(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 746 296**

(51) Int. CI.:

A61K 31/716	(2006.01)	***A61K 31/4706***	(2006.01)
A61K 36/899	(2006.01)	***A61K 31/49***	(2006.01)
A61P 33/06	(2006.01)	***A61K 31/505***	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)	***A61K 31/635***	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)	***C08B 37/00***	(2006.01)
C08B 30/04	(2006.01)	***A23K 20/163***	(2006.01)
C08L 5/00	(2006.01)	***A23L 33/105***	(2006.01)
A61K 31/4709	(2006.01)		
A61K 31/357	(2006.01)		
A61K 31/137	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2013 PCT/JP2013/075152**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14054421**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2013 E 13844047 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2905026**

(54) Título: **Activador de las placas de Peyer**

(30) Prioridad:

02.10.2012 JP 2012220341

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2020

(73) Titular/es:

MITSUI SUGAR CO. LTD. (100.0%)
36-2 Nihonbashi-Hakozakicho, Chuo-ku
Tokyo 103-8423, JP

(72) Inventor/es:

YAMADA, HARUKI;
KIYOHARA, HIROAKI;
OTOGURO, KAZUHIKO;
ISHIYAMA, AKI;
IWATSUKI, MASATO;
OMURA, SATOSHI;
MIZU, MASAMI;
KAWAI, TOSHIKAZU;
KASHIMURA, JUN y
KOGE, KENJI

(74) Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

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

Activador de las placas de Peyer

Campo técnico

La presente invención se refiere a un activador de las placas de Peyer.

Técnica anterior

Las placas de Peyer son tejidos foliculares linfoides altamente funcionalizados presentes en el tracto intestinal superior y son uno de los tejidos inductivos que sirven como un importante punto de partida para la producción de IgA secretora específica de antígeno y para la expresión de tolerancia inmunológica. Se sabe que las placas de Peyer desempeñan un papel importante en un sistema inmunitario que está relacionado con la biofilaxis y se denomina inmunidad intestinal. Por ejemplo, debido al fenómeno de la migración dirigida, los linfocitos de las placas de Peyer se reclutan constantemente en los tejidos de otros sistemas inmunitarios de la mucosa local y en los sistemas inmunitarios sistémicos y funcionan para transmitir la información inmunitaria.

Como ejemplo de la actividad moduladora de la función inmunitaria de las placas de Peyer, se puede mencionar la producción de factores promotores del crecimiento celular de la médula ósea (por ejemplo, citocinas) en las placas de Peyer. Como tal factor promotor del crecimiento celular de la médula ósea, por ejemplo, se conoce IL-6, que es una citocina producida por células inmunocompetentes en las placas de Peyer, (bibliografía no de patente 1).

Mientras tanto, ya se ha informado de que los polisacáridos obtenidos de un rizoma de Atractylodes lancea DC y los polisacáridos obtenidos de una parte aérea de Astragalus mongholics Bunge tienen actividad moduladora de la función inmunitaria de las placas de Peyer (Bibliografía no de patente 2).

Además, se conoce un agente preventivo/terapéutico para la infección, un agente adyuvante de vacunas y un agente preventivo/terapéutico para enfermedades en seres humanos o animales causadas por Coccidia, que contiene como principio activo un extracto derivado de caña de azúcar que es una gramínea (Bibliografías de patentes 1 y 2).

Listado de citas

Bibliografía de patentes

Bibliografía de patente 1: JP-A-2000-297046
Bibliografía de patente 2: JP-A-2003-63975

Bibliografía no de patentes

Bibliografía no de patentes 1: T. Hong, T. Matsumoto, H. Kiyohara y H. Yamada: Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicines, 'Juzen-taiho-to', Phytomedicine, Vol. 5, págs. 353 a 360 (1998)
Bibliografía no de patentes 2: Hiroaki Kiyohara, Toshiake Matsuzaki, Tsukasa Matsumoto, Takayuki Nagai, Haruki Yamada: Yakugaku Zasshi, Vol. 128, n.º 5, págs. 709 a 719 (2008)

Sumario de la invención

Problemas a resolver por la invención

Hacer artificialmente posible la modulación de la función inmunitaria de las placas de Peyer hace posible la modulación del sistema inmunitario relacionada con la biofilaxis, y por lo tanto es beneficioso. Como se divulga en la bibliografía no de patentes 2, ya se conocen algunas sustancias que tienen actividad moduladora de la función inmunitaria de las placas de Peyer. Sin embargo, todavía no se puede decir que el repertorio sea suficiente para satisfacer las diversas necesidades de los consumidores.

Además, aunque ya se conocen algunos componentes funcionales derivados de una gramínea, no se ha conocido hasta ahora un componente que tenga actividad moduladora de la función inmunitaria de las placas de Peyer, por ejemplo, un componente que tenga un efecto potenciador sobre la producción de citocinas que tienen actividad promotora del crecimiento celular de la médula ósea en las placas de Peyer (en lo sucesivo en el presente documento, este efecto también se conoce como un "efecto activador de las placas de Peyer").

En vista de las circunstancias anteriores, un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo activador de las placas de Peyer que tenga un efecto de potenciación sobre la producción de citocinas que tienen actividad promotora del crecimiento celular de la médula ósea en las placas de Peyer.

Medios para solucionar los problemas

La presente invención se expone de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Los presentes inventores han encontrado que una fracción de α-glucano y una fracción de heteroglicano purificadas a partir de un extracto de Saccharum officinarum (caña de azúcar) eliminado por sacarosa, que se describirá a continuación, tienen un efecto potenciador sobre la producción de citocinas que tienen una actividad promotora del crecimiento celular de la médula ósea en las placas de Peyer, y por lo tanto han logrado la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona un activador de las placas de Peyer que contiene un polisacárido obtenido a partir de caña de azúcar como principio activo.

El activador de las placas de Peyer de la presente invención tiene al menos un efecto potenciador sobre la producción de citocinas que tienen actividad promotora del crecimiento celular de la médula ósea (por ejemplo, IL-6) en las placas de Peyer. Por lo tanto, al menos modulando la producción de citocinas en las placas de Peyer, se puede ejercer la actividad moduladora de la función inmunitaria de las placas de Peyer. Además, la caña de azúcar es una de las que se han utilizado como productos alimenticios desde la antigüedad, y por lo tanto, se puede proporcionar un activador de las placas de Peyer con mayor seguridad.

El polisacárido puede contener α-glucano como componente principal y tener un peso molecular máximo dentro del intervalo de 720.000 a 1.080.000, con una proporción de glucosa en todos los azúcares componentes de 80% o más, siendo las proporciones de glucosa terminal no reductora y glucosa α-1,6-unida del 20 al 30% y del 15 al 25%, respectivamente (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada "fracción de α-glucano"). Como resultado, se puede lograr un efecto activador de las placas de Peyer más excelente. Incidentalmente, "glucosa α-1,6-unida" en el presente documento significa una unidad de α-glucosa unida con otras unidades estructurales en los grupos hidroxilo de la posición 1 y la posición 6, y también se conoce como "glucosa α-6 unida".

Una "curva de distribución de peso molecular" significa en el presente documento, una curva de distribución obtenida a partir del análisis del peso molecular de cada muestra de prueba (una fracción de α-glucano y una fracción de heteroglicano) mediante cromatografía por filtración en gel de alta velocidad (HPSEC). El peso molecular se calcula, por ejemplo, a partir del tiempo de retención de una muestra de prueba basándose en una curva de calibración del coeficiente de peso molecular/tiempo de retención (Kav) creado a partir del tiempo de retención de un polisacárido natural (pululano P-800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 y 5, Showa Denko) en HPSEC. Además, las condiciones de HPSEC se pueden establecer de la siguiente manera, por ejemplo.
Columna; columna acoplada, Asahi-pak GS710 y Asahi-pak GS620 (cada 0,76 i.d. x 60 cm) (Showa Denko)
Sistema de bombeo; JASCO PV-980 (Jasco)
Detector; Shodex RI SE-62 (Showa Denko) (sensibilidad: x2)
Eluyente; NaCl 0,2 M(1,0 ml/min)

Un "peso molecular máximo" en este documento significa un peso molecular que corresponde a un máximo superior de un máximo en la "curva de distribución de peso molecular" mencionada anteriormente.

Además, preferentemente, la fracción de α-glucano se obtiene a partir de una fracción obtenida precipitando con etanol una materia prima seleccionada de un extracto de caña de azúcar y melaza derivada de caña de azúcar, y eliminando las sustancias de bajo peso molecular del precipitado obtenido mediante diálisis o un proceso de membrana (también denominada como una "fracción precipitada con etanol").

La fracción precipitada con etanol también se puede obtener utilizando un extracto de caña de azúcar o una melaza derivada de caña de azúcar tal como está. Además, preferentemente, la fracción precipitada con etanol se obtiene utilizando una fracción que absorbe luz a una longitud de onda de 420 nm y de la cual se excluyen la sacarosa, la glucosa y la fructosa, entre un gran número de fracciones obtenidas al pasar un extracto de caña de azúcar o una melaza derivada de caña de azúcar a través de una columna llena con una resina de intercambio catiónico como portador y realizando el fraccionamiento mediante una diferencia en la afinidad entre la resina de intercambio catiónico y cada componente utilizando agua como eluyente (también conocido como "extracto derivado de caña de azúcar"). Al usar el extracto derivado de caña de azúcar, la fracción precipitada con etanol se puede obtener de manera más eficiente.

Preferentemente, la fracción de α-glucano es una fracción obtenida al pasar la fracción precipitada con etanol a través de una columna llena con una resina de intercambio aniónico como portador, eluyendo los componentes adsorbidos en la resina de intercambio aniónico con un disolvente de elución que tiene una fuerza iónica baja para obtener fracciones eluidas y filtrar adicionalmente con gel las fracciones eluidas obtenidas.

Preferentemente, la fracción de α-glucano es una fracción en una cantidad correspondiente al volumen vacío del primer flujo de salida que es el resultado de pasar la fracción precipitada con etanol a través de una columna llena de una resina de intercambio aniónico equilibrada con agua como portador, eluyendo los componentes adsorbidos sobre la resina de intercambio aniónico con NH_4HCO_3 100 mM para obtener fracciones eluidas, y pasando

adicionalmente las fracciones eluidas obtenidas a través de una columna de filtración con gel que tiene un límite molecular de 2 x 10^3 a 4 x 10^5 Da.

El polisacárido puede contener heteroglicano como componente principal y tener pesos moleculares máximos dentro de un intervalo de 38.400 a 57.600 y dentro de un intervalo de 664.000 a 996.000, con proporciones de glucosa y arabinosa en todos los azúcares componentes de 30% a 50% y de 20 a 30 %, respectivamente, y una proporción de arabinosa terminal no reductora de 20 a 30% (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado "fracción de heteroglicano"). Como resultado, se puede lograr un efecto activador de las placas de Peyer más excelente.

Preferentemente, la fracción de heteroglicano se obtiene de la fracción precipitada con etanol. En este caso, preferentemente, la fracción precipitada con etanol se obtiene de el extracto derivado de caña de azúcar.

Preferentemente, la fracción de heteroglicano es una fracción obtenida al pasar la fracción precipitada con etanol a través de una columna llena con una resina de intercambio aniónico como portador, y eluir los componentes adsorbidos en la resina de intercambio aniónico con un disolvente de elución que tiene una alta fuerza iónica.

Preferentemente, la fracción de heteroglicano consiste en:

una fracción diferente a una fracción en una cantidad correspondiente al volumen vacío del primer flujo de salida que es el resultado de pasar la fracción precipitada con etanol a través de una columna llena de una resina de intercambio aniónico equilibrada con agua como portador, eluyendo los componentes adsorbidos sobre la resina de intercambio aniónico con NH_4HCO_3 100 mM y posteriormente con NH_4HCO_3 300 mM para obtener fracciones eluidas, y pasando adicionalmente las fracciones eluidas obtenidas a través de una columna de filtración con gel que tiene un límite molecular de 1 x 10^4 a 1 x 10^6 Da; y
una fracción en una cantidad correspondiente al volumen vacío del primer flujo de salida que es el resultado de pasar la fracción precipitada con etanol a través de una columna llena de una resina de intercambio aniónico equilibrada con agua como portador, eluyendo los componentes adsorbidos sobre la resina de intercambio aniónico con NH_4HCO_3 300 mM y posteriormente con NH_4HCO_3 1,8 M para obtener fracciones eluidas, y pasando adicionalmente las fracciones eluidas obtenidas a través de una columna de filtración con gel que tiene un límite molecular de 2 x 10^3 a 4 x 10^5 Da.

El polisacárido se puede obtener precipitando con etanol una materia prima seleccionada de un extracto de caña de azúcar y melaza derivada de caña de azúcar, y eliminando las sustancias de bajo peso molecular del precipitado obtenido mediante diálisis o un proceso de membrana (equivalente a la "fracción precipitada con etanol").

El activador de las placas de Peyer de la presente invención tiene un efecto activador de las placas de Peyer y, por lo tanto, también puede usarse como un potenciador inmunitario intestinal. Además, a través de su efecto potenciador de la inmunidad intestinal, el activador de las placas de Peyer también se puede utilizar, por ejemplo, como agente preventivo/terapéutico para la infección por plasmodios.

El activador de las placas de Peyer de la presente invención también puede estar contenido en productos alimenticios, aditivos alimentarios, alimentos para animales, productos farmacéuticos, aditivos farmacéuticos, etc., y se puede utilizar.

La presente invención también proporciona un medicamento para prevenir o tratar la infección por plasmodios que contiene el activador de las placas de Peyer de la presente invención.

El medicamento para prevenir o tratar la infección por plasmodios se puede usar en combinación con al menos un agente antipalúdico seleccionado del grupo que consiste en quinina, mefloquina, sulfadoxina, pirimetamina, cloroquina, primaquina, artesunato, arteméter y lumefantrina. Preferentemente, el agente antipalúdico es artesunato.

La presente invención también puede entenderse como el uso (o aplicación) del polisacárido mencionado anteriormente para activar las placas de Peyer. Además, la presente invención también puede entenderse como un método para activar las placas de Peyer, que incluye una etapa de administración del polisacárido mencionado anteriormente a un sujeto.

Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un nuevo activador de las placas de Peyer. De acuerdo con la presente invención, un agente que contiene un polisacárido obtenido de caña de azúcar como principio activo se administra a un animal (p. ej., administración oral), por lo que, por ejemplo, se puede lograr un efecto potenciador sobre la producción de citocinas (p. ej., IL-6 como un factor promotor de crecimiento celular de la médula ósea) en las placas de Peyer. Como resultado, por ejemplo, a través de la potenciación de la inmunidad intestinal, puede potenciarse el sistema inmunitario relacionado con la biofilaxis.

Además, el activador de las placas de Peyer de la presente invención se deriva de caña de azúcar que ha sido consumida por los seres humanos desde la antigüedad, y por lo tanto, el activador no daña la salud de los seres humanos o animales industriales tal como los animales domésticos y las aves domésticas para el consumo humano, y es seguro.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una gráfica que muestra los resultados de una prueba de efecto activador de las placas de Peyer en el Ejemplo de Prueba 1.
La Fig. 2 es un esquema que muestra una etapa de separación de la fracción de polisacáridos en el Ejemplo de Producción 1.
La Fig. 3 es una gráfica que muestra los resultados de una prueba de efecto activador de las placas de Peyer en el Ejemplo 1.
La Fig. 4 es una gráfica que muestra los resultados de una prueba de inducción de producción de IL-6 en el Ejemplo 2.
Las figs. 5(A) a 5(C) son gráficas que muestran los resultados de una prueba de administración oral de fracciones de polisacáridos en un modelo de infección por parásitos de malaria en roedores (cepa sensible a la cloroquina) en el Ejemplo 3.
La Fig. 6 es una gráfica que muestra un patrón de elución en la cromatografía en columna realizada en el Ejemplo de Producción 1.
La Fig. 7 es un gráfico de HPSEC que muestra una distribución de peso molecular de una fracción de α-glucano en el Ejemplo de Prueba 2.
La Fig. 8 es un gráfico de HPSEC que muestra una distribución de peso molecular de una fracción de heteroglicano en el Ejemplo de Prueba 2.
Las figs. 9(A) y 9(B) son gráficas que muestran los resultados de una prueba de administración oral de una fracción de polisacárido en un modelo de infección por parásitos de malaria en roedores (cepa resistente a la cloroquina) en el Ejemplo 4.
Las figs. 10(A) a 10(C) son gráficas que muestran los resultados de una prueba de administración oral de una fracción de polisacárido con un agente antipalúdico en un modelo de infección por parásitos de malaria en roedores (cepa resistente a la cloroquina) en el Ejemplo 5.

Realizaciones para Llevar a Cabo la Invención

En lo sucesivo en el presente documento, se describirán con más detalle realizaciones de la presente invención.

El activador de parche de Peyer de la presente invención contiene un polisacárido obtenido a partir de caña de azúcar como principio activo.

[Polisacárido]
El polisacárido obtenido de caña de azúcar puede ser:
(i) uno que contenga α-glucano como componente principal y que tenga un peso molecular máximo dentro del intervalo de 720.000 a 1.080.000, con una proporción de glucosa en todos los azúcares componentes de 80% o más, siendo las proporciones de glucosa terminal no reductora y glucosa α-1,6-unida del 20 al 30% y del 15 al 25%, respectivamente (fracción de α-glucano);
(ii)uno que contenga heteroglicano como componente principal y tener pesos moleculares máximos dentro de un intervalo de 38.400 a 57.600 y dentro de un intervalo de 664.000 a 996.000, con proporciones de glucosa y arabinosa en todos los azúcares componentes de 30% a 50% y de 20 a 30 %, respectivamente, y una proporción de arabinosa terminal no reductora de 20 a 30% (fracción de heteroglicano); o
(iii) uno obtenido precipitando con etanol una materia prima seleccionada de un extracto de caña de azúcar y melaza derivada de caña de azúcar, y eliminando las sustancias de bajo peso molecular del precipitado obtenido mediante diálisis o un proceso de membrana (fracción precipitada con etanol).

Preferentemente, la fracción de α-glucano tiene además un contenido de azúcar de 80% en masa a 90% en masa en términos de Glc. Además, preferentemente, la fracción de α-glucano tiene un contenido de ácido urónico de 5% en masa o menos en términos de GalA. Preferentemente, la fracción de α-glucano tiene un contenido de proteína de 10% en masa o menos en términos de una inmunoglobulina bovina. Además, preferentemente, la proporción de glucosa en todos los azúcares componentes de la fracción de α-glucano es del 75% al 90%.

El peso molecular máximo de la fracción de α-glucano solo necesita estar dentro de un intervalo de 720.000 a 1.080.000, pero preferentemente está dentro de un intervalo de 810.000 a 990.000, más preferentemente, dentro de un intervalo de 855.000 a 945.000. Preferentemente, el intervalo de distribución del peso molecular de la fracción de α-glucano en la curva de distribución del peso molecular es de 16.000 a (un peso molecular correspondiente al volumen Vo), más preferentemente de 16.000 a 1.660.000.

Preferentemente, la fracción de heteroglicano tiene además un contenido de azúcar de 45% en masa a 55% en masa en términos de Glc. Además, preferentemente, la fracción de heteroglicano tiene un contenido de ácido

urónico de 5% en masa a 10% en masa en términos de GalA. Preferentemente, la fracción de heteroglicano tiene un contenido de proteína de 7,5% en masa o menos en términos de una inmunoglobulina bovina. Además, las proporciones de glucosa y arabinosa en todos los azúcares componentes de la fracción de heteroglicano son preferentemente de 30% a 40 % y de 22,5 a 27,5 %, respectivamente.

La fracción de heteroglicano tiene dos pesos moleculares máximos, uno dentro de un intervalo de 38.400 a 57.600 y el otro dentro de un intervalo de 664.000 a 996.000. El peso molecular máximo más pequeño está preferentemente dentro de un intervalo de 43.200 a 52.800, y más preferentemente dentro de un intervalo de 45.600 a 50.400. El mayor peso molecular máximo está preferentemente dentro de un intervalo de 747.000 a 913.000, y más preferentemente dentro de un intervalo de 788.500 a 871.500. La fracción de heteroglicano tiene al menos dos máximos en la curva de distribución del peso molecular. Preferentemente, el intervalo de distribución del peso molecular de la fracción de heteroglicano en la curva de distribución del peso molecular es de 10.000 a (un peso molecular correspondiente al volumen Vo), más preferentemente de 10.000 a 1.660.000.

[Método de Producción de Polisacáridos]

<Fracción Precipitada con Etanol>

La fracción precipitada con etanol se puede obtener precipitando con etanol una materia prima seleccionada de un extracto de caña de azúcar y melaza derivada de caña de azúcar, y eliminando las sustancias de bajo peso molecular del precipitado obtenido mediante diálisis o un proceso de membrana. Como materia prima utilizada para la precipitación con etanol, se puede usar un extracto de caña de azúcar o una melaza derivada de caña de azúcar, y se prefiere usar un extracto derivado de caña de azúcar para obtener de manera eficazmente la fracción precipitada con etanol. El extracto derivado de caña de azúcar es una fracción que absorbe luz a una longitud de onda de 420 nm y de la cual se excluyen sacáridos de bajo peso molecular como la sacarosa, la glucosa y la fructosa, entre un gran número de fracciones obtenidas al pasar una materia prima seleccionada de un extracto de caña de azúcar y una melaza derivada de caña de azúcar a través de una columna llena con una resina de intercambio catiónico como portador y realizando la separación por una diferencia de afinidad entre la resina de intercambio catiónico y cada componente contenido en la materia prima utilizando agua como eluyente (por una diferencia en la tasa de elución). Para la diálisis, se puede usar una membrana permeable generalmente utilizada para desalinización. Además, para el proceso de membrana, se puede usar una membrana UF utilizada para la desalinización, la eliminación de monosacáridos, etc.

Un rendimiento de la fracción precipitada con etanol es, por ejemplo, en el caso de usar un extracto, generalmente alrededor del 5% en masa basado en un contenido de sólidos en el extracto. Además de los polisacáridos, la fracción precipitada con etanol también contiene polifenol, sales y otros componentes.

<Extracto>

En lo sucesivo, en el presente documento, se describirá un método para producir un extracto derivado de caña de azúcar.

Un zumo de caña de azúcar, un extracto disolvente de caña de azúcar o un extracto similar, o una melaza derivada de caña de azúcar (en lo sucesivo en el presente documento, a veces simplemente denominado "materia prima") se hace pasar a través de una columna llena con un portador fijo. La materia prima se puede usar tal como está, o se puede ajustar a cualquier concentración con agua y se puede usar. Incidentalmente, para eliminar los materiales insolubles, es conveniente filtrar la materia prima antes del tratamiento a través de una columna. La técnica de filtración no está particularmente limitada, y pueden usarse preferentemente las técnicas ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, tales como la filtración con pantalla, la filtración de tierra con diatomeas, la microfiltración y la ultrafiltración.

Un aspecto preferido del método que usa una resina de intercambio iónico como un portador fijo es el siguiente.

Las resinas de intercambio iónico se pueden clasificar en resinas de intercambio catiónico y resinas de intercambio aniónico desde el punto de vista de la naturaleza del intercambio iónico. En la presente invención, preferentemente, se puede usar una resina de intercambio catiónico. Más preferentemente, se puede usar una resina de intercambio catiónico de tipo fuertemente ácido, tipo ion sodio o tipo ion potasio. Además, las resinas de intercambio iónico se clasifican en resinas de tipo gel, y resinas porosas tales como una de tipo poroso, una de tipo microporoso y una de tipo altamente poroso, desde el punto de vista de una forma de resina; sin embargo, en la presente invención, preferentemente, se puede usar una resina de intercambio iónico de tipo gel. Más preferentemente, se puede usar una resina de intercambio catiónico de tipo fuertemente ácido, tipo ion sodio o tipo ion potasio en un tipo de gel. Dichas resinas de intercambio iónico están disponibles comercialmente, y ejemplos de las mismas incluyen, como las series Diaion (marca registrada), SK1B, SK104, SK110, SK1B, SK104, SK110, SK112 y SK116 (todos los nombres comerciales, Mitsubishi Chemical Corporation), y UBK530 y UBK550 (para la separación por cromatografía, todos los nombres comerciales, Mitsubishi Chemical Corporation); como las series Amberlite (marca registrada), Amberlite IR120B, IR120BN, IR124, XT1006 e IR118, Amberlyst 31 y Amberlite CG120 y CG6000 para

cromatografía (todos los nombres comerciales, Organo Corporation); como las series Dowex (marca registrada), HCR-S, HCR-W2, HGR-W2, Monosphere 650C, Marason C600, 50Wx2, 50Wx4, y 50Wx8 (todos los nombres comerciales, Dow Chemical Company Japan), y Muromac 50WX (nombre comercial, Muromachi Chemical Engineering Co., Ltd.); como las series Purolite (marca registrada), C-100E, C-100, C-100x10, C-120E, PCR433, PCR563K, PCR822, PCR833, PCR866, PCR883, PCR892 y PCR945 (todos los nombres comerciales, AMP Ionex Corporation). Entre ellas, son particularmente preferidas las series UBK.

La cantidad de portador fijo cambia dependiendo del tamaño de la columna, el tipo de portador fijo, etc. La cantidad del portador fijo es una cantidad como volumen húmedo, preferentemente de dos veces a 10.000 veces, más preferentemente de 5 a 500 veces, el contenido de sólidos de la materia prima.

La materia prima se hace pasar a través de la columna y después se somete a cromatografía usando agua como eluyente para obtener un gran número de fracciones, y se aísla una fracción que absorbe luz a una longitud de onda de 420 nm entre las fracciones obtenidas, por lo que se puede obtener el extracto de interés. Este método a veces se denomina separación por cromatografía iónica. En la separación por cromatografía iónica, cada componente se separa por una diferencia en la tasa de paso de columna causada por una diferencia en la afinidad entre cada componente contenido en la materia prima y la resina de intercambio iónico.

Las condiciones de paso del líquido cambian dependiendo de la composición de la materia prima, el tipo de portador fijo, etc. El agua desgasificada se usa como eluyente, y en el caso de un método de separación por lotes de una sola columna, preferentemente, el caudal es SV = 0,3 a 1,0 hr^{-1}, la cantidad de una muestra que se va a suministrar es del 1 al 20% de la resina, y la temperatura es de 40 a 70 °C. Cuando se analiza la absorción a una longitud de onda de 420 nm, la conductividad eléctrica (una medida del contenido de sal) y las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa para cada una de las fracciones obtenidas por este método de separación y se representan como una gráfica de series con respecto al tiempo, los máximos aparecen en el siguiente orden: un máximo de absorción de luz a una longitud de onda de 420 nm, un máximo de conductividad eléctrica y máximos de sacarosa y azúcar reductor.

<Fracción de α-glucano>

A continuación, se describirá un método para producir la fracción de α-glucano.

Preferentemente, la fracción precipitada con etanol se utiliza para la purificación (producción) de la fracción de α-glucano. En lo sucesivo, en el presente documento, se describirá un método para purificar la fracción de α-glucano tomando el caso de usar la fracción precipitada con etanol como ejemplo.

Primero, la fracción precipitada con etanol se hace pasar a través de una columna llena con una resina de intercambio aniónico como portador para adsorber componentes. Como resina de intercambio aniónico, se prefiere una resina de intercambio iónico fuerte. Por ejemplo, se puede usar una resina que tenga un grupo Q (amonio cuaternario) o un grupo QAE. Los ejemplos específicos de una columna provista con tal portador pueden incluir Q-Sepharose Fast Flow (FF) y QAE-Sepharose FF. Preferentemente, dichos portadores de resina se equilibran con agua de antemano. Por ejemplo, en el caso de QAE-Sepharose FF, la resina se sumerge en hidrogenocarbonato de amonio 2 M para activar los grupos QAE (un ion hidrogenocarbonato que es un contraión se une al grupo de amonio cuaternario unido covalentemente a Sefarosa, es decir, se convierte en una forma de HCO_3^-), después se lava con agua para eliminar el hidrogenocarbonato de amonio restante, y posteriormente se suspende en agua (equilibrado con agua).

A continuación, se hace pasar un disolvente de elución para eluir los componentes adsorbidos en el portador de tal manera que la fuerza iónica del disolvente de elución aumenta gradualmente. Como disolvente de elución, se prefiere utilizar una solución acuosa de una sal aniónica, tal como NH_4HCO_3, $HCOONH_4$ o NaCl.

La fracción de α-glucano se puede obtener a partir de una fracción eluida obtenida por elución con un disolvente de elución que tiene una fuerza iónica baja (Fracción A). Como el disolvente de elución que tiene una fuerza iónica baja, por ejemplo, por ejemplo, en el caso de que se utilice HCO_3^- como el anión, se puede usar un disolvente de elución con una concentración de anión de 50 a 150 mM, y la concentración de anión es preferentemente de 75 a 125 mM, más preferentemente de 90 a 110 mM, y particularmente preferentemente 100 mM.

La fracción eluida obtenida (Fracción A) se puede dializar utilizando una membrana de diálisis (por ejemplo, tubo Visking, MWCO: 12.000 a 14.000), seguido de liofilización del no dializado y usar después en un paso posterior.

A continuación, la fracción eluida (Fracción A) se fracciona de acuerdo con el peso molecular utilizando una columna de filtración en gel. Por ejemplo, en el caso de que se use una columna de filtración en gel con un límite molecular de 2 x 10^3 a 4 x 10^5 Da, la fracción de α-glucano se puede obtener a partir de una fracción en una cantidad correspondiente al volumen vacío del primer flujo de salida (Fracción Vo) (Fracción A1). Como la columna de filtración en gel que tiene un límite molecular de aproximadamente 2 x 10^3 a 4 x 10^5 Da, se puede utilizar Sephacryl S-300, Superose 12, o similares, por ejemplo. Se puede crear un patrón de elución de la fracción eluida en el caso

de filtración en gel basándose azúcar, ácido urónico y absorción UV a 280 nm, y la fracción correspondiente a la fracción Vo (Fracción A1) se puede recuperar para la fracción de α-glucano. La fracción obtenida (Fracción A1) puede dializarse adicionalmente por un método habitual y posteriormente liofilizarse.

<Fracción de heteroglicano>

A continuación, se describirá un método para producir la fracción de heteroglicano.

Preferentemente, la fracción precipitada con etanol se utiliza para la purificación (producción) de la fracción de heteroglicano. En lo sucesivo, en el presente documento, se describirá un método para purificar la fracción de heteroglicano tomando el caso de usar la fracción precipitada con etanol como ejemplo.

Primero, la fracción precipitada con etanol se hace pasar a través de una columna llena con una resina de intercambio aniónico como portador para adsorber componentes. Como resina de intercambio aniónico, se prefiere una resina de intercambio iónico fuerte. Por ejemplo, se puede usar una resina que tenga un grupo Q (amonio cuaternario) o un grupo QAE. Los ejemplos específicos de una columna provista con tal portador pueden incluir Q-Sepharose Fast Flow (FF) y QAE-Sepharose FF. Preferentemente, dichos portadores de resina se equilibran con agua de antemano. Por ejemplo, en el caso de QAE-Sepharose FF, la resina se sumerge en hidrogenocarbonato de amonio 2 M para activar los grupos QAE (un ion hidrogenocarbonato que es un contraión se une al grupo de amonio cuaternario unido covalentemente a Sefarosa, es decir, convertido en una forma HCO_3^-), después se lava con agua para eliminar el hidrogenocarbonato de amonio restante, y posteriormente se suspende en agua (equilibrado con agua).

A continuación, se hace pasar un disolvente de elución para eluir los componentes adsorbidos en el portador de tal manera que la fuerza iónica del disolvente de elución aumenta gradualmente. Como disolvente de elución, se prefiere utilizar una solución de una sal aniónica, tal como NH_4HCO_3, $HCOONH_4$ o NaCl.

La fracción de heteroglicano se puede obtener a partir de una fracción eluida obtenida por elución con un disolvente de elución que tiene una fuerza iónica alta. Como el disolvente de elución que tiene una fuerza iónica alta, por ejemplo, en el caso de que se utilice HCO_3^- como el anión, se puede usar un disolvente de elución que tenga una concentración de anión de 200 a 2000 mM. Preferentemente, la fracción de heteroglicano se obtiene purificando por separado una fracción eluida obtenida por elución con un disolvente de elución de 250 a 350 mM (Fracción B) y una fracción eluida obtenida por elución con un disolvente de elución de 1600 a 2000 mM (Fracción C), y posteriormente combinando las Fracciones B y C.

Las fracciones eluidas obtenidas (Fracción B y Fracción C) se pueden dializar utilizando una membrana de diálisis (por ejemplo, tubo Visking, MWCO: 12.000 a 14.000), seguido de liofilización del dializado y usar después en un paso posterior.

A continuación, las fracciones eluidas se fraccionan de acuerdo con el peso molecular utilizando una columna de filtración en gel. Por ejemplo, en el caso de que se use una columna de filtración en gel con un límite molecular de 1 x 10^4 a 1 x 10^6 Da, una fracción diferente a una fracción en una cantidad correspondiente al volumen vacío del primer flujo de salida (fracción Vo) (Fracción B2) se recupera de la Fracción B. Por ejemplo, en el caso de que se use una columna de filtración en gel con un límite molecular de 2 x 10^3 a 4 x 10^5 Da, una fracción en una cantidad correspondiente al volumen vacío del primer flujo de salida (fracción de Vo) (Fracción C1) se recupera de la Fracción C. Los patrones de elución de las fracciones eluidas en caso de filtración en gel pueden crearse basándose en azúcar, ácido urónico y absorción de UV a 280 nm, y pueden recuperarse la fracción diferente a la fracción Vo (Fracción B2) de la Fracción B y la fracción correspondiente a la fracción Vo (Fracción C1) de la Fracción C.

Como la columna de filtración en gel que tiene un límite molecular de aproximadamente 1 x 10^4 a 1 x 10^6 Da, se puede utilizar Sepharose CL-6B, Superose 6, o similares, por ejemplo. Además, como la columna de filtración en gel que tiene un límite molecular de aproximadamente 2 x 10^3 a 4 x 10^5 Da, se puede utilizar Sephacryl S-300, Superose 12, o similares, por ejemplo.

Las fracciones obtenidas por filtración en gel de la Fracción B y Fracción C (Fracción B2 y Fracción C1), respectivamente, se combinan, por lo que se puede obtener la fracción de heteroglicano. La fracción de heteroglicano obtenida puede dializarse adicionalmente por un método habitual y posteriormente liofilizarse.

[Activador de las placas de Peyer]

Una forma del activador de las placas de Peyer de la presente invención no está particularmente limitada; sin embargo, el activador puede estar en forma de líquido o polvo, o puede formarse en una formulación sólida o en una formulación líquida utilizando un vehículo que se usa generalmente para las formulaciones. Se conocen métodos para formar una formulación de este tipo. El activador de las placas de Peyer así obtenido se puede conservar en forma de líquido o polvo. Particularmente en el caso de la forma de líquido, la conservación es preferentemente por almacenamiento refrigerado.

En el caso de que el activador de las placas de Peyer de la presente invención se forme en una formulación sólida, por ejemplo, se puede agregar dextrina, almidón de maíz o salvado de arroz desgrasado al polisacárido del principio activo para preparar la formulación. Se conocen métodos para formar una formulación de este tipo.

El momento de la administración del activador de las placas de Peyer de la presente invención no está particularmente limitado. Una dosis del activador de las placas de Peyer de la presente invención varía según la forma de formulación, el tipo, las condiciones de salud, la edad o el grado de crecimiento de un animal humano o no humano diana, etc., y por lo tanto no está particularmente limitado. Por ejemplo, se pueden administrar de 1 a 1.000 mg en términos del polisacárido del principio activo por kg de peso corporal por día.

Una forma de dosificación del activador de las placas de Peyer de la presente invención no está particularmente limitada; sin embargo, el activador puede administrarse por vía oral, enteral o transnasal, por ejemplo. Además, el activador también puede administrarse en una forma que se retenga fácilmente en la cavidad oral (incluida la goma de mascar, etc.).

El activador de las placas de Peyer de la presente invención tiene un efecto activador de las placas de Peyer y, por lo tanto, también puede usarse como un potenciador inmunitario intestinal, un modificador inmunitario intestinal, un agente de mejora de infección intestinal, un agente de mejora de inflamación, un agente de mejora de infección por virus, un agente de mejora de infección bacteriana, etc., por ejemplo. En particular, a través de su efecto potenciador de la inmunidad intestinal, el activador también se puede utilizar como agente preventivo/terapéutico para infección por plasmodios, por ejemplo.

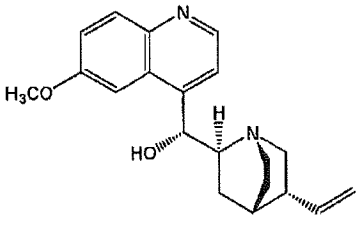
[Medicamento para Prevenir o Tratar la Infección por plasmodios]

El activador de las placas de Peyer de la presente invención puede prevenir o tratar la infección por plasmodios a través del efecto potenciador de la inmunidad intestinal. Por lo tanto, la presente invención puede proporcionar un medicamento para prevenir o tratar la infección por plasmodios que contiene el activador de las placas de Peyer como principio activo.

Los efectos combinados se obtienen utilizando el medicamento para prevenir o tratar la infección por plasmodios en combinación con un agente antipalúdico existente. Por lo tanto, el medicamento se puede usar para ser usado en combinación con un agente antipalúdico existente.

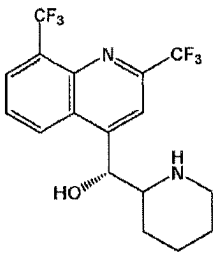
Los ejemplos de agentes antipalúdicos incluyen quinina (un compuesto representado por la siguiente fórmula (1)), mefloquina (un compuesto representado por la siguiente fórmula (2)), sulfadoxina (un compuesto representado por la siguiente fórmula (3)), pirimetamina (un compuesto representado por la siguiente fórmula (4)), cloroquina (un compuesto representado por la siguiente fórmula (5)), primaquina (un compuesto representado por la siguiente fórmula (6)), artesunato (un compuesto representado por la siguiente fórmula (7)), arteméter (un compuesto representado por la siguiente fórmula (8)), y lumefantrina (un compuesto representado por la siguiente fórmula (9)). Estos agentes antipalúdicos pueden usarse solos o en combinación de dos o más de los mismos.

[Fórmula Química 1]



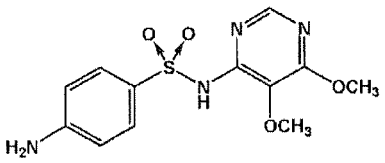
(1)

[Fórmula química 2]



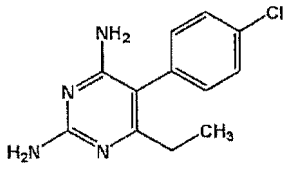
(2)

[Fórmula química 3]



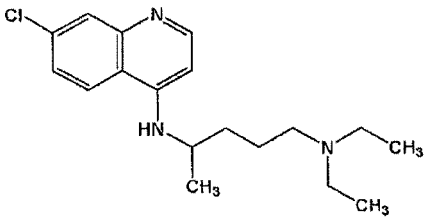
(3)

[Fórmula química 4]



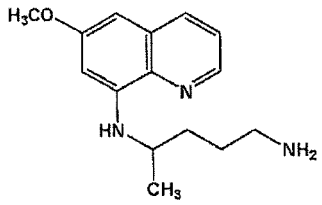
(4)

[Fórmula química 5]



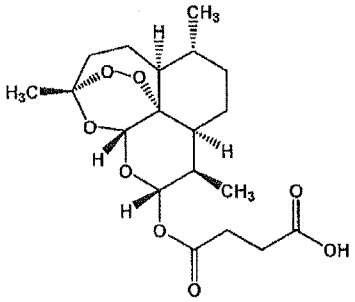
(5)

[Fórmula química 6]



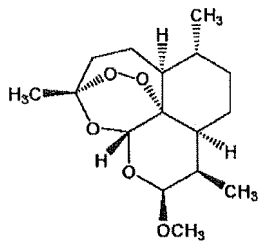
(6)

[Fórmula química 7]



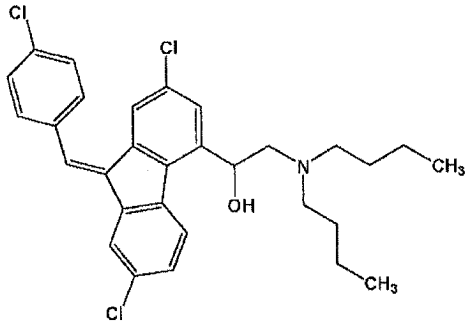
(7)

[Fórmula química 8]



(8)

[Fórmula química 9]



(9)

Se prefiere que contenga artesunato como agente antipalúdico, porque el efecto combinado con el medicamento para prevenir o tratar la infección por plasmodios de la presente invención es alto. Además, el medicamento para prevenir o tratar la infección por plasmodios de la presente invención se usa más preferentemente para usarse en combinación con artesunato.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con mayor detalle basándose en los Ejemplos. Sin embargo, pero la presente invención no se limita a estos ejemplos.

[Ejemplo de Prueba 1: Prueba del Efecto Activador de las Placas de Peyer de la Fracción Precipitada con Etanol del Extracto Derivado de Caña de Azúcar]

<Producción de Extracto Derivado de Caña de Azúcar>

(Fraccionamiento de Segundas Melazas por Separación por Lotes de una Sola Columna Usando Resina de Intercambio Iónico)

Usando un líquido tratado con segunda melaza obtenido en una fábrica de azúcar en bruto como materia prima, la separación por fraccionamiento mediante cromatografía en columna de intercambio iónico se realizó mediante un método de separación por lotes de una sola columna usando un sistema FPLC (fabricado por Pharmacia Corporation). El líquido tratado con la segunda melaza utilizado como materia prima es aquel obtenido diluyendo una segunda melaza, seguido de purificación con carbonato de sodio y filtración con tierra de diatomeas. La materia prima líquida se analizó para tener los siguientes valores: Brix (Bx): 47,4, contenido de azúcar (Pol.): 23,2, pureza del azúcar (Pureza): 48,9, contenido de azúcar reductor: 3,2 %.

Se llenó una columna con 500 ml de una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida de tipo gel (nombre comercial: UBK530, tipo ion sodio, Mitsubishi Chemical Corporation). La columna tenía un diámetro interior de 26 mm y una altura de 1000 mm y estaba provista de un adaptador de flujo. Las condiciones de paso del líquido fueron las siguientes: utilizando agua destilada desgasificada como eluato, el líquido se hizo pasar a un caudal de SV = 0,5 hr^{-1} (4.17 ml/min) a una temperatura de 60 °C.

Se suministraron aproximadamente 25 ml de la materia prima a la columna de intercambio iónico. Las condiciones de fraccionamiento fueron las siguientes: el eluato comenzó a recuperarse 30 minutos después del suministro de la materia prima y se recuperó durante 3,6 minutos por tubo de ensayo (aproximadamente 15 ml/tubo de ensayo) y se recuperó en 30 tubos de ensayo en total.

La absorbancia a una longitud de onda de 420 nm, la conductividad eléctrica y los contenidos de azúcar (sacarosa, Glc, Fru) (% en masa basado en la masa total de sólidos de todas las fracciones) se midieron para cada una de las 30 fracciones obtenidas (fracciones 1 a 30), y los resultados se muestran en la Fig. 6. En este caso, en la medición

de la absorbancia, se agregaron 0,1 ml de cada fracción a 2 ml de un tampón fosfato 0,5 mM (pH 7,5) y se usaron como una muestra de medición. En la medición de la conductividad eléctrica, cada fracción se diluyó con agua destilada al 0,5% y se usó como una muestra de medición. Los contenidos de azúcar se midieron por un método habitual usando HPLC.

Las 30 fracciones obtenidas se recogieron de la siguiente manera para obtener las Muestras 1 a 8.

Muestra 1: Fracciones 3 y 4.
Muestra 2: Fracciones 5 y 6.
Muestra 3: Fracciones 7 y 8.
Muestra 4: Fracciones 9 y 10.
Muestra 5: Fracciones 11 y 12.
Muestra 6: Fracciones 13 y 14.
Muestra 7: Fracciones 15 y 16.
Muestra 8: Fracciones 17 a 30.

Incidentalmente, las Fracciones 1 y 2 no tenían componentes a eluir y, por lo tanto, se descartaron.

Cada muestra se liofilizó durante la noche en un polvo. Se disolvieron 0,25 g del polvo liofilizado obtenido en un tampón fosfato 0,5 mM (pH 7,5) para obtener 100 ml, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación. La absorbancia de la muestra 8 fue tan alta como 0,86, y esto se debe a que la muestra es una colección de componentes posteriores. Mientras que otras muestras están compuestas por dos fracciones cada una, la Muestra 8 es una colección de 14 fracciones. Por lo tanto, aunque la absorbancia a 420 nm es alta, es ineficaz recuperar estas fracciones.

Los resultados del análisis de cada muestra se muestran en la siguiente Tabla 1. El contenido de ceniza de conductividad eléctrica en la Tabla 1 se calculó a partir de un coeficiente determinado a partir de una curva de calibración de la relación entre conductividad eléctrica y ceniza sulfatada conocida. En la Tabla 1, la distribución de sólidos liofilizados es una proporción (%) de la masa de sólidos de cada muestra en relación con la masa total de sólidos de todas las muestras. El contenido de ceniza de conductividad eléctrica y el contenido de cada azúcar (Sacarosa, Glc, Fru) son cada uno una proporción (% en masa) con respecto a la masa de sólidos de cada muestra. Del contenido de cada azúcar (Sacarosa, Glc, Fru), se entiende que las Muestras 1 a 3 corresponden a fracciones sin azúcar, y las muestras 4 a 8 son fracciones de azúcar. "Azúcar" se refiere, en el presente documento, a monosacáridos y sacarosa.

[Tabla 1]

Análisis de Segundas Muestras de Jarabe Fraccionadas por Resina de Intercambio Iónico

	Distribución de sólidos liofilizados (%)	Contenido de cenizas de conductividad eléctrica (%)	Contenido de sacarosa (%)	Contenido de Glc (%)	Contenido de Fru (%)	Absorbancia
Muestra 1	3,1	32,9	0	0	0	2,72
Muestra 2	7,2	39,7	0	0	0	2,01
Muestra 3	10,7	51,4	10,4	0	0	0,83
Muestra 4	21,9	32,6	45,6	1,4	0,7	0,33
Muestra 5	25,9	18,8	64,2	2,9	1,3	0,16
Muestra 6	19,6	10	73,5	4,7	2,3	0,11
Muestra 7	8,4	3,5	74	6,2	3,2	0,14
Muestra 8	3,1	3,3	29,8	4,5	4,4	0,86
Líquido de separación por cromatografía de iones	-	43,7	5,9	0,9	1,4	1,04

(Separación Mediante Cromatografía en Columna de Lecho Móvil Simulado Utilizando Resina de Intercambio Iónico)

Usando como materia prima una segunda melaza que se obtiene en una fábrica de azúcar en bruto recuperando los cristales de sacarosa dos veces en un bote de cristalización y eliminando los cristales por centrifugación, la separación por cromatografía en columna de intercambio iónico se realizó mediante un método de separación continua simulada en lecho móvil utilizando una columna de separación llena con una resina de intercambio catiónico.

Las etapas desde la preparación de la materia prima hasta la separación por cromatografía de intercambio iónico se realizan de forma continua, y por lo tanto la concentración de sólidos o la composición del líquido en cada etapa

varía ligeramente con el tiempo; sin embargo, la siguiente concentración y composición son valores medidos en la operación en equilibrio.

La segunda melaza tenía un Brix (Bx.) de alrededor de 85. Esta concentración es demasiado alta para el tratamiento de cromatografía en columna y, por lo tanto, la segunda melaza se diluyó a un Brix de aproximadamente 50. Se agregaron cal apagada y carbonato de sodio para agregar impurezas, seguido de filtración con tierra de diatomeas. El filtrado obtenido tenía un Brix de 47,3, un contenido de azúcar (Pol.) de 23,6, una pureza de azúcar (Pureza) de 49,9, y un contenido de azúcar reductor de 2,5%. El filtrado se usó como materia prima para la cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico se realizó mediante un método de separación continua de lecho móvil simulado utilizando UBK530 (Mitsubishi Chemical Corporation) como resina de intercambio catiónico. Una columna de separación llena de resina se divide en ocho partes, y la cantidad de resina por columna es de 6,5 m^3. El suministro del líquido de la materia prima y un eluyente (agua) y las posiciones de extracción de una fracción de sacarosa y una fracción sin sacarosa se cambiaron cada tiempo fijo, por lo que el suministro y la extracción se realizaron de forma continua. Los valores preestablecidos en un estado de equilibrio fueron los siguientes: caudal de suministro: 3 m^3/hora, caudal de agua eluyente: 13,5 m^3/hora, caudal de extracción de fracción sin sacarosa: 12,13 m^3/hora, caudal de extracción de fracción de sacarosa: 4,37 m^3/hora, hora de conmutación: 267 segundos. Como resultado de este tratamiento de cromatografía, se separaron una fracción de sacarosa y una fracción sin sacarosa. Estas corresponden a las Fracciones 10 a 17 (fracción de sacarosa) y una colección de Fracciones 1 a 9 y Fracciones 18 a 30 (fracción sin sacarosa) en la Fig. 6, respectivamente. En la fracción de sacarosa, la sacarosa fue de aproximadamente el 87% del contenido de sólidos (según el análisis de HPLC) y el Brix fue de alrededor de 35. Esta fracción se mezcló con un zumo purificado, se devolvió a la etapa y se sometió nuevamente a la operación de recuperación de sacarosa. Además, la fracción sin sacarosa obtenida tenía un contenido de sacarosa de aproximadamente el 0,3% (según el análisis de HPLC) y un Brix de aproximadamente 8. Esta fracción sin sacarosa se concentró en un bote para tener un Brix de 40,0, un contenido de azúcar (Pol.) de 2,3, una pureza de azúcar (Pureza) de 5,8, y un contenido de azúcar reductor de 5,4 %. Esta fracción sin sacarosa se usó como un extracto derivado de caña de azúcar. El extracto derivado de caña de azúcar se liofilizó durante la noche para usarse en una prueba posterior. Se disolvieron 0,25 g del polvo liofilizado obtenido en un tampón fosfato 0,5 mM (pH 7,5) para obtener 100 ml de solución, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm. La absorbancia fue 1,11.

<Preparación de la Fracción Precipitada con Etanol>

Se añadió agua purificada al extracto derivado de caña de azúcar (peso liofilizado: 418,57974 g) para producir una cantidad total de 500 ml, se añadió una cantidad cuatro veces mayor de etanol con agitación y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se realizó una centrifugación (6.000 rpm, 4 °C, 30 minutos), seguida de diálisis del precipitado obtenido con agua corriente y agua purificada (7 días) y liofilización de la fracción no dializada para obtener una fracción precipitada con etanol (también denominada "SCE-4") (cantidad producida: 20,11 g, rendimiento: 4,8 %).

<Preparación de SCE-4 degradado en cadena de sacáridos>

La fracción precipitada con etanol (SCE-4) (50,45 mg) se disolvió en un tampón acetato 50 mM (pH 4,5, 30 ml), y posteriormente se añadió un tampón acetato 50 mM (10 ml) que contenía $NaIO_4$ 100 mM a 4 °C, seguido de agitación durante 96 horas en un lugar oscuro y oxidación con peryodato. Se añadió etilenglicol (1 ml) a la solución de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para descomponer el exceso de $NaIO_4$. A continuación, la mezcla de reacción se dializó durante 2 días usando agua purificada, y el no dializado se concentró a presión reducida. Además, se añadió $NaBH_4$ (180 mg) y se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, y se añadió gota a gota ácido acético para provocar la neutralización. El líquido de reacción se dializó adicionalmente durante 3 días usando agua purificada, y posteriormente el no dializado se liofilizó para obtener un óxido de peryodato (SCE-4 degradado en cadena de sacáridos) (cantidad producida: 31,99 mg, rendimiento: 62,76 %).

<Preparación de SCE-4 Deslignificado>

La fracción precipitada con etanol (SCE-4) (50,59 mg) se disolvió en una solución acuosa al 4% de ácido acético (50 ml) y posteriormente se añadió $NaClO_2$ (250 mg), seguido de agitación durante 40 minutos en un baño de agua a 70 °C. El líquido de reacción se neutralizó usando NaOH 3 M con enfriamiento con hielo. El líquido de reacción se dializó con agua corriente durante la noche y posteriormente se dializó durante 4 días usando agua purificada, y el no dializado se liofilizó para obtener una fracción de polisacárido deslignificado (SCE-4 deslignificado) (cantidad producida: 22,39 mg, rendimiento: 44,14 %).

<Preparación y Cultivo de Células de las Placas Peyer de Ratón>

Un ratón C3H/HeJ se sometió a eutanasia con isoflurano (anestésico por inhalación de Escaína, Mylan Pharmaceuticals) y, posteriormente, las placas de Peyer se extrajeron del intestino delgado con tijeras para oftalmología. Estas placas de Peyer se colocaron en una placa de petri esterilizada complementada con un medio de

cultivo RPM1 1640 enfriado con hielo (2 ml) que contenía suero bovino fetal al 5% (FBS) enfriado con hielo y se trituraron en una rejilla de acero inoxidable (200 rejillas) usando parte de goma de un cilindro interno de una jeringa de inyección desechable de 5 ml, mediante lo cual se liberaron las células de las placas de Peyer. La suspensión celular se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y se agitó en un mezclador vorticial durante un corto período de tiempo. La suspensión celular se filtró a través de una rejilla de acero inoxidable (150 rejillas) y posteriormente se centrifugó (1.500 rpm, 4 °C, 7 minutos) y el medio de cultivo se decantó para obtener las células delas placas de Peyer. Las células se lavaron repitiendo el mismo procedimiento cuatro veces en total utilizando un medio de cultivo RPMI 1640 que contenía FBS (10 ml) y posteriormente se filtraron a través de una rejilla de acero inoxidable (200 rejillas). Usando esta suspensión celular (20 µl), el número de células se contó mediante un contador de células, y posteriormente se preparó una suspensión de células de placas de Peyer que tenía 1 a 2 x 10^6 células/ml utilizando un medio de cultivo RPMI 1640 que contenía FBS.

Se añadió a una placa de cultivo de 96 pocillos (3072, FALCON), la suspensión de células de las placas de Peyer (180 µl/pocillo) y una solución de muestra de polisacárido (20 µl/pocillo, concentración final de polisacárido: 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml) y el cultivo se realizó a 37 °C durante 2 a 6 días en CO_2 al 5% y aire al 95%. El sobrenadante de cultivo se transfirió a otra placa de cultivo de 96 pocillos y se conservó a -20 °C hasta su uso. Se usó como control un sobrenadante de cultivo obtenido mediante la adición de un disolvente de inyección (20 µl/pocillo) en lugar de la solución de polisacárido y la realización del cultivo.

<Preparación de Células de la Médula Ósea de Ratón>

Después de someter a eutanasia a un ratón C3H/HeJ (hembra de 7 semanas) con isoflurano, se escindió el fémur y se usó una jeringa de inyección de 5 ml equipada con una aguja de inyección de 23 G, se extrajeron las células de la médula ósea del fémur con un medio de cultivo RPMI 1640 que contiene FBS (5 ml) y se recogieron. Las células de la médula ósea se dispersaron en un mezclador vorticial, posteriormente se filtraron a través de una rejilla de acero inoxidable (200 rejillas) y después se centrifugaron (1.200 rpm, 4 °C, 7 minutos) para recuperar las células de la médula ósea. Después de repetir el mismo procedimiento tres veces para lavar las células, las células de la médula ósea se suspendieron en un medio de cultivo RPMI 1640 que contenía FBS (10 ml), se contó el número de células mediante un contador de células y, posteriormente, se preparó una suspensión de células de médula ósea (5 x 10^5 células/ml) utilizando un medio de cultivo RPMI 1640 que contenía FBS.

<Prueba del Efecto Activador de las Placas de Peyer>

Se añadió a una placa de cultivo de 96 pocillos, el sobrenadante del cultivo celular de las placas de Peyer (50 µl/pocillo), la suspensión de células de médula ósea (5 x 10^5 células/ml, 100 µl/pocillo) y un medio de cultivo RPMI 1640 que contenía FBS (50 µl/pocillo) y se realizó el cultivo a 37 °C durante 6 días en CO_2 al 5% y aire al 95%. Después de agregar Azul Alamar (20 µl/pocillo, Biosource) a la suspensión de células de médula ósea cultivada y realizar el cultivo a 37 °C durante 6 a 24 horas en CO_2 al 5% y aire al 95%, se midió una cantidad de la sustancia fluorescente resultante por un lector de placa fluorescente (Infinite M200, Tecan, longitud de onda de excitación; 544 nm, longitud de onda de medición; 590 ejecuciones), y el número de células de médula ósea crecidas como la intensidad de fluorescencia relativa obtenida se tomó como una cantidad de factor promotor del crecimiento de células de la médula ósea.

<Prueba Estadística>

Todos los resultados en los ejemplos se muestran como un promedio ± D.E. Las diferencias estadísticamente significativas entre el control y las muestras de prueba se analizaron por el PLSD de Fisher después de la prueba ANOVA.

<Resultados>

La Fig. 1 muestra los resultados de la prueba de efecto activador de las placas de Peyer. La cantidad del factor promotor del crecimiento celular de la médula ósea se muestra como el efecto activador de las placas de Peyer. En la fracción precipitada con etanol (SCE-4), se observó el efecto activador de las placas de Peyer. Al mismo tiempo, En el caso donde la cadena de sacáridos de SCE-4 se degradara (SCE-4 degradado en cadenas de sacáridos), la actividad disminuía significativamente a un nivel tal que no hay una diferencia significativa con respecto al control. Además, en el caso de que la SCE-4 se deslignificara (SCE-4 deslignificado), se observó la actividad. Estos resultados sugieren que una sustancia que tiene el efecto activador de las placas de Peyer está contenida en el componente que contiene polisacáridos de la fracción precipitada con etanol (SCE-4) en el extracto derivado de caña de azúcar.

[Ejemplo 1 de Producción: Preparación de la fracción de α-glucano y la Fracción de Heteroglucano]

<Preparación de la Fracción Precipitada con Etanol>

Se obtuvo un extracto derivado de caña de azúcar de la misma manera que en el Ejemplo de prueba 1. Se añadió

agua purificada al extracto derivado de caña de azúcar (peso liofilizado: 418,57974 g) para producir una cantidad total de 500 ml, se añadió una cantidad cuatro veces mayor de etanol con agitación y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se realizó una centrifugación (6.000 rpm, 4 °C, 30 minutos), seguida de diálisis del precipitado obtenido con agua corriente y agua purificada (7 días) y liofilización de la fracción no dializada para obtener una fracción precipitada con etanol rojo pardusco (SCE-4) (cantidad producida: 20,11 g, rendimiento: 4,8 %).

< Preparación de la fracción de α-glucano y la Fracción de Heteroglicano>

Se prepararon una fracción de α-glucano ("Fracción A1" en la Fig. 2) y una fracción de heteroglicano ("Fracción X" en la Fig. 2) a partir de la fracción precipitada con etanol (SCE-4) de acuerdo con el esquema que se muestra en la Fig. 2.

Se añadió SCE-4 (5,0 g) y se hizo pasar a través de QAE-Sepharose FF (5,5 id x 26 cm), y posteriormente, los componentes adsorbidos se eluyeron gradualmente usando secuencialmente NH_4HCO_3 100 mM (6 l), NH_4HCO_3 300 mM (10 l) y NH_4HCO_3 1,8 M (10 l). Las fracciones fraccionadas se dializaron utilizando una membrana de diálisis (tubo Visking, MWCO: 12.000 a 14.000) y, posteriormente, se liofilizó el no dializado para obtener fracciones fraccionadas (Fracción A, Fracción B y Fracción C).

Fracción A (fracción eluida con $NH_4HCO_3$100 mM): 0,86 g, 17,2 %
Fracción B (fracción eluida con NH_4HCO_3 300 mM): 0,66 g, 13,2 %.
Fracción A (fracción eluida con $NH_4HCO_3$1,8 mM): 1,04 g, 20,8 %.

(Fracción de α-glucano)

La fracción A se añadió a Sephacryl S-300 (2,6 i.d. x 90 cm) equilibrada con una solución de NaCl 0,2 M, y posteriormente se eluyó con NaCl 0,2 M. De acuerdo con un patrón de elución de la fracción eluida creada en base al contenido relativo de azúcar, el contenido relativo de ácido urónico y la absorción de UV a 280 nm medida por un método habitual, se recuperaron las fracciones fraccionadas. Se obtuvo una fracción eluida de Vo como una fracción de α-glucano ("Fracción A1" en la Fig. 2) en forma de un polvo liofilizado de color blanco (cantidad producida: 0,2166 g, rendimiento: 4,3 %).

(Fracción de Heteroglicano)

La fracción B se fraccionó a través de Sepharose CL-6B (2,6 i.d. x 90 cm) equilibrada con una solución de NaCl 0,2 M para obtener una fracción intermedia ("Fracción B2" en la Fig. 2) (cantidad producida: 0,02141 g, rendimiento: 0,41 %).

Al mismo tiempo, la fracción C se fraccionó a través de Sephacryl S-300 (2,6 i.d x 90 cm) equilibrada con NaCl 0,2 M para obtener una fracción eluida de Vo ("Fracción C1" en la Fig. 2) (cantidad producida: 0,16395 g, rendimiento: 3,28 %).

La Fracción B2 y la Fracción C1 se combinaron para obtener una fracción de heteroglicano en forma de un polvo liofilizado de color blanco ("Fracción X" en la Fig. 2) (cantidad producida: 0,1842 g, rendimiento: 3,68 %).

[Ejemplo de Prueba 2: Análisis de la fracción de α-glucano y de la Fracción de Heteroglicano]

<Medición de la Distribución del Peso Molecular>

La distribución del peso molecular de las muestras de prueba (la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano) se analizó mediante cromatografía de filtración en gel de alta velocidad (HPSEC) utilizando una columna acoplada de Asahipak GS710 y Asahi-pak GS620 (0,76 i.d. x 60 cm cada) (Showa Denko). El peso molecular se calculó a partir del tiempo de retención de una muestra de prueba basándose en una curva de calibración del coeficiente de peso molecular/tiempo de retención (Kav) creado a partir del tiempo de retención de un polisacárido natural (pullulan P-800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 y 5, Showa Denko) en HPSEC.

Las condiciones de HPSEC son las siguientes.
Sistema de bombeo; JASCO PV-980 (Jasco)
Detector; Shodex RI SE-62 (Showa Denko) (sensibilidad: x2)
Eluyente; NaCl 0,2 M(1,0 ml/min)

<Colorimetría>

Se midieron la cantidad total de azúcar, la cantidad de ácido urónico y la cantidad de proteína mediante el método de fenol-H_2SO_4, el método m-hidroxibifenilo y el método Bradford, respectivamente. Como muestras auténticas, se usó Glc para el método de fenol H_2SO_4, GalA para el método de m-hidroxibifenilo y gammaglobulina bovina (Bio-Rad)

para el método Bradford.

<Análisis de Azúcares Componentes>

Los azúcares componentes se analizaron mediante el método de metilglucósido TMS.

Una mezcla patrón de monosacáridos (Glc, Gal, GlcA, GalA, Ara, Fuc, Xyl, Man y Rha, 5 µg cada uno) y muestras de prueba (50 a 100 µg cada una) se transfirieron cada una en un tubo de ensayo de tapa de rosca de 13 mm, además se añadió una solución de mioinositol (patrón interno: 20 µl, 1 mg/ml) y posteriormente, el disolvente se eliminó por destilación completamente a presión reducida. Se añadió una solución de HCl-MeOH 1 M (100 a 300 µl, Wako Pure Chemical Industries) a cada tubo de ensayo y se sometió a metanolisis en condiciones herméticamente selladas (80 °C, 15 horas). Se añadió *Terc*-BuOH (5 µl) a la solución de reacción, y el disolvente se eliminó por destilación en una corriente de nitrógeno gaseoso (40 °C), seguido de la adición de un reactivo Tri-Sil (100 µl, Pierce) y la reacción se realizó condiciones herméticamente selladas (80 °C, 20 minutos). El reactivo se eliminó por destilación en una corriente de nitrógeno gaseoso (40 °C), posteriormente se añadió hexano (2 ml) al producto de reacción, y la mezcla se trató por ultrasonidos durante unos segundos para extraer un derivado de TMS. Los materiales insolubles en el extracto se eliminaron por centrifugación (2.000 rpm, 4 °C, 5 minutos), posteriormente el disolvente se eliminó por destilación en una corriente de nitrógeno gaseoso (40 ° C) y la solución de hexano obtenida del derivado de TMS se analizó mediante Cromatografía de gases (GLC). Cada derivado de monosacárido se identificó por comparación con el tiempo de retención de un derivado patrón, y se calculó una proporción (% en moles) del área máxima y un factor de respuesta a un detector de FID de cada derivado de monosacárido obtenido en cada experimento.

Las condiciones de GLC son las siguientes.

Instrumento; Cromatógrafo de gases HP5890 Series II (Hewlett Packard)
Columna; Columna de capilaridad DB-1 (0,25 mm i.d. x 30 m, grosor de membrana líquida: 0,25 µm, J&W Scientific Inc.)
Gas portador; He (caudal total; 80 ml/min, presión de entrada de la columna; 21 psi, pureza del gas; 99,9999 %)
temperatura de entrada; 250 °C
Temperatura del detector; 280 °C.
Programa de temperatura del horno; 60 °C (1 minuto), 60 °C → 170 °C (30 °C/min), 170 °C → 190 °C (1°C/min), 190 °C → 300 °C (30 °C/min), 300 °C (5 minutos)

<Análisis de Metilación>

El análisis de metilación para el análisis del patrón de enlace de azúcares se realizó de acuerdo con el siguiente método modificado del método de Hakomori y el método de Waeghe et al.

(Metilación del Polisacárido usando Metilsulfinilcarbanión de Sodio)

Después de colocar una muestra de prueba (500 µg) en un tubo de ensayo con tapón de rosca (15 i.d. x 100 mm) y secar a presión reducida en un desecador durante la noche, se añadió dimetilsulfóxido anhidro (DMSO seco, Sigma) y la mezcla se trató por ultrasonidos en una corriente de nitrógeno gaseoso en condiciones herméticamente selladas durante 15 minutos y se calentó a una temperatura de 50 a 60 °C hasta que la muestra se disolvió por completo (unas pocas horas hasta un día y una noche). Se añadió a la solución de muestra metilsulfinilcarbanión sódico (500 µl) y se trató por ultrasonidos durante 1 hora en una corriente de nitrógeno gaseoso, y posteriormente la mezcla se dejó reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras la reacción, utilizando una pequeña cantidad del líquido de reacción (5 a 10 µl), se confirmó el exceso de metilsulfinilcarbanión sódico restante con un reactivo de trifenilmetano (Wako Pure Chemical Industries). En el caso en que el metilsulfinilcarbanión sódico fue insuficiente, se añadió más metilsulfinilcarbanión sódico, y la operación mencionada anteriormente se repitió hasta que quedó un exceso de metilsulfinilcarbanión sódico. La mezcla de reacción se congeló y posteriormente se añadió CH_3I (yodometano, Yanagishima Pharmaceuticals Co., Ltd., grado especial, 1 ml) y la mezcla se trató por ultrasonidos en una corriente de nitrógeno gaseoso en condiciones herméticamente selladas durante 15 minutos y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas o más. Una vez completada la reacción, el CH_3I en el líquido de reacción se eliminó por destilación a presión reducida y se congeló con enfriamiento con hielo, y se añadió agua purificada en una cantidad equivalente a la cantidad total de DMSO y metilsulfinilcarbanión usado para descomponer el metilsulfinilcarbanión restante y detener la reacción. Además, se añadió $Na_2S_2O_3$ saturado (de aproximadamente 250 µl) al líquido de reacción hasta que desapareció el color amarillo del líquido.

(Recuperación de Polisacárido Completamente Metilado)

El cartucho Sep-pak C18 (1 ml, Waters Associate Inc.) se lavó con etanol destilado (10 ml x 4) y luego con agua (2 ml x 3), y posteriormente, la mezcla de reacción de metilación se pasó a través del cartucho para adsorber el polisacárido metilado en el cartucho. El cartucho se lavó con DMSO al 50% (2 ml x 5) y después con agua (2 ml x 5), y posteriormente, el polisacárido metilado se eluyó usando etanol destilado (2 ml x 3) y posteriormente el disolvente

se eliminó por destilación a presión reducida para obtener un polisacárido totalmente metilado.

(Reducción del Grupo Carboxilo del Ácido Urónico en el Polisacárido Metilado)

Los grupos carboxilo de restos de ácido urónico en el polisacárido totalmente metilado se redujeron a un alcohol primario deuterado mediante el siguiente método. Es decir, la muestra de polisacárido completamente metilado se disolvió en etanol al 95% (0,21 ml) y tetrahidrofurano (THF, 0,51 ml), y posteriormente se añadió borodeuteruro de sodio ($NaBD_4$, 1,8 mg) y se mezcló, seguido de reacción durante 18 horas o más a temperatura ambiente y calentamiento adicional a 70 °C durante 1 hora para reducir los grupos carboximetilo. El líquido de reacción se neutralizó con ácido acético y se agregaron de 7 a 8 gotas de ácido acético para detener la reacción. La solución de reacción se secó y se endureció a presión reducida, y posteriormente, para eliminar el ácido bórico producido, se repitió, al menos cuatro veces, la operación de agregar metanol destilado (1 ml) al producto de reacción y eliminar por destilación el disolvente del producto a presión reducida. Después de disolver el producto con una solución de DMSO al 50%, se recuperó un polisacárido totalmente metilado reducido con carboxilo de la misma manera que el método descrito en (Recuperación de Polisacárido Totalmente Metilado).

(Derivatización del Polisacárido Completamente Metilado a un Compuesto de Acetato de Alditol Parcialmente Metilado y Análisis)

El polisacárido totalmente carboxilado reducido con carboxilo obtenido se calentó a 121 °C durante 1 hora en condiciones herméticamente selladas en un tubo de ensayo con tapón de rosca (15 i.d x 100 mm) usando ácido trifluoroacético 2 M (TFA, 1 ml) para provocar la hidrólisis. Una vez completada la reacción, la solución de reacción enfriada a temperatura ambiente se secó y se endureció a presión reducida y se secó adicionalmente a presión reducida durante 30 minutos en un desecador para eliminar el TFA restante. El hidrolizado obtenido se disolvió en etanol al 95% (destilado, 1 ml) y se agregaron de 7 a 8 gotas de amoníaco acuoso al 25% para convertirlo en amoniaco alcalino, seguido de la adición de un exceso de borohidruro de sodio ($NaBH_4$) y reacción a temperatura ambiente durante 4 horas o más. Se añadió gota a gota una solución de ácido acético al líquido de reacción para descomponer el $NaBH_4$ restante, posteriormente, se agregaron de 7 a 8 gotas adicionalmente y el disolvente se eliminó por destilación mediante secado y endurecimiento a presión reducida. Se añadió metanol (1 ml) al producto de reacción y se repitió la operación de eliminación por destilación del disolvente a presión reducida cuatro veces para eliminar el ácido bórico producido. El producto de reacción se secó a presión reducida en un desecador durante 1 hora y, posteriormente, se añadió anhídrido acético, y la mezcla se calentó y se dejó reaccionar a 121 °C durante 3 horas en condiciones herméticamente selladas para provocar la acetilación. La solución de reacción se dejó reposar a temperatura ambiente, posteriormente, se añadió tolueno (1 ml) y se mezcló, y el anhídrido acético se eliminó a 40 °C en una corriente de aire. Se añadieron agua (1 ml) y $CHCl_3$ (2 mb) al producto de reacción para la partición líquido-líquido, seguido de centrifugación (4 °C, 2.500 rpm, 5 minutos), y posteriormente la capa acuosa superior se eliminó por succión. Además, la capa de $CHCl_3$ se lavó de cuatro a cinco veces usando agua (1 ml) y, posteriormente, el $CHCl_3$ se eliminó por destilación a presión reducida para obtener un derivado de acetato de alditol parcialmente metilado. El derivado se analizó mediante cromatografía de gases (GLC) y cromatografía de gases/espectrometría de masas (GLC-MS) en las siguientes condiciones. El acetato de alditol metilado se identificó por comparación con una muestra de iones de fragmentos auténticos y por comparación con el tiempo de retención relativo al 2,3,4,6-tetra-OMe-1,5-di-OAc-galactitol. Las proporciones molares de los azúcares metilados (% en moles) se determinaron cada uno por área de máximo y un factor de respuesta a FED.

GLC:

Instrumento; Cromatógrafo de gases HP5890 Series II (Hewlett Packard)
Columna de capilaridad; Columna de capilaridad SP-2380 (0,25 mm i.d x 30 m, grosor de membrana líquida: 0,25 µm, SPELCO/ALDRICH)
Gas portador; He (caudal total; 80 ml/min, presión de entrada de la columna; 10 psi, pureza del gas; 99,9999 %)
Temperatura del inyector; 250 °C Temperatura del detector; 250 °C
Temperatura del horno; 60 °C (1 min), 60 °C → 150 °C (30 °C/min), 150 °C → 250 °C (1,5 °C/min), 250 °C (1 min)

MS:

Espectrómetro de masas; Detector Selectivo de Masas HP5970 B (70 eV, 280 °C)

<Resultados>

Los resultados del análisis de la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano se muestran en la Tabla 2 y la Tabla 3. Además, los resultados de la medición de la distribución del peso molecular de la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano se muestran en la Fig. 7 y la Fig. 8.

[Tabla 2]

Tabla 2.

	Fracción Precipitada con Etanol(SCE4)	Fracción de α-glucano	Fracción de heteroglicano
Peso molecular máximo	No determinado	900000	4800000 y 830000
Carbohidrato (%) como Glc	78,1	84,8	52,2
Ácido Urónico (%) como GalA	3,5	3,2	7,2
Proteína (%) como gamma globulina bovina	35,2	5,0	5,9
Proporción de azúcares componentes (% en mol.)			
Ara	20,8	2,2	24,7
Rha	1,8	1,4	3,3
Fuc	0,6	1,6	1,8
Xyl	10,0	1,5	9,9
GlcA	3,0	2,4	6,0
GalA	0,7	-	1,4
Man	4,0	3,4	11,3
Gal	14,1	3,6	9,5
Glc	45,0	83,9	32,1

[Tabla 3]

Tabla 3. Patrón de Unión del Azúcar de la Fracción α-Glucano y la Fracción de Heteroglicano

		Mol. %	
Resto de azúcar	Patrón de unión	Fracción de α-glucano	Fracción de heteroglicano
Arabinosa	Terminal no reductor (furanosa)	-	21,9
	Terminal no reductor (piranosa)	-	7,2
	4- or 5-unido	-	7,5
	2-unido (furanosa)	-	3,5
Xilosa	4- or 5-unido	-	3,0
	3-unido (piranosa)	-	2,5
Fucosa	Terminal no reductor	-	3,1
Manosa	Terminal no reductor	3,8	3,3
	2-unido	4,3	-
	3-unido	3,7	1,6
	4-unido	-	1,4
	4,6-Ramificado	-	0,3
Galactosa	Terminal no reductor	5,3	7,3
	3-unido	3,4	3,4
	4-unido	-	0,9
	6-unido	3,2	4,8
	2,6-Ramificado	2,1	1,3
	3,6-Ramificado	3,0	9,3
	4,6-Ramificado	-	0,6
	3,4,6-Ramificado	-	1,9
Glucosa	Terminal no reductor	25,2	3,6
	3-unido	6,2	2,2
	4-unido	5,8	3,0
	6-unido	19,8	4,1
	2,6-Ramificado	6,4	0,6
	4,6-Ramificado	5,1	0,3
	3,4,6-Ramificado	2,7	-
Ácido galacturónico	2-unido	-	0,7
Acido glucurónico	4-unido	-	0,7

Como se muestra en la Tabla 2 y la Fig. 7, la fracción de α-glucano tenía un peso molecular máximo de 900.000 y un peso molecular distribuido dentro de un intervalo de 16.000 a un peso molecular correspondiente al volumen Vo (aproximadamente 1.660.000). En la fracción de α-glucano, la proporción de glucosa en los azúcares componentes fue de alrededor del 84%. Como se muestra en la Tabla 2 y la Fig. 8, la fracción de heteroglicano tenía dos pesos moleculares máximos, 48.000 y 830.000. El peso molecular se distribuyó dentro de un intervalo de 10.000 a un peso molecular correspondiente al volumen Vo (aproximadamente 1.660.000). En la fracción de heteroglicano, las proporciones de glucosa y arabinosa en todos los azúcares componentes fueron aproximadamente 32 % y aproximadamente 25 %, respectivamente. La fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano fueron cada una fracción de polisacárido que contenía azúcar como componente principal.

Como se muestra en la Tabla 3, la fracción de α-glucano tenía características de contener glucosa terminal no reductora y glucosa α-6 (6-unida) en grandes cantidades de aproximadamente 25% y aproximadamente 20%, respectivamente. La fracción de heteroglicano tenía características de contener arabinosa terminal no reductora en una cantidad de aproximadamente 22%.

[Ejemplo 1: Prueba del Efecto Activador de las Placas de Peyer]

Se realizó una prueba del efecto activador de las Placas de Peyer de la misma manera que en el Ejemplo 1 de prueba utilizando la fracción de α-glucano (Fracción A1) y la fracción de heteroglicano (Fracción X) preparadas en el Ejemplo 2 de prueba y el SCE-4 deslignificado y la fracción precipitada con Etanol(SCE-4) preparados en el Ejemplo 1 de prueba.

La Fig. 3 muestra los resultados de la prueba del efecto activador de las placas de Peyer. La cantidad del factor promotor del crecimiento celular de la médula ósea se muestra como el efecto activador de las placas de Peyer. La fracción de α-glucano (Fracción A1) y la fracción de heteroglicano (fracción X) en cualquier carga (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) tuvieron un efecto activador de las placas de Peyer significativamente mayor que el SCE-4 deslignificado, y mostraron un efecto activador de las placas de Peyer comparable al de la fracción precipitada con etanol (SCE-4).

El extracto derivado de caña de azúcar, que es una materia prima, tiene un alto contenido de sal, y el rendimiento de la fracción precipitada con etanol (SCE-4) es de aproximadamente el 5%. Además, la fracción precipitada con etanol (SCE-4) es una fracción que tiene varios polisacáridos mezclados, y también contiene un componente de lignina. Por lo tanto, la fracción precipitada con etanol es de color rojo pardusco y difícil de formar un polvo, y por lo tanto, tiene características de procesamiento y astringencia deficientes. Al mismo tiempo, la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano obtenidas en el ejemplo son polvos blancos sin sabor y, por lo tanto, fáciles de procesar.

[Ejemplo 2: Participación de la estructura α-D-(1 → 6)-Glucano en el Efecto Activador de las placas de Peyer]

< Digestión Enzimática de la fracción de α-glucano y la Fracción de Heteroglicano>

A una solución de tampón acetato 25 mM (pH 4,5, 1 mg/ml) de la fracción de α-glucano (1,5 mg) o la fracción de heteroglicano (1,5 mg) se agregaron exo-α-L-arabinofuranosidasa (20 µl), exo-β-D-(1→3)-galactanasa (20 µl), y endo-β-D-(1→4)-galactanasa (5 µl), seguido de una reacción enzimática en condiciones de 37 °C durante 2 días. La digestión obtenida se trató con calor durante 30 segundos en un baño de agua hirviendo para desactivar la enzima. A la mitad de este líquido de reacción enzimática (que se muestra como "1,3/1,4-galactanasa" en la Fig. 4) se agregó más dextranasa (0,25 unidades), seguido de incubación durante 2 días a 37 °C, y posteriormente, la enzima se desactivó en las mismas condiciones que las anteriores para obtener un líquido de reacción enzimática (que se muestra como "dextranasa" en la Fig. 4). Estos líquidos de reacción se conservaron a -20 °C hasta su uso.

<Medición de la cantidad de producción de IL-6>

La preparación y el cultivo de células de las placas de Peyer de ratón se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1 de prueba.

(Inmunoensayo de Enzimas (ELISA))

Un anticuerpo primario anti-IL-6 de ratón diluido a 1 µg/ml con un tampón carbonato-bicarbonato 50 mM (pH 9,6) (100 µl/pocillo) se dispensó en una placa ELISA (Immuno-Maxisorp, Nunc) y se incubó a 4 °C durante la noche. La placa se lavó tres veces con una solución salina fisiológica tamponada con fosfato (PBST) que contenía Tween 20 al 0,05% (300 µl/pocillo) y posteriormente se incubó a 37 °C durante 1 hora usando PBST que contenía leche desnatada al 1% (SM) (SM PBST) (100 µl/pocillo). La placa se lavó cuatro veces con PBST (300 µl/pocillo), seguido de la adición de SM-PBST al 1 % (50 µl/pocillo) y preincubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después, se añadió el sobrenadante de cultivo de placas de Peyer (50 µl/pocillo), seguido de incubación a 4 °C durante la noche. La placa se lavó tres veces con PBST (300 µl/pocillo) y se preincubó durante 10 minutos a temperatura ambiente utilizando SM-PBST al 1% (100 µl/pocillo). Además, se añadió un anticuerpo secundario anti-IL-6 marcado con biotina diluido con SM-PBST al 1% (1:1000, 50 µl/pocillo) a la placa, y después de la incubación a

37 °C durante 1 hora, la placa se lavó tres veces con PBST (300 µl/pozo). La placa se preincubó durante 10 minutos a temperatura ambiente utilizando SM-PBST al 1 % (100 µl/pocillo) y, posteriormente, se añadió estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina diluida con SM-PBST al 1 % (1:1000, 100 µl/pocillo), seguido de incubación a 37 °C durante 1 hora. La placa se lavó cinco veces con PBST (300 µl/pocillo) y, posteriormente, se añadió una solución de sustrato [un tampón de dietanolamina al 10 % (pH 9,8) de fosfato de p-nitrofenilo disódico] (1 mg/ml, 150 µl/pocillo), seguido de incubación a temperatura ambiente. El color amarillo desarrollado se midió utilizando un lector de microplacas (Multiskan JX, Thermo Electron Corp.) (longitud de onda de medición; 405 nm, longitud de onda en blanco; 492 nm).

<Resultados>

Se ha revelado que la IL-6 es relevante para el efecto activador de las placas de Peyer como uno de los factores que promotores del crecimiento celular de la médula ósea. La Fig. 4 muestra los resultados de la prueba de inducción de producción de IL-6. En el caso del SCE-4 deslignificado, la cantidad de producción de IL-6 aumentó significativamente en comparación con el control ("SCE-4 deslignificado" en la Fig. 4). La capacidad de potenciación de la producción de IL-6 también se observó en la fracción de α-glucano (Fracción A1 en la Fig. 4) y en la fracción de heteroglicano (Fracción X en la Fig. 4) (en la Fig. 4, "No tratado" de la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano). Además, la actividad de potenciación de la producción de IL-6 de la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano no disminuyó incluso con el tratamiento con 1,3/1,4-galactanasa. Esto demuestra que estas galactanasas no son una estructura necesaria para la expresión de la actividad. Al mismo tiempo, cuando se realizó un tratamiento con dextranasa después del tratamiento con galactanasa, la actividad de la fracción de α-glucano disminuyó en la misma medida que la del control. Además, la actividad de la fracción de heteroglicano también disminuyó a una concentración de 50 µg/ml. La dextranasa tiene la actividad de reconocer y escindir una estructura de glucano de un tri- o sacárido superior α-l,6-unido. Por lo tanto, se sugirió que un polisacárido que tiene dicha estructura de cadena de sacárido está contenido en la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano, y contribuye a la actividad de potenciación de la producción de IL-6. Incidentalmente, en el caso en que se añadió dextrano solo y se realizó la prueba, no se observó ningún cambio en la cantidad de producción de IL-6 (datos no mostrados).

[Ejemplo 3: Prueba de administración oral de la Fracción de Polisacárido en el Modelo de Infección por Parásitos de Malaria en Roedores (Cepa Sensible a Cloroquina)]

Utilizando la fracción de α-glucano, La fracción de heteroglicano y la fracción precipitada con etanol (SCE-4) preparadas en el Ejemplo 1 de producción como fracciones de polisacáridos, se realizó una prueba de administración oral de las fracciones de polisacáridos en un modelo de infección por parásitos de malaria en roedores.

<Modelo de Infección por Plasmodium berghei N (Cepa Sensible a la Cloroquina)>

Se realizó un experimento de infección por parásitos de malaria en roedores en la Universidad de Kitasato, Instituto de Ciencias de la Vida de Kitasato, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales. Se realizó un experimento con animales de acuerdo con las Regulaciones del Administrador de Seguridad y Salud para el Manejo de Animales Experimentales del Instituto Kitasato (institución educativa legalmente incorporada) especificadas de acuerdo con las leyes y notificaciones pertinentes de los ministerios pertinentes, etc.

Ratones ICR (bajo 20 gramos) adquiridos de Charles River Japan, Inc. se mantuvieron preliminarmente durante una semana en condiciones fijas de temperatura ambiente de 23 ± 2 °C y una humedad del 55 ± 10% con un tiempo de iluminación de 9 horas/día, y posteriormente se sometieron al experimento.

Un parásito de la malaria para roedores se mantuvo de la siguiente manera: un parásito de la malaria para roedores congelado Plasmodium berghei N (cepa sensible a la cloroquina) se descongeló y se administró por vía intraperitoneal a los ratones ICR (200 µl/ratón) para causar la infección, y unos días después de la infección, se extrajo sangre del corazón y se administró a las venas de la cola de otros ratones (de cuatro a cinco) (200 µl/ratón) para causar la infección de manera repetida.

Los eritrocitos infectados con parásitos se prepararon de la siguiente manera. Es decir, se seleccionó un ratón con alta eficacia de infección y se extrajo sangre del corazón bajo anestesia con Nembutal para realizar un frotis de sangre. El frotis se tiñó mediante el método de tinción Giemsa simple utilizando un kit de tinción QuickIII (astradiagnosics) o Hemacolor (Merck), y se calculó una tasa de infección (% de Parasitemia). La sangre extraída se diluyó con solución salina fisiológica para inyección, y se contó el número de eritrocitos con un hemocitómetro y se multiplicó por la tasa de infección para calcular el número de eritrocitos infectados. La sangre se diluyó con solución salina fisiológica para dar una suspensión de eritrocitos infectados con 1×10^5 o 1×10^7 células/ml, y posteriormente se administró a la vena de la cola en una cantidad de 200 µl/ratón.

El experimento de la infección del parásito de la malaria para roedores en ratones se realizó mediante inyección intravenosa con 2×10^4 células de eritrocitos infectados con P. berghei N en las venas de la cola de ratones ICR

machos (0,2 ml/ratón).

<Administración Oral de Polisacárido a Ratón de Modelo de Infección>

La fracción de α-glucano (fracción A1 en las figuras 5(A) a 5(C)), la fracción de heteroglicano (fracción X en las figuras 5(A) a 5(C)) y SCE-4 se administraron por vía oral a los ratones ICR cada día en una dosis de 500 µl/ratón usando una aguja de alimentación. Una dosis de la fracción precipitada con etanol (SCE-4) se estableció en 600 mg/kg/día, y las dosis de la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano se establecieron en 28 mg/kg/día y 22 mg/kg/día, respectivamente. Las dosis de la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano son cada una, una cantidad correspondiente a 600 mg/kg/día de SCE-4 calculada a partir del rendimiento. Como control, el agua se administró por vía oral solo. La administración se inició 7 días antes de la infección por parásitos y continuó incluso después de la infección por plasmodios.

Cálculo de la Tasa de Infección por Parásito de Malaria en Roedores>

Tres días después de la infección, se extrajo sangre de la cola de un ratón para hacer un frotis de sangre. El frotis se tiñó mediante el método de tinción Giemsa simple utilizando un kit de tinción QuickIII (astradiagnosics) o Hemacolor (Merck). El aceite de inmersión se dejó caer en el frotis y el frotis se observó bajo un microscopio (ORIMPUS BX40) de acuerdo con los criterios que se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Tabla. 4

Tasa de infección	El número de campos enumerados
Más de 20 %	Tres campos
Mas de 10% y 20% o menos	Cinco campos
Mas de 2 % y 10 % o menos	Diez campos
Mas de 0,05 % y 2 % o menos	Veinte campos
0,05 % o menos	Cincuenta campos

Además, la tasa de infección de eritrocitos (Parasitemia) se calculó aplicando la siguiente ecuación.

[Ecuación 1]

$$\frac{\text{Número de eritrocitos infectados}}{\text{Número total de eritrocitos}} \times 100 = \text{Tasa de Infección (Parasitemia)}$$

<Resultados>

Las figs. 5(A) a 5(C) muestran los resultados de una prueba de administración oral de las fracciones de polisacáridos en un modelo de infección por parásitos de malaria en roedores. En los ratones a los que se administró la fracción precipitada con etanol (SCE-4), la tasa de infección disminuyó significativamente en los días 4 y 5 en comparación con el control. Además, en los ratones a los que se administró la fracción de α-glucano (Fracción A1 en las Figuras 5(A) a 5(C)) y los ratones a los que se administró la fracción de heteroglicano (Fracción X en las Figuras 5(A) a 5(C)), aunque las dosis de la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano fueron obviamente más pequeñas que la de SCE-4 (aproximadamente 1/20), la tasa de infección disminuyó significativamente en los días 4 y 5 en comparación con el control (Figs. 5(A) a 5(C), valores de p en la prueba LSD de Fisher). Además, en los cinco ratones de los ocho ratones a los que se administró el α-glucano, el efecto duró incluso en el Día 6. A partir de lo anterior, se confirmó que el efecto protector contra la infección de malaria que muestra la fracción precipitada con etanol (SCE-4) se expresa mediante el α-glucano y el heteroglicano que contiene. Además, los resultados del ejemplo muestran que aunque las dosis de la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano son más pequeñas que las de SCE-4 (aproximadamente 1/20), la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano tienen cada una un efecto protector contra infección de malaria casi igual o ligeramente superior a SCE-4. Por lo tanto, se puede expresar un efecto protector contra la infección de la malaria notablemente mayor que el de SCE-4 aumentando las dosis de la fracción de α-glucano y la fracción de heteroglicano.

[Ejemplo 4: Prueba 2 de administración oral de la Fracción de Polisacárido en el Modelo de Infección por Parásitos de Malaria en Roedores (Cepa Resistente a Cloroquina)]

Usando la fracción precipitada con etanol (SCE-4) preparada en el Ejemplo 1 de producción como una fracción de polisacárido, se realizó una prueba de administración oral de la fracción de polisacárido en un modelo de infección

por parásitos de malaria en roedores.

<Modelo de Infección por Plasmodium yoelii NS>

Usando el parásito de malaria en roedores Plasmodium yoelii NS (cepa resistente a la cloroquina), se causó la infección parasitaria por la administración de la vena de la cola, seguida inmediatamente por la administración subcutánea de cloroquina (una solución acuosa de sal de difosfato de cloroquina) a ratones en una dosis de 60 mg/kg/ratón para mantener un parásito resistente. El número de eritrocitos infectados inyectados por vía intravenosa en la vena de la cola se estableció en 2 x 10^6 células. Se realizaron otros procedimientos de la misma manera que en el <Modelo de Infección por Plasmodium berghei N> del Ejemplo 3.

<Administración Oral de Polisacárido a Ratón de Modelo de Infección>

Se administró SCE-4 por vía oral a ratones ICR cada día en una dosis de 500 µl/ratón usando una aguja de alimentación. Se estableció una dosis de SCE-4 a 600 mg/kg/día. Como control, el agua se administró por vía oral solo. La administración se inició 7 días antes de la infección por parásitos y continuó incluso después de la infección por plasmodios.

<Cálculo de la Tasa de Infección por Parásito de Malaria en Roedores>

Se llevó a cabo el cálculo del mismo modo que en el Ejemplo 3.

<Resultados>

En las Figs. 9(A) y 9(B) se muestran los resultados de la prueba de administración oral. En los ratones a los que se administró la fracción precipitada con etanol (SCE-4), la tasa de infección disminuyó significativamente en los días 4 y 7 en comparación con el control (los valores de p en la prueba de LSD de Fisher fueron p <0,001).

[Ejemplo 5: Prueba de administración oral de la Fracción de Polisacárido en combinación con el Agente antipalúdico en el Modelo de Infección por Parásitos de Malaria en Roedores (Cepa Resistente a Cloroquina)]

Usando la fracción precipitada con etanol (SCE-4) preparada en el Ejemplo 1 de producción como una fracción de polisacárido, el efecto combinado con un agente antipalúdico artesunato (Artesnato, abreviado a AN) se probó mediante una prueba de administración oral en un modelo de Infección por Parásitos de Malaria en Roedores.

<Modelo de Infección por Plasmodium yoelii NS>

Se llevó a cabo un procedimiento del mismo modo que en el Ejemplo 4, excepto que el número de eritrocitos infectados con P. yoelii NS inyectados por vía intravenosa en la vena de la cola se cambió de 2 x 10^6 células a 2 x 10^4 células.

<Administración Oral de Polisacárido y AN a Ratón de Modelo de Infección>

Se administró SCE-4 y AN por vía oral a ratones ICR cada día en una dosis de 500 µl/ratón usando una aguja de alimentación. Una dosis de SCE-4 fue de 600 mg/kg/día, y se disolvió AN en una solución acuosa al 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) que contenía Tween 80 al 0,5% y se administró en una dosis de 3 mg/kg/día. La administración de SCE-4 se inició 7 días antes de la infección por parásitos y continuó incluso después de la infección por plasmodios. La administración de AN se inició 2 horas después de la infección por parásitos y continuó hasta el día 3 después de la infección por plasmodios (cuatro veces en total). Además, se administró SCE-4 3 horas o más después de la administración de AN.

A un grupo de control, se administraron por vía oral agua y una solución acuosa de DMSO al 10% que contenía Tween 80 al 0,5%, y a grupos AN3, se administraron por vía oral agua y una solución acuosa de DMSO al 10% de AN que contenía Tween 80 al 0,5%, y a grupos SCE-4+AN3, se administraron por vía oral una solución acuosa de SCE-4 y una solución acuosa de DMSO al 10% de AN que contenía Tween 80 al 0,5%.

<Cálculo de la Tasa de Infección por Parásito de Malaria en Roedores>

Se llevó a cabo el cálculo del mismo modo que en el Ejemplo 3.

<Resultados>

En las Figs. 10(A) y 10(C) se muestran los resultados de la prueba de administración oral. En el grupo AN3 al que se administró AN, la tasa de infección disminuyó significativamente en los días 4 y 5 en comparación con el grupo de control (los valores de p en la prueba de Dunnett fueron p <0,001 y p = 0,0024, respectivamente). En el grupo SCE-4 + AN3 que usa SCE-4 en combinación con AN, la tasa de infección disminuyó significativamente en los días 4 y 5 en

comparación con el grupo control (los valores de p en la prueba de Dunnett fueron p <0,001 y p = 0,0002, respectivamente), y también el efecto todavía duró el día 6 (el valor de p en la prueba de Dunnetf fue p = 0,0047). Como se desprende de estos resultados, el efecto protector contra la infección por malaria se incrementó al utilizar SCE-4 en combinación con AN. Esto muestra que el efecto de SCE-4 no compite con el efecto del agente antipalúdico (AN) existente. Por lo tanto, el SCE-4 se puede usar como un fármaco alternativo para un agente antipalúdico existente que sufre la aparición de una cepa resistente, o se puede usar en combinación con un agente antipalúdico existente.

REIVINDICACIONES

1. Un polisacárido obtenido de caña de azúcar que es adecuado para activar las placas de Peyer,
en el que el polisacárido contiene α-glucano como componente principal,
en el que el polisacárido tiene un peso molecular máximo dentro de un intervalo de 720.000 a 1.080.000,
en el que la proporción de glucosa en todos los azúcares componentes del polisacárido es 80% o más,
en el que la proporción de glucosa terminal no reductora del polisacárido es de 20 a 30%, y
en el que la proporción de glucosa α-1,6-unida del polisacárido es de 15 a 25%.

2. El polisacárido de la reivindicación 1, que se obtiene a partir de una fracción precipitada con etanol obtenida precipitando con etanol una materia prima seleccionada de un extracto de caña de azúcar y melaza derivada de caña de azúcar, y eliminando las sustancias de bajo peso molecular del precipitado obtenido mediante diálisis o mediante un proceso de membrana.

3. El polisacárido de la reivindicación 2, en el que la materia prima es un extracto derivado de caña de azúcar, y en el que el extracto es una fracción que absorbe luz a una longitud de onda de 420 nm y de la cual se excluyen la sacarosa, la glucosa y la fructosa, entre un gran número de fracciones obtenidas al pasar un extracto de caña de azúcar o una melaza derivada de caña de azúcar a través de una columna llena con una resina de intercambio catiónico como portador y realizando el fraccionamiento mediante una diferencia en la afinidad entre la resina de intercambio catiónico y cada componente utilizando agua como eluyente.

4. El polisacárido de la reivindicación 2 o 3, en el que el polisacárido es una fracción obtenida al pasar la fracción precipitada con etanol a través de una columna llena con una resina de intercambio aniónico como portador, eluyendo los componentes adsorbidos en la resina de intercambio aniónico con un disolvente de elución que tiene una fuerza iónica baja para obtener fracciones eluidas y filtrar adicionalmente con gel las fracciones eluidas obtenidas.

5. El polisacárido de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el polisacárido es una fracción en una cantidad correspondiente al volumen vacío del primer flujo de salida que es el resultado de pasar la fracción precipitada con etanol a través de una columna llena de una resina de intercambio aniónico equilibrada con agua como portador, eluyendo los componentes adsorbidos sobre la resina de intercambio aniónico con NH_4HCO_3 100 mM para obtener fracciones eluidas, y pasando adicionalmente las fracciones eluidas obtenidas a través de una columna de filtración con gel que tiene un límite molecular de 2×10^3 a 4×10^5 Da.

6. Un polisacárido obtenido de caña de azúcar que es adecuado para activar las placas de Peyer,
en el que el polisacárido contiene heteroglicano como componente principal,
en el que el polisacárido tiene pesos moleculares máximos dentro de un intervalo de 38.400 a 57.600 y dentro de un intervalo de 664.000 a 996.000,
en el que la proporción de glucosa en todos los azúcares componentes del polisacárido es de 30% a 50%,
en el que la proporción de arabinosa en todos los azúcares componentes del polisacárido es de 20 a 30%, y
en el que la proporción de arabinosa terminal no reductora es de 20 a 30%.

7. El polisacárido de la reivindicación 6, que se obtiene a partir de una fracción precipitada con etanol obtenida precipitando con etanol una materia prima seleccionada de un extracto de caña de azúcar y una melaza derivada de caña de azúcar, y eliminando las sustancias de bajo peso molecular del precipitado obtenido mediante diálisis o mediante un proceso de membrana.

8. El polisacárido de la reivindicación 7, en el que la materia prima es un extracto derivado de caña de azúcar, y en el que el extracto es una fracción que absorbe luz a una longitud de onda de 420 nm y de la cual se excluyen la sacarosa, la glucosa y la fructosa, entre un gran número de fracciones obtenidas al pasar un extracto de caña de azúcar o una melaza derivada de caña de azúcar a través de una columna llena con una resina de intercambio catiónico como portador y realizando el fraccionamiento mediante una diferencia en la afinidad entre la resina de intercambio catiónico y cada componente utilizando agua como eluyente.

9. El polisacárido de la reivindicación 7 u 8, en el que el polisacárido es una fracción obtenida al pasar la fracción precipitada con etanol a través de una columna llena con una resina de intercambio aniónico como portador, y eluir los componentes adsorbidos en la resina de intercambio aniónico con un disolvente de elución que tiene una alta fuerza iónica.

10. El polisacárido de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el polisacárido consiste en:
una fracción diferente a una fracción en una cantidad correspondiente al volumen vacío del primer flujo de salida que es el resultado de pasar la fracción precipitada con etanol a través de una columna llena de una resina de intercambio aniónico equilibrada con agua como portador, eluyendo los componentes adsorbidos sobre la resina de intercambio aniónico con NH_4HCO_3 100 mM y posteriormente con NH_4HCO_3 300 mM para obtener fracciones eluidas, y pasando adicionalmente las fracciones eluidas obtenidas a través de una columna de filtración con gel que tiene un límite molecular de 1×10^4 a 1×10^6 Da; y

una fracción en una cantidad correspondiente al volumen vacío del primer flujo de salida que es el resultado de pasar la fracción precipitada con etanol a través de una columna llena de una resina de intercambio aniónico equilibrada con agua como portador, eluyendo los componentes adsorbidos sobre la resina de intercambio aniónico con NH_4HCO_3 300 mM y posteriormente con NH_4HCO_3 1,8 M para obtener fracciones eluidas, y pasando adicionalmente las fracciones eluidas obtenidas a través de una columna de filtración con gel que tiene un límite molecular de 2×10^3 a 4×10^5 Da.

11. El polisacárido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en la prevención o el tratamiento de infección por plasmodios.

12. Un medicamento que comprende el polisacárido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en la prevención o tratamiento de la infección por plasmodios.

13. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el medicamento se usa en combinación con al menos un agente antipalúdico seleccionado del grupo que consiste en quinina, mefloquina, sulfadoxina, pirimetamina, cloroquina, primaquina, artesunato, arteméter y lumefantrina.

14. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el agente antipalúdico es artesunato.

Fig.1

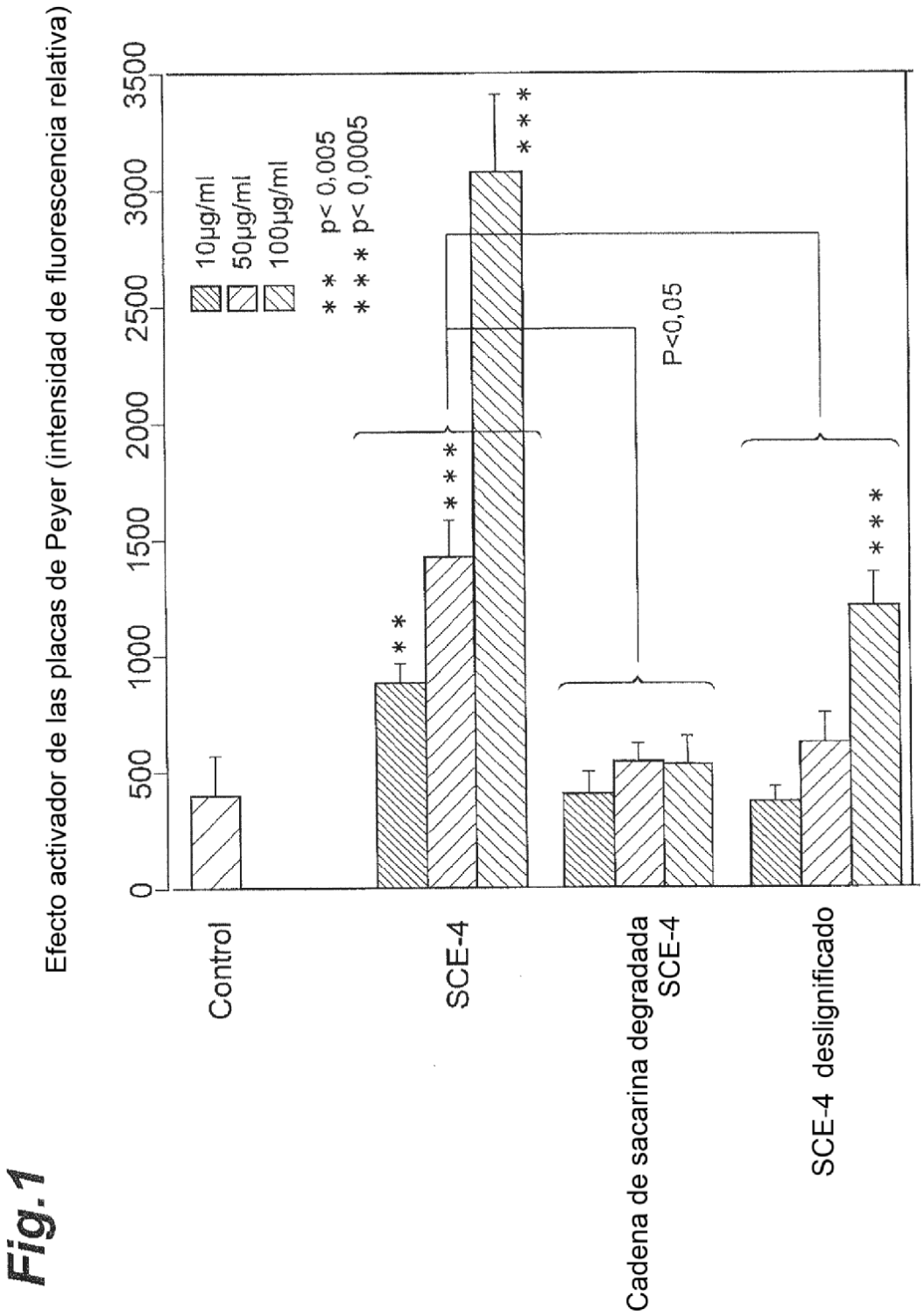

Efecto activador de las placas de Peyer (intensidad de fluorescencia relativa)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
10µg/ml
50µg/ml
100µg/ml
* p< 0,005
* * * p< 0,0005
P<0,05
Control
SCE-4
Cadena de sacarina degradada SCE-4
SCE-4 desligníficado

Fig.2

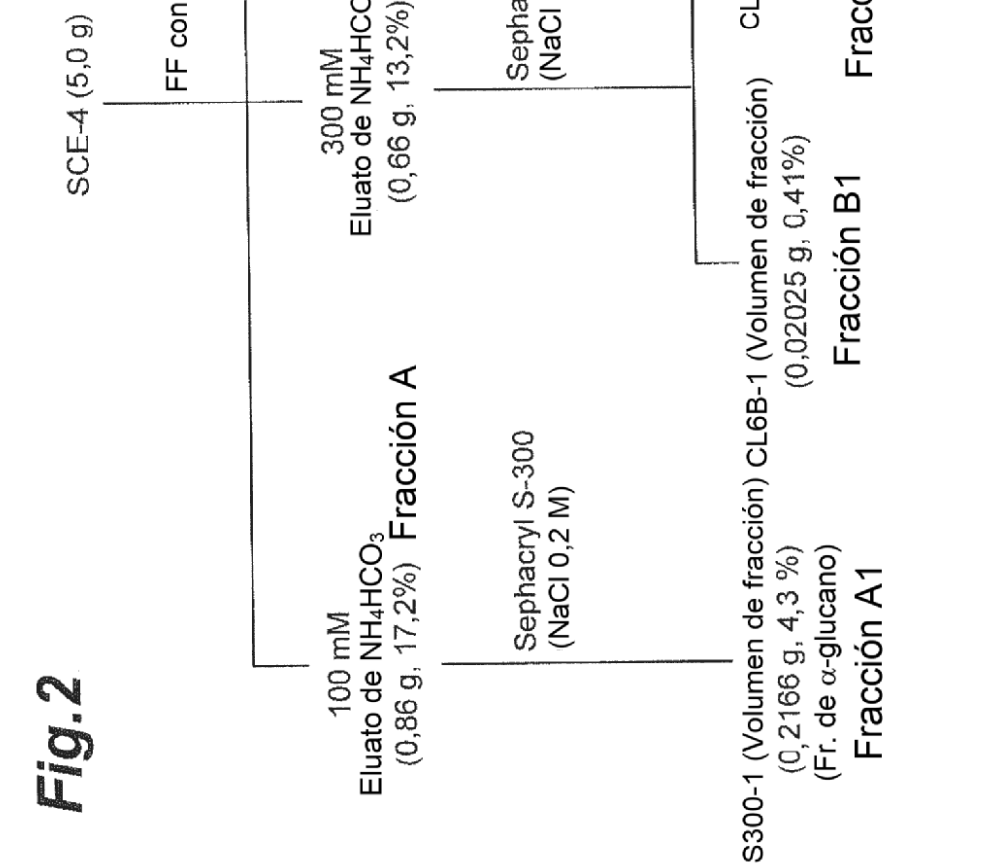
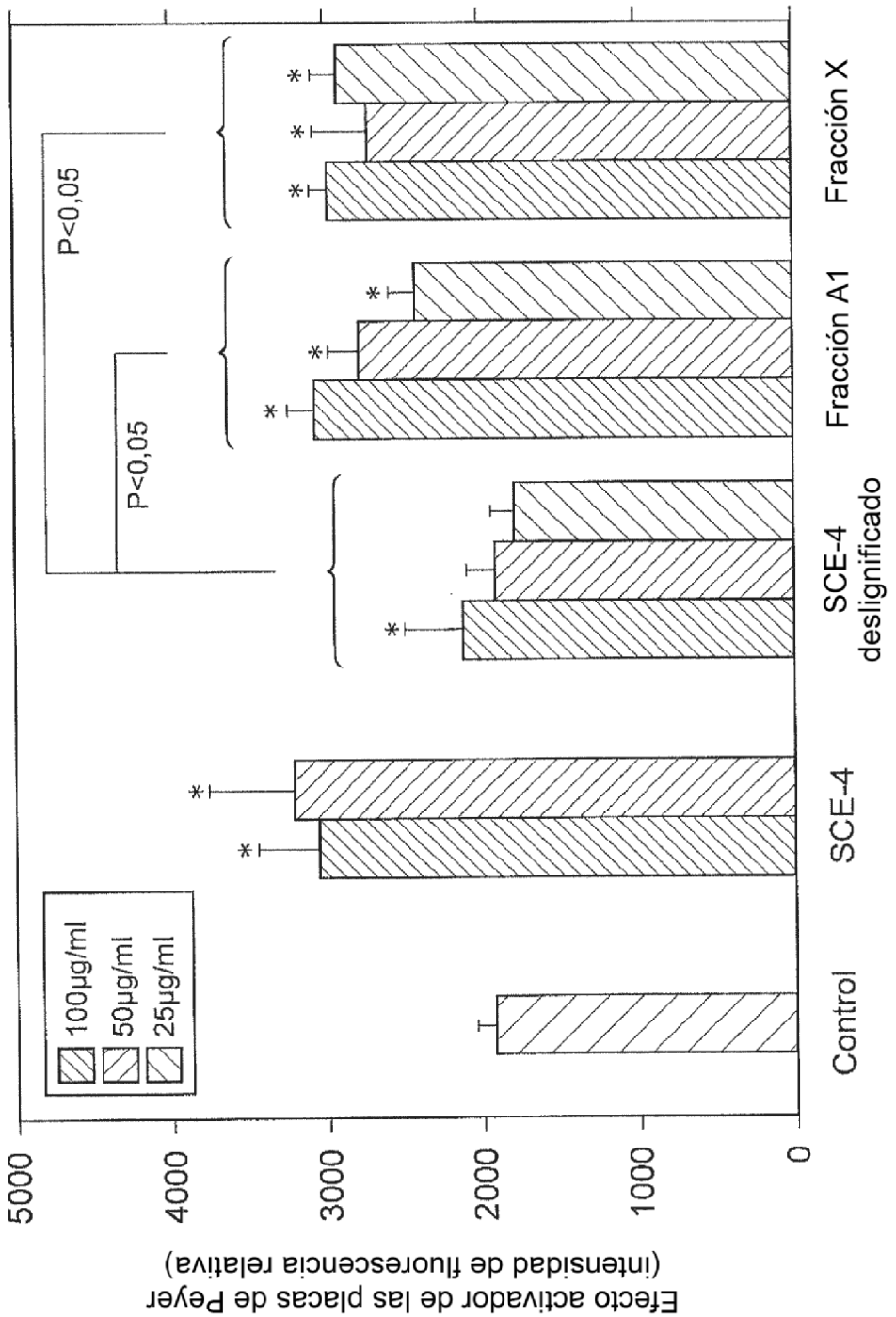

SCE-4 (5,0 g)
FF con QAE-Sepharose
100 mM
Eluato de NH4HCO3
(0,86 g, 17,2%)
Fracción A
300 mM
Eluato de NH4HCO3
(0,66 g, 13,2%)
Fracción B
1.8 M
Eluato de NH4HCO3
(1,04 g, 20,8%)
Fracción C
Sephacryl S-300
(NaCl 0,2 M)
Sepharose CL-6B
(NaCl 0,2 M)
Sephacryl S-300
(NaCl 0,2 M)
S300-1 (Volumen de fracción)
(0,2166 g, 4,3 %)
(Fr. de α-glucano)
Fracción A1
CL6B-1 (Volumen de fracción)
(0,02025 g, 0,41%)
Fracción B1
CL6B-2 (fracción intermedia)
(0,02141 g, 0,41%)
(Fr. de heteroglicano)
Fracción B2
S300-1 (Volumen de fracción)
(0,16395 g, 3,28 %)
(Fr. de heteroglicano)
Fracción C1
Fr. de heteroglicano (0,1842 mg, 3,68%)
Fracción X

Fig.3


Efecto activador de las placas de Peyer
(intensidad de fluorescencia relativa)
5000
4000
3000
2000
1000
0
100µg/ml
50µg/ml
25µg/ml
P<0,05
P<0,05
*
Control
SCE-4
SCE-4 deslignificado
Fracción A1
Fracción X

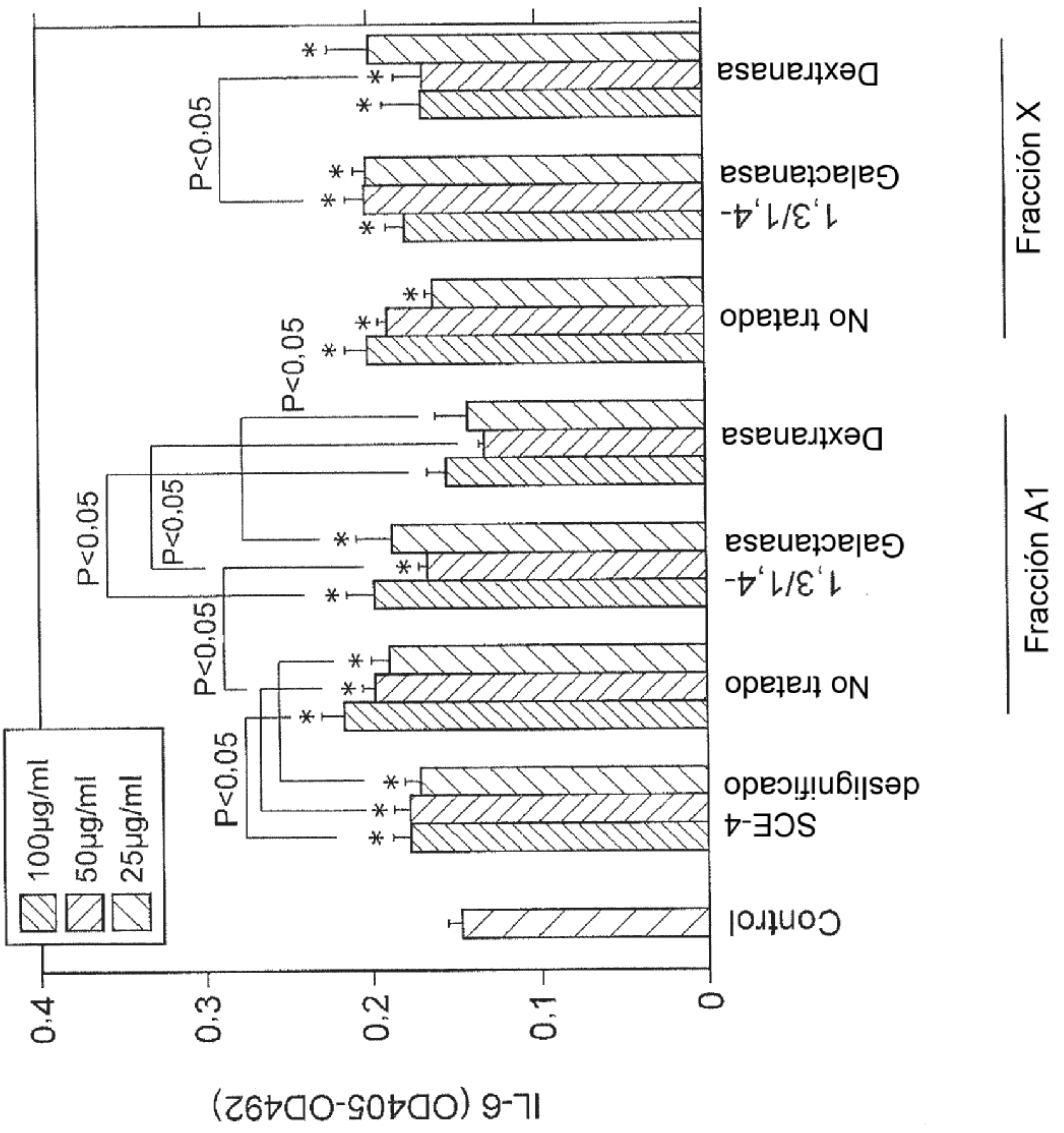

IL-6 (OD405-OD492)
0,4
0,3
0,2
0,1
0
100µg/ml
50µg/ml
25µg/ml
P<0,05
P<0,05
P<0,05
P<0,05
P<0,05
Control
SCE-4 deslignificado
No tratado
1,3/1,4-Galactanasa
Dextranasa
No tratado
1,3/1,4-Galactanasa
Dextranasa
Fracción A1
Fracción X

Fig.4

Fig.5

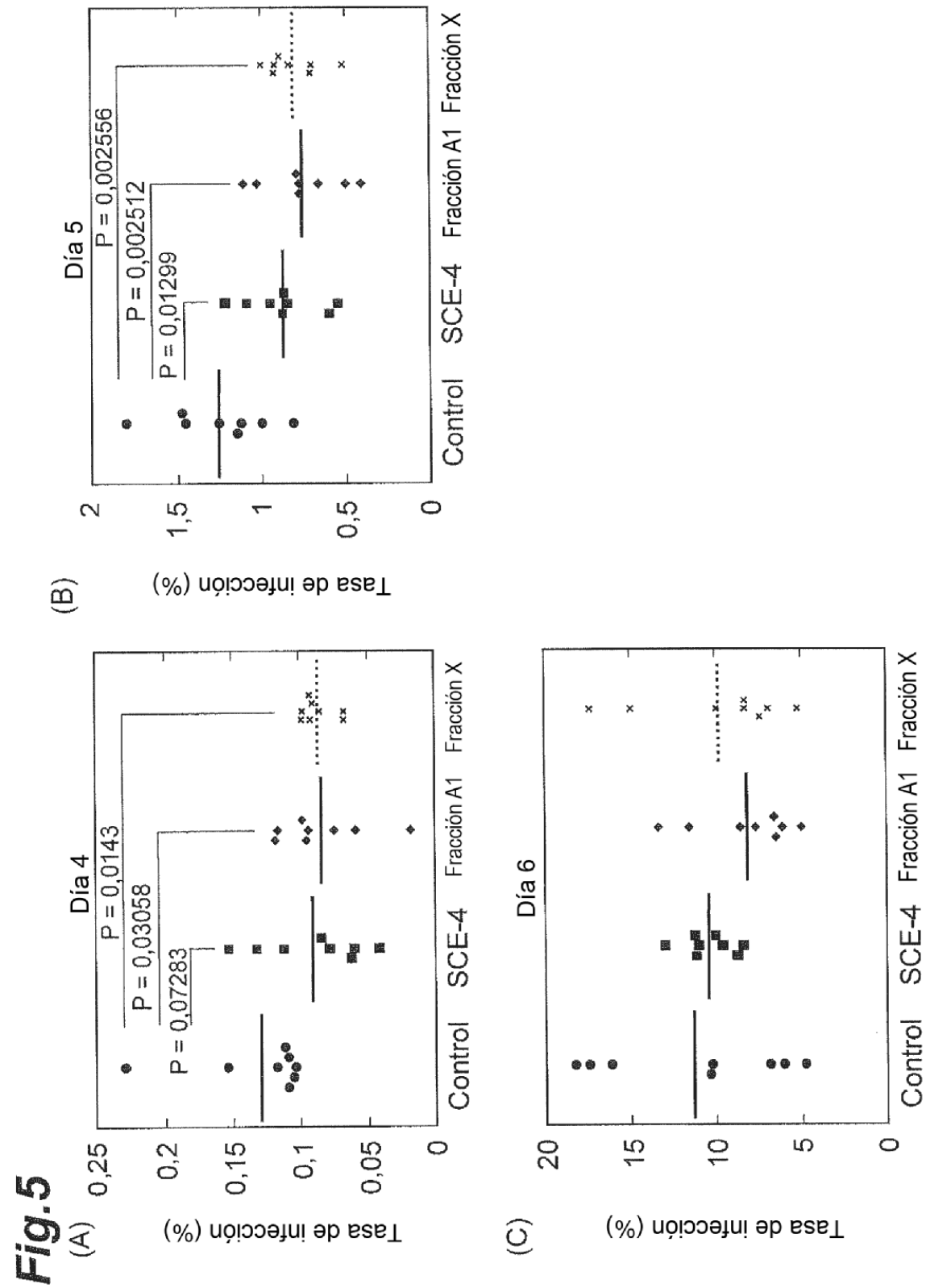
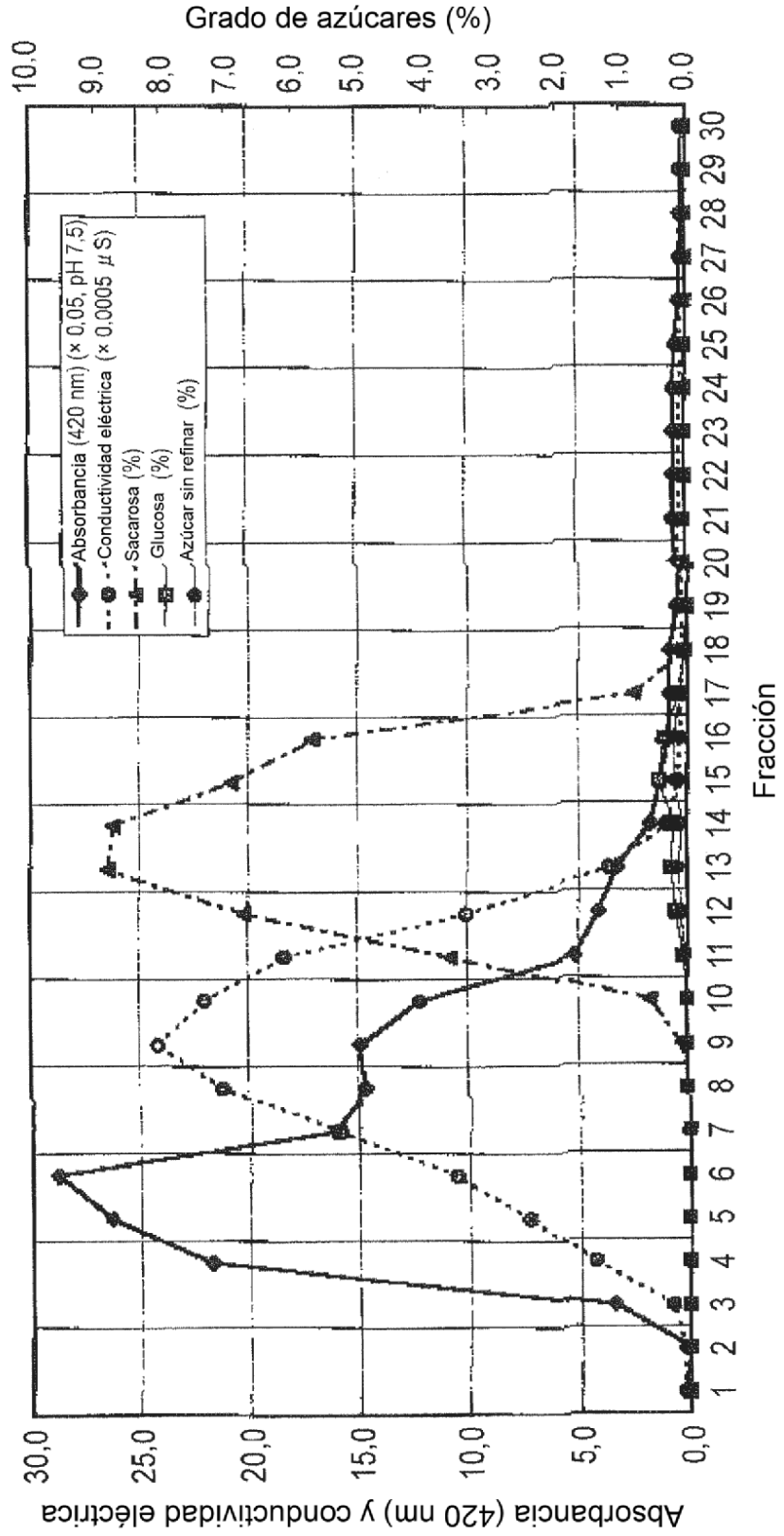

(A)
Día 4
P = 0,0143
P = 0,03058
P = 0,07283
Tasa de infección (%)
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
Control
SCE-4
Fracción A1
Fracción X
(B)
Día 5
P = 0,002556
P = 0,002512
P = 0,01299
Tasa de infección (%)
2
1,5
1
0,5
0
Control
SCE-4
Fracción A1
Fracción X
(C)
Día 6
Tasa de infección (%)
20
15
10
5
0
Control
SCE-4
Fracción A1
Fracción X

Fig.6


Grado de azúcares (%)
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Absorbancia (420 nm) y conductividad eléctrica
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
Fracción
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Absorbancia (420 nm) (× 0,05, pH 7,5)
Conductividad eléctrica (× 0,0005 μS)
Sacarosa (%)
Glucosa (%)
Azúcar sin refinar (%)

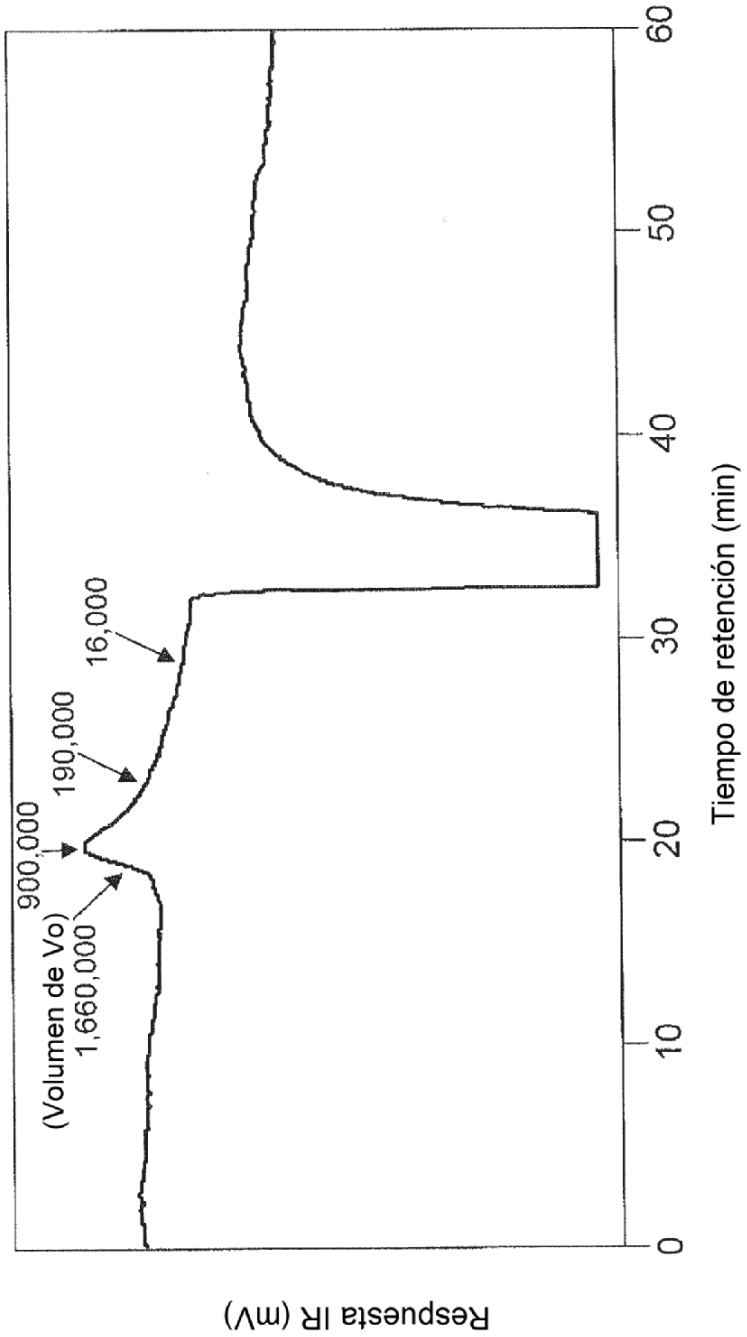

Respuesta IR (mV)
Tiempo de retención (min)
0
10
20
30
40
50
60
900,000
(Volumen de Vo)
1,660,000
190,000
16,000

Fig.7

Fig.8

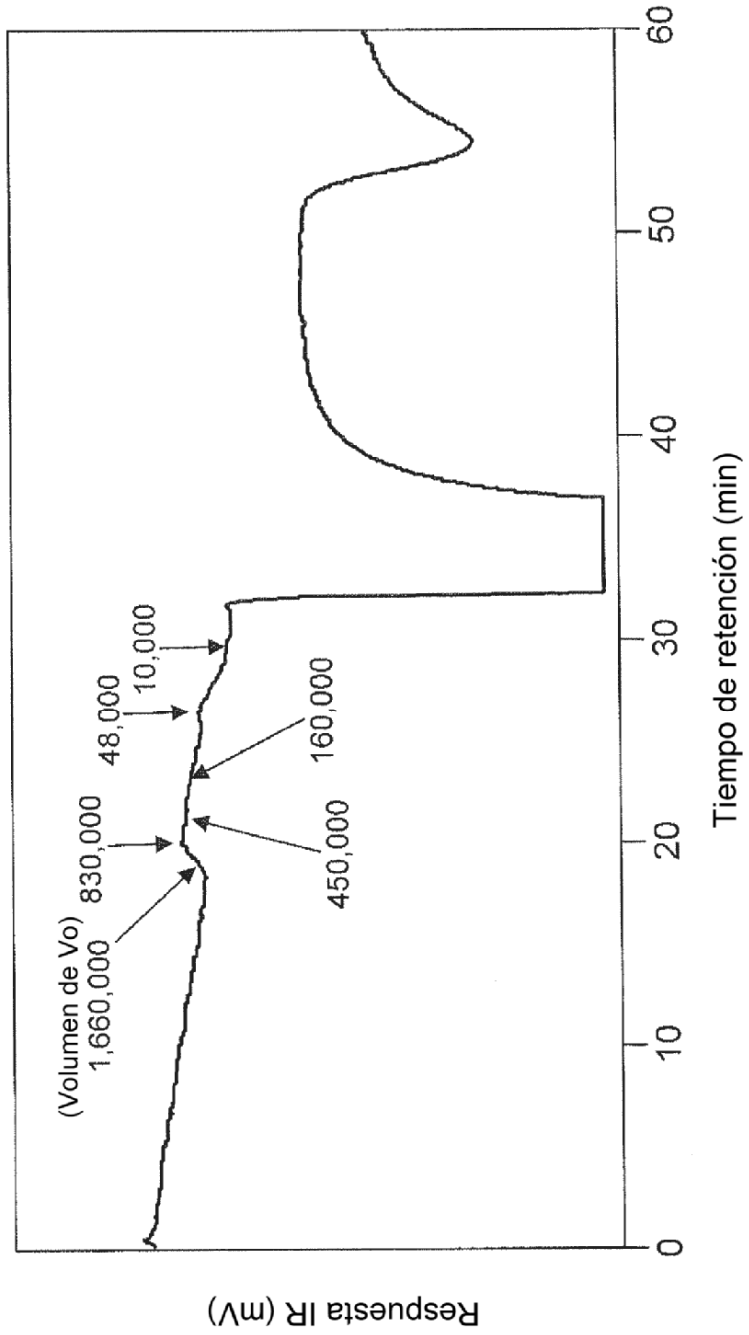

Respuesta IR (mV)
Tiempo de retención (min)
0
10
20
30
40
50
60
(Volumen de Vo)
1,660,000
830,000
450,000
160,000
48,000
10,000

Fig.9

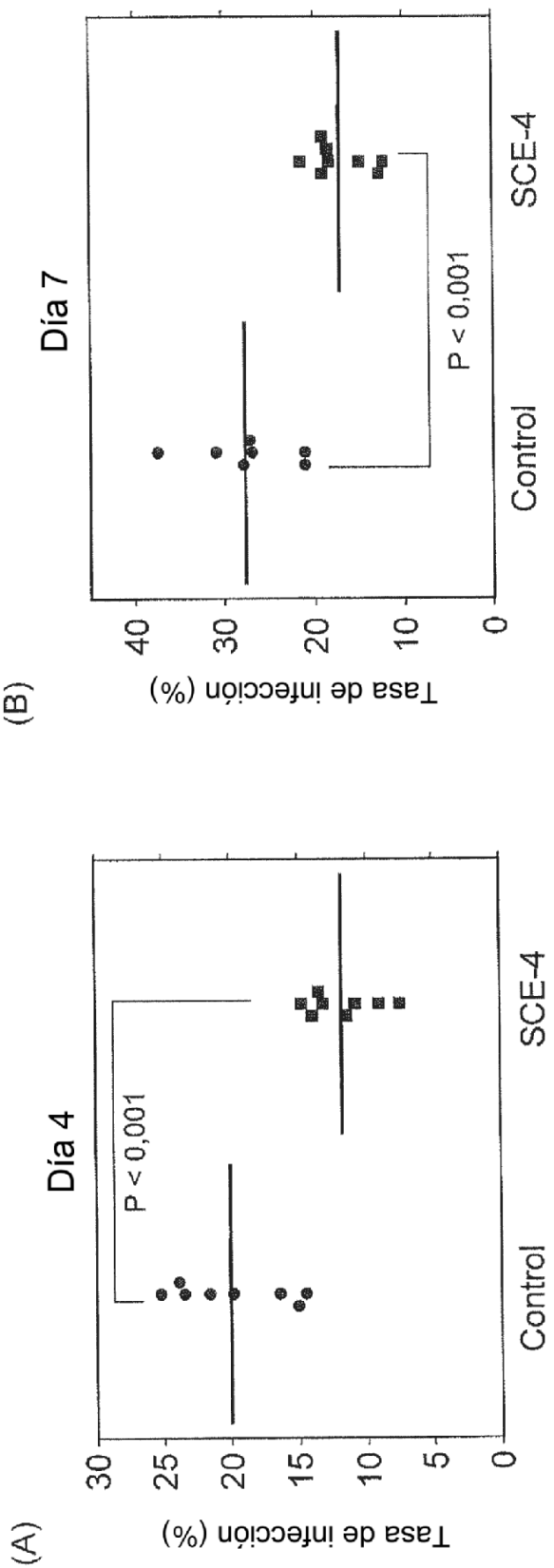
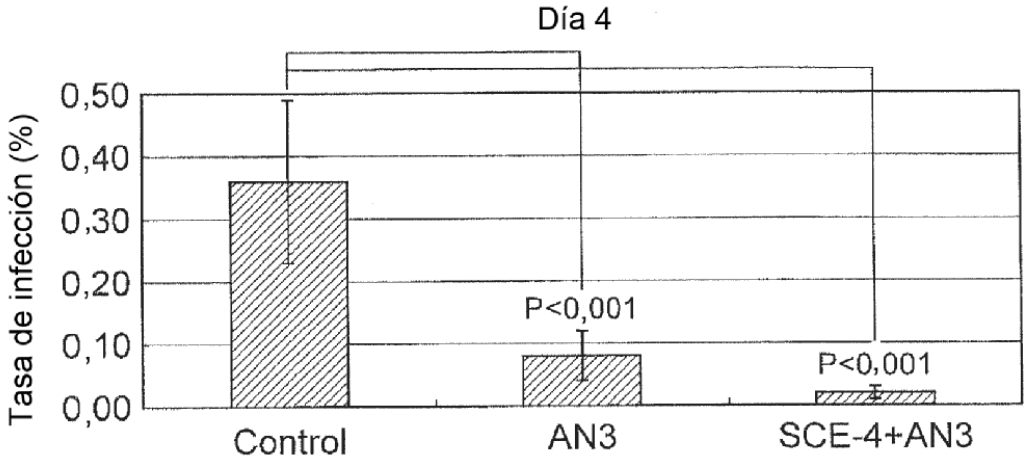
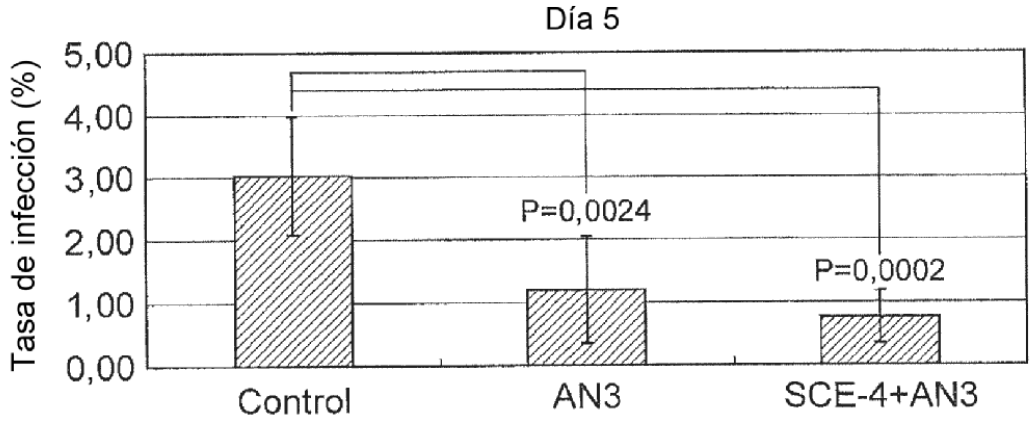

(A)
Día 4
Tasa de infección (%)
30
25
20
15
10
5
0
P < 0,001
Control
SCE-4
(B)
Día 7
Tasa de infección (%)
40
30
20
10
0
P < 0,001
Control
SCE-4

Fig.10

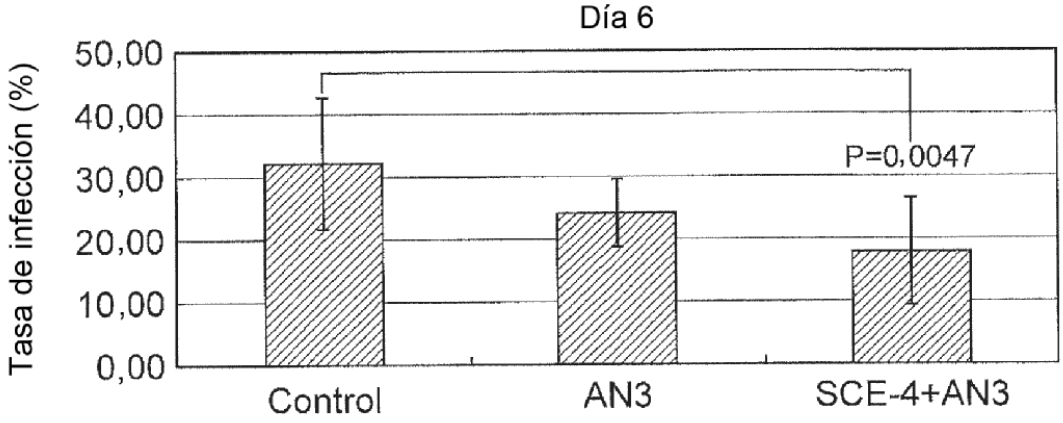
(A)


Día 4
Tasa de infección (%)
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
P<0,001
P<0,001
Control
AN3
SCE-4+AN3

(B)


Día 5
Tasa de infección (%)
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
P=0,0024
P=0,0002
Control
AN3
SCE-4+AN3

(C)


Día 6
Tasa de infección (%)
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
P=0,0047
Control
AN3
SCE-4+AN3