 70-110 kDa [% en peso]	P _M >70 kDa [% en peso]	P _M 40-70 kDa [% en peso]	P _M <40 kDa [% en peso]
A-W1	agua 100 °C, 30 min	13	4	17	28,5	54,5
A-W2	agua 100 °C, 60 min	6	12	18	24	58
A-W3	agua 100 °C, 90 min	17	24	41	30	29
A-W4	agua 70 °C, 30 min	8	12	20	14	66
A-W5	agua 70 °C, 60 min	11,5	11,5	23	20,5	56,5
A-W6	agua 70 °C, 90 min	11,5	13	24,5	12,5	63
A-A1	HCl 70 ° C, 30 min	N/A.*	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.
A-A2	HCl 70 ° C, 60 min	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.
A-A3	HCl 70 ° C, 90 min	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.	N/A.
A-B1	NaHCO ₃ 100° C, 30 min	26	19,5	45,5	15,5	39
A-B2	NaHCO ₃ 100° C, 60 min	22,5	12,5	35	11,5	53,5
A-B3	NaHCO ₃ 100° C, 90 min	32	19	51	13	36
A-B4	NaHCO ₃ 100° C, 2,5x vol, 30 min	22	9	31	14	55
A-B5	NaHCO ₃ 100° C, 2,5x vol, 60 min	20	8	28	13,5	58,5
A-B6	NaHCO ₃ 100° C, 2,5x vol, 90 min	22	12	34	13	53
A-B7	NaHCO ₃ 100° C, 3x vol, 30 min	17	9	26	13	61
A-B8	NaHCO ₃ 100° C, 3x vol, 60 min	15	10	25	13	62
A-B9	NaHCO ₃ 100° C, 3x vol, 90 min	29	10,5	39,5	14	46,5

* indica que el extracto no se ejecutó en GPC debido al carácter del gel.

Tabla 9 Análisis de composición de extractos de manzana usando agua, ácido o bicarbonato.

Código	Rha subst (1) [%]	Gal/Rha [mol/mol]	Ara/Rha [mol/mol]	GalA OCH ₃ [%]	acetilación [%]	GalA/Rha [mol/mol]
A-W1	35	0,0	16,8	50	10	10,6
A-W2	40	0,0	20,3	50	15	9,2
A-W3	40	1,4	23,2	55	15	8,9
A-W4	30	2,7	19,7	50	15	8,1

Código	Rha subst (1) [%]	Gal/Rha [mol/mol]	Ara/Rha [mol/mol]	GalA OCH ₃ [%]	acetilación [%]	GalA/Rha [mol/mol]
A-W5	40	0,0	19,1	50	15	7,8
A-W6	25	0,0	18,6	50	20	6,5
A-A1	50	3,2	33,5	0	10	12,3
A-A2	50	2,2	24,3	0	5	13,7
A-A3	50	2,1	28,5	0	5	13,7
A-B1	55	0,0	7,6	0	5	12,0
A-B2	55	0,0	3,8	0	0	11,9
A-B3	50	0,0	6,9	0	0	7,5
A-B4	45	0,0	15,0	5	5	9,4
A-B5	40	0,0	13,8	0	0	8,7
A-B6	45	0,0	11,7	0	0	7,1
A-B7	40	0,0	11,3	0	0	6,4
A-B8	40	0,0	11,8	0	0	6,4
A-B9	45	0,0	11,7	0	0	6,7

(1): para leyenda, ver *Tabla 3*

Extracciones (Tabla 1, Tabla 4, Tabla 7)

[0156] Pimiento: los rendimientos de extracción más altos se obtuvieron con las extracciones con bicarbonato, en comparación con las extracciones con agua o ácido. Los rendimientos fueron en promedio de un 2 a un 3 % más altos que los obtenidos con agua. La temperatura de la extracción con agua no tuvo mucha influencia. También con zanahoria o manzana como material vegetal, el uso de bicarbonato produjo la mayoría de los extractos, en comparación con las extracciones con agua o ácido.

[0157] En el caso de la zanahoria, los rendimientos de extracción a 100 °C son más bajos después de 60 y 90 minutos que a los 30 minutos. Esto puede explicarse por la solución de extracción que después de 60 minutos era mucho más viscosa que a los 30 minutos, y parte de los polisacáridos extraídos no se recuperaron sino que permanecieron en el gel. Este comportamiento no se observó a 70 °C ni en las extracciones con bicarbonato. La formación de gel parece ser dependiente de la concentración, ya que las extracciones a 100 °C con una dilución triple (muestras C-W4, C-W5, C-W6) no mostraron la reducción en el rendimiento.

[0158] También en el caso de la manzana que se extrajo utilizando bicarbonato (muestras A-B1, A-B2, A-B3), se observó una disminución en el rendimiento con el aumento del tiempo de extracción. También en este caso se produjo una gelificación. Las extracciones en concentraciones más bajas de RIA revelaron que la caída en el rendimiento con el aumento del tiempo de extracción podría evitarse.

Distribución de peso molecular (Tabla 2, Tabla 5, Tabla 8)

[0159] Con el pimiento como material vegetal, la distribución del peso molecular de los materiales extraídos utilizando bicarbonato se inclinaba más al extremo superior de los pesos moleculares. En comparación con la extracción solo con agua, las extracciones con bicarbonato durante 60 y 90 minutos (muestras P-B2, P-B3) produjeron una mayor proporción de material con peso molecular superior a 70 kDa que las extracciones con agua (muestras P-W1 a P-W6).

[0160] También en el caso de la zanahoria como material fuente, la proporción de polisacáridos con un peso molecular superior a 70 kDa extraído usando bicarbonato durante al menos 60 minutos fue mayor que las extracciones correspondientes con agua. El material > 110 kDa fue el componente principal en las fracciones extraídas usando bicarbonato.

[0161] Las extracciones de manzana utilizando bicarbonato también condujeron a una mayor proporción de polisacáridos con un peso molecular superior a 70 kDa en comparación con las extracciones con agua. La

dilución del material vegetal durante las extracciones de bicarbonato no condujo a un rendimiento mejorado de los polisacáridos de interés. La fracción > 110 kDa domina en todas las muestras de manzana extraídas con bicarbonato. Se espera que esta fracción proporcione los mejores resultados inmunomoduladores. Al usar bicarbonato, se puede aumentar el rendimiento de extracción, sin ceder en modulación inmunitaria.

5

[0162] La viscosidad de los extractos obtenidos usando ácido era demasiado alta para poder determinar la distribución del peso molecular. Esto muestra que la extracción ácida de estos materiales vegetales no era un método adecuado para aislar los polisacáridos de interés.

Composiciones de los extractos (Tabla 3, Tabla 6, Tabla 9)

10 [0163] Los extractos obtenidos contienen fragmentos RG-I que se han liberado a partir de los polisacáridos en los materiales vegetales. Si la proporción GalA/Rha es 1, entonces un extracto contiene solo un núcleo RG-I. Si la proporción GalA/Rha es mayor que 1, entonces, además del núcleo RG-I, se unen tramos de ácido homogalacturónico al núcleo RG-I. El núcleo RG-I generalmente contiene cadenas laterales principalmente de arabinano y galactano, que están unidas a los residuos de ramnosa.

15

[0164] Pimiento: los extractos con bicarbonato tienen una mayor proporción de ácido poligalacturónico (GalA/Rha) que los extractos con agua. Una explicación de esto puede ser que en la solución de bicarbonato, la desesterificación es más rápida que la beta eliminación, que en realidad disminuye la escisión de la cadena del ácido poligalacturónico.

20

[0165] Zanahoria: los extractos preparados usando extracción con agua a 100 °C (muestras C-W1, C-W2, C-W3) son prácticamente idénticos con respecto a la cantidad de Gal y Ara en la cadena lateral del polisacárido RG-I. Las muestras obtenidas a 70 °C (C-W7, C-W8, C-W9) contienen cadenas laterales algo más grandes, especialmente la proporción Ara/Rha es mayor. Las extracciones con bicarbonato conducen a la reducción de las cadenas laterales de los polisacáridos RG-I, ya que las proporciones Gal/Rha y Ara/Rha disminuyen con el aumento de los tiempos de extracción.

25

[0166] Manzana: las muestras extraídas con bicarbonato muestran que dejó de detectarse galactano en las cadenas laterales, mientras que en el caso de las extracciones con ácido y agua, se pueden detectar algunos de los extractos que todavía contienen algo de galactano en las cadenas laterales. También la cantidad de arabinano en las cadenas laterales disminuye debido a las extracciones con bicarbonato. Los extractos obtenidos de muestras diluidas (A-B4 a A-B9) muestran que las extracciones de mayor volumen parecen producir, en promedio, una proporción de arabinano ligeramente superior y una menor proporción de ácido poligalacturónico que los extractos obtenidos de muestras no diluidas (A-B1 a A-B3).

35

[0167] Para los tres cultivos estudiados aquí, las extracciones ácidas condujeron a soluciones viscosas, para las cuales no fue posible determinar la distribución del peso molecular. Esto puede reflejar una alta cantidad de ácido poligalacturónico en el extracto (es decir, una alta proporción de GalA/Rha), aunque los datos de RMN no prueban esta suposición. Sin embargo, como el análisis de RMN no tolera partículas en el tubo, la rutina consiste en centrifugar las muestras y, por lo tanto, el análisis de RMN de estos extractos puede estar sesgado ya que también se perdió el material de tipo gel.

40

Ejemplo 2: actividad inmunomoduladora de los extractos vegetales

[0168] Un análisis de sangre entera se ha utilizado para determinar la respuesta inmunomoduladora *in vitro* de los extractos obtenidos a partir de los métodos descritos en el ejemplo 1. Este ensayo se basa en la actividad de fagocitosis.

45

[0169] La actividad de fagocitosis en sangre entera se evalúa utilizando el kit Phagotest® de Orpegen Pharma (Heidelberg, Alemania) usando un protocolo ajustado. Se obtiene sangre fresca de voluntarios humanos sanos en vacutainers de heparina sódica (BD Biosciences). Se incuban por duplicado 30 microlitros de sangre entera y 5 microlitros del ingrediente durante 30 minutos en una placa de 96 pocillos de polipropileno a 37 °C en un baño de agua. Las incubaciones de control consistieron en PBS (= actividad basal de fagocitosis) o 100 mg/ml. *E. coli*-lipopolisacárido (LPS) (= muestra de control positiva) en mediciones por triplicado. Después del paso de incubación, se añaden 10 microlitros de *E. coli* marcadas con FITC (proporción de glóbulos blancos con respecto a *E. coli* 25: 1). Esta incubación a 37 °C se detiene después de 6,5 minutos añadiendo 50 microlitros de solución de enfriamiento de muy baja temperatura. Las células se lavan tres veces mediante la adición de 230 microlitros de tampón de lavado muy frío y se centrifugan durante 3 minutos a 300 g (4 °C). Los eritrocitos se lisan usando 290 microlitros de tampón de lisis. Después de la incubación en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente, las células se centrifugan durante 5 min a 300 g (4 °C). Las células se vuelven a suspender en 150 microlitros de tampón de lavado y se tiñen con yoduro de propidio. El análisis se realiza mediante citometría de flujo (citómetro de flujo Coulter FC500 MPL, Beckman Coulter Nederland BV, Mijdrecht). Dentro de los

60

leucocitos, los granulocitos están cerrados de acuerdo con el perfil FSC/SSC. Se determina el porcentaje de células fagocitarias en la población de granulocitos. Los resultados se normalizan al intervalo dinámico entre la fagocitosis basal y la estimulada por LPS y se expresan como un porcentaje relativo de la actividad de fagocitosis. Un porcentaje normalizado de más del 40 % se considera positivo. Este ensayo proporciona una estimación de la actividad inmunomoduladora, se pueden observar tendencias a partir de esto. Todas las muestras se pasaron por un cartucho C-18 preacondicionado antes de la aplicación a la medición inmunológica.

5

[0170] Los siguientes extractos se probaron en el ensayo:

- P-W1	pimiento	agua 100 °C, 30 min
- P-W3	pimiento	agua 100 °C, 90 min
- P-A1	pimiento	HCl 70 °C, 30 min
- P-A3	pimiento	HCl 70 °C, 90 min
- P-B1	pimiento	NaHCO ₃ 100°C, 30 min
- C-W1	Zanahoria	agua 100 °C, 30 min
- C-W3	Zanahoria	agua 100 °C, 90 min
- C-A1	Zanahoria	HCl 70 °C, 30 min
- C-A3	Zanahoria	HCl 70 °C, 90 min
- C-B1	Zanahoria	NaHCO ₃ 100°C, 30 min
- C-B3	Zanahoria	NaHCO ₃ 100°C, 90 min
- A-W1	manzana	agua 100 °C, 30 min
- A-W3	manzana	agua 100 °C, 90 min
- A-A1	manzana	HCl 70 °C, 30 min
- A-A3	manzana	HCl 70 °C, 90 min
- A-B1	manzana	NaHCO ₃ 100°C, 30 min
- A-B3	manzana	NaHCO ₃ 100°C, 90 min

10

[0171] Los datos de fagocitosis medidos de estos extractos se dan en la Figura 1, la Figura 2 y la Figura 3.

[0172] Los extractos obtenidos del *pimiento* mostraron ya cierta actividad de fagocitosis a una concentración de hasta un mínimo de 0,003 microgramos por ml (Figura 1). El extracto obtenido usando bicarbonato a los 30 min (P-B1) mostró una actividad similar al extracto obtenido usando agua a 100 °C a los 30 min (P-W1). También la actividad de la muestra de bicarbonato en comparación con la extracción ácida había mejorado. La actividad de las muestras de 30 minutos era mayor que la de las muestras de 90 minutos, especialmente a bajas concentraciones del extracto (0,3 microgramos por ml e inferiores).

15

[0173] El análisis de monosacáridos mostró que Ara y Gal ya no se podían detectar en las muestras de bicarbonato (P-B1, P-B3). Por lo tanto, en estos extractos, las cadenas laterales no son necesarias para estimular la fagocitosis.

20

[0174] Con la *zanahoria* como material vegetal, los extractos obtenidos utilizando bicarbonato fueron igualmente activos que los extractos con agua a una concentración del extracto de 30 microgramos por ml. El extracto de bicarbonato obtenido a los 30 minutos de extracción era más activo que el extracto de 90 minutos.

25

[0175] Cuando se comparan las composiciones de monosacáridos de los extractos, para los extractos con bicarbonato (C-B1, C-B3), la proporción Ara/Rha en las cadenas laterales es menor que para los extractos con agua (A-W1, A-W3), y la proporción GalA/Rha es menor que para las muestras de agua. Esto muestra que el extracto obtenido de la zanahoria usando bicarbonato es más rico en RG-I con una cantidad menor de residuos de ácido homogalacturónico unidos al núcleo RG-I que el extracto de agua, mientras que las cadenas laterales del núcleo RG-I contienen menos Ara .

30

[0176] En caso de la *manzana*, la actividad de la muestra de bicarbonato de 30 minutos (A-B1) fue mayor que la de las muestras de agua (A-W1) y de ácido (A-A1). Las muestras de 90 minutos fueron similares en actividad. También aquí la proporción de Ara/Rha de los extractos de bicarbonato es menor que la de los extractos de agua. En ambos casos, la proporción Gal/Rha es muy baja o cero.

35

Conclusiones

- [0177] Estos resultados muestran que los extractos obtenidos usando bicarbonato poseen actividad inmunomoduladora ya que son activos en el ensayo de sangre entera. La proporción de GalA/Rha de los extractos ensayados varía aproximadamente de 5 a 14, y estos extractos mostraron actividad de fagocitosis.
- 5 Esto muestra que el núcleo RG-I puede contener tramos unidos de ácido homogalacturónico de varias longitudes. Algunas de las cadenas laterales del núcleo RG-I son muy bajas en Ara y/o Gal, lo que significa que estas cadenas laterales no son específicamente necesarias para la actividad inmunoestimulante.
- [0178] La combinación de un rendimiento relativamente alto de los extractos que utilizan bicarbonato en comparación con las extracciones de agua y ácido, combinado con la actividad de los extractos en los ensayos *in vitro*, muestran que el método de la invención es ventajoso para obtener el extracto que contiene polisacáridos que modulan la respuesta inmunitaria.
- 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción de un preparado a partir de un material vegetal enriquecido en un polisacárido, en el que el esqueleto del polisacárido comprende núcleos de ramnogalacturonano I y opcionalmente tramos de ácido homogalacturónico alfa (1,4) enlazado, en el que la proporción molar de residuos de ácido galacturonilo con respecto a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 30: 1 a 1: 1, y en el que el polisacárido tiene un peso molecular entre 40 kDa y 2000 kDa, que comprende los pasos:
- 10 (a) mezclar el material vegetal con un disolvente alcohólico polar, preferiblemente etanol; y
(b) separar un residuo sólido obtenido en el paso a) del disolvente; y
(c) mezclar el residuo sólido obtenido en el paso b) con una solución acuosa tamponada que tiene un pH entre 7 y 8; y
(d) separar opcionalmente el residuo sólido de la solución acuosa según se obtiene del paso c); y
(e) purificar opcionalmente la solución acuosa del paso d) para producir el polisacárido.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que en el paso c) la solución acuosa tamponada comprende un ácido débil o una base débil que tiene un pK_a en el rango de 6,0 a 8,8.
- 20 3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la temperatura en el paso c) está entre 30°C y 100°C a presión atmosférica, preferiblemente al menos a 60°C, más preferiblemente al menos a 80°C.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material vegetal se mezcla con una cantidad total de disolvente alcohólico polar que es al menos ocho veces mayor que el peso seco del material vegetal.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material vegetal se mezcla con el disolvente alcohólico polar y opcionalmente agua para producir una mezcla que contiene el disolvente alcohólico polar y el agua en una relación en peso que está dentro del intervalo de 1:1 a 19:1.
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el residuo sólido se mezcla con la solución tampón acuosa en una relación en peso de 2:100 a 25:100.
- 40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material vegetal comprende manzana, zanahoria, pimiento, o combinaciones de los mismos.
- 45 8. Preparado para su uso en el tratamiento o prevención del resfriado o la gripe que tiene un contenido de materia seca de al menos un 20 % en peso, con un contenido en dicho preparado de al menos un 50 % en peso de materia seca de una mezcla de polisacáridos pécticos, que incluye al menos un 20 % calculado en peso de los polisacáridos pécticos, de pectinas de ramnogalacturonano I que tienen un peso molecular de más de 40 kDa. Dicha mezcla **está caracterizada por**:
- 50 • un grado de metilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %;
• un grado de acetilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %;
- 55 en el que el preparado no forma un gel cuando se diluye con una solución acuosa de 50 mM de bicarbonato de amonio hasta un contenido de sólidos de 2.5 % en peso.
- 60 9. Preparado para usar en terapia o tratamiento según la reivindicación 8, en el que al menos el 90 % en peso del preparado se disuelve cuando se añaden 25 g del preparado a 1 l de agua destilada que tiene una temperatura de 20°C.
10. Preparado para usar en terapia o tratamiento según las reivindicaciones 8 o 9, en el que menos del 30 % de los residuos de ácido galacturonilo en la mezcla de polisacáridos pécticos está metilado o acetilado.
11. Preparado para usar en terapia o tratamiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 10, en el que el preparado es un extracto obtenido de una planta seleccionada entre manzana, zanahoria, pimiento, tomate, cebolla, ginseng, hojas de té y combinaciones de las mismas.
12. Preparado para usar en terapia o tratamiento según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que el preparado se puede obtener mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
13. Método para preparar un producto comestible o una composición farmacéutica, que comprende incorporar en dicho producto comestible o dicha composición farmacéutica un 0,5-25 % en peso de un preparado, el cual tiene un contenido de materia seca de al menos un 20 % en peso y que contiene al menos un 50 % en peso de materia seca de una mezcla de polisacáridos pécticos, la cual incluye al menos un 20 % calculado en peso de

los polisacáridos pécticos, de pectinas de ramogalacturonano I con un peso molecular de más de 40 kDa. Dicha mezcla de polisacáridos pécticos **está caracterizada por:**

- 5
- un grado de metilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %;
 - un grado de acetilación de los residuos de ácido galacturonilo de no más del 20 %;

en el que el preparado no forma un gel cuando se diluye con una solución acuosa de 50 mM de bicarbonato de amonio hasta un contenido de sólidos de 2,5 % en peso.

- 10 14. Producto comestible o composición farmacéutica obtenible mediante el método según la reivindicación 13.

Figura 1

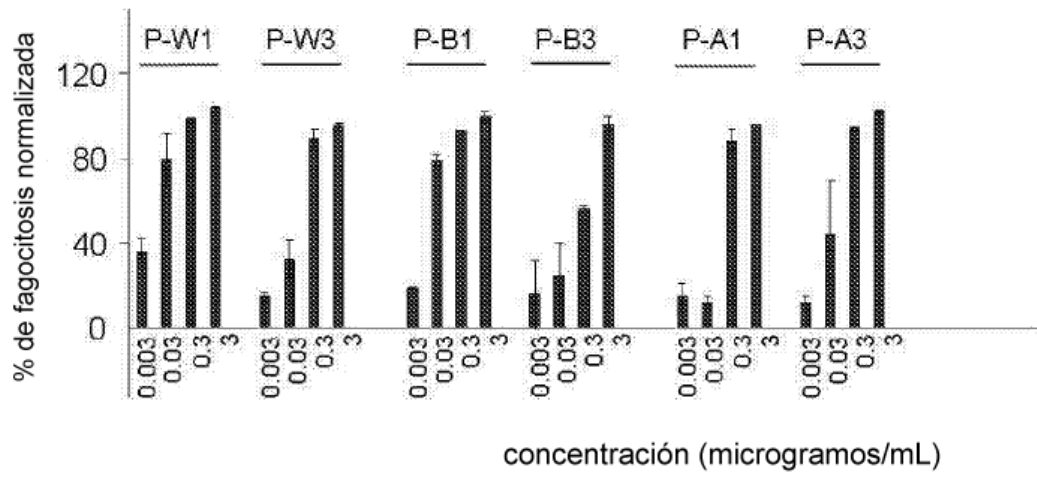


Figura 2

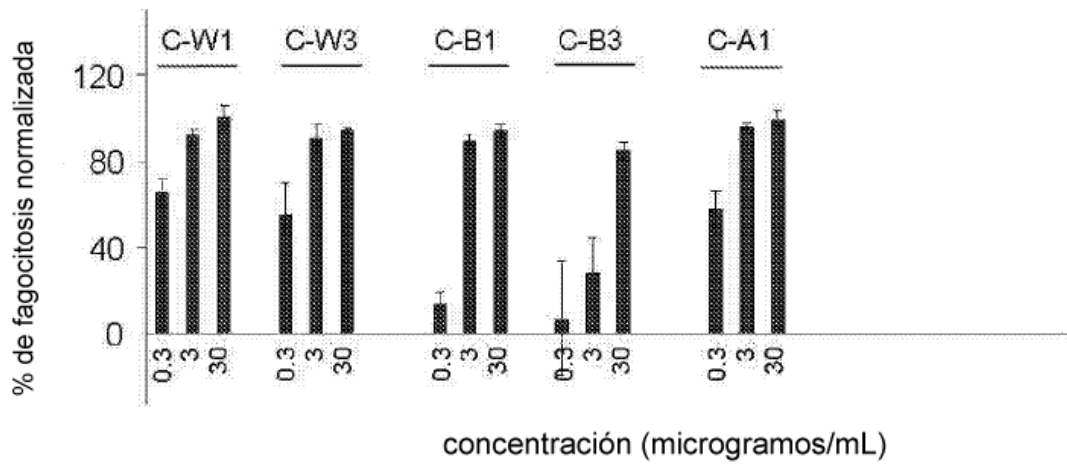


Figura 3

