

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 858 461**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2010** **E 17189957 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020** **EP 3287471**

54 Título: **Polisacárido apto para modular la respuesta inmunitaria**

30 Prioridad:

**11.12.2009 EP 09178876**

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

**30.09.2021**

73 Titular/es:

**NUTRILEADS B.V. (100.0%)  
Pancrasgorsedijk 7  
3235 KT Rockanje, NL**

72 Inventor/es:

**ALBERS, RUUD;  
HELIN, JARI;  
KLAFFKE, WERNER;  
KOEK, JEAN HYPOLITES;  
KREIJVELD, PETRONELLA ANNA;  
NATUNEN, JARI;  
ORANJE, RICHARDUS PAULUS ANTON y  
TAREILUS, ERWIN WERNER**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 858 461 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Polisacárido apto para modular la respuesta inmunitaria

5 [0001] La presente invención se refiere a un producto comestible o composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del resfriado o la gripe, donde dicho producto comestible o composición farmacéutica se obtiene mediante un método que comprende incorporar un polisacárido que se puede usar para modular la respuesta inmunitaria. La invención también se refiere a un método para la preparación de un producto comestible o composición farmacéutica que comprende el polisacárido.

10 [0002] Muchos adultos en el mundo occidental sufren de dos a cinco resfriados al año, y los bebés y niños en edad preescolar incluso tienen una media de cuatro a ocho resfriados al año. Las infecciones de las vías respiratorias superiores, como el resfriado común y la gripe, son, junto con las infecciones gastrointestinales, las causas más importantes de absentismo laboral o escolar. En una vida de 75 años, sufrimos una media de más de 200 episodios de resfriado común. Esto significa que, si cada resfriado dura de cinco a siete días, pasamos alrededor de tres años de nuestra vida tosiendo y estornudando con resfriados. Por tanto, la necesidad y el interés de un consumidor por la "autoprevención" y el "autotratamiento" de estas infecciones agudas son elevados.

20 [0003] Un interés reciente en el campo de los ingredientes alimentarios funcionales es el uso de inmunomoduladores para mejorar las respuestas de defensa del hospedador, por ejemplo, para proporcionar más protección contra el resfriado común. Una parte importante de la respuesta de defensa del hospedador es el sistema inmunitario innato. El arma innata del sistema inmunitario es una primera línea de defensa que se activa rápidamente contra los patógenos. Implica, entre otras, células fagocíticas y asesinas naturales (NK). Las células fagocíticas como los neutrófilos, monocitos y macrófagos pueden generar especies reactivas del oxígeno (ROS) para matar patógenos como hongos, bacterias y células infectadas por virus. Las células NK pueden destruir las células afectadas que han perdido o expresan cantidades insuficientes de MHC de clase I, algo frecuente en células infectadas por virus o tumores.

30 [0004] Se sabe que algunos productos comestibles o productos alimenticios tienen propiedades inmunoestimulantes. Por ejemplo, en la patente US 2005/0002962 A1 se describe una preparación de melanina de ingredientes botánicos como equinácea, ginseng americano, nuez negra, té verde, *Parthenium integrifolium*, ginseng coreano, brotes de alfalfa, jengibre, hidrastis, trébol rojo, diente de león, *acata racemosa*, regaliz, manzanilla, cardo mariano, alfalfa, cola de caballo, astrágalo, centella asiática, *Tanacetum parthenium*, valeriana, espino blanco, romero, *Serena repens*, efedra, pau d'arco, ginkgo, ajo, hierba de San Juan, *Agaricus bisporus* (champiñón común), *Agaricus bisporus* (champiñón Portabello), *Lentinus edodes* (seta shiitake) o *Boletus edulis* (hongo blanco) como composición inmunoestimuladora.

40 [0005] En las patentes WO 2009/071425 A1 y WO 2009/080447 A1 se describen los efectos inmunoestimulantes de fracciones que incluyen cantidades sustanciales de oligosacáridos y/o de bajo peso molecular de plantas de la subfamilia *Asclepiadoideae* (como hoodia) y la familia *Alliaceae* (como cebolla y ajo del género *Allium*), respectivamente.

45 [0006] Westereng y col. (*Mol. Nutr. Food Res.* 2009, vol. 53, p. 780-789) describen la liberación y caracterización de cadenas laterales simples de material péctico extraído de la col blanca (*Brassica oleracea* var. *Capitata*, cultivar Bartolo) y su actividad fijadora del complemento (que desempeña una función en el sistema inmunitario humano). Westereng y col. se centran en las cadenas laterales como los elementos del material péctico que son activos en la fijación del complemento, y los autores indican que los elementos estructurales que contienen múltiples cadenas laterales son necesarios para una actividad de fijación del complemento eficaz. El material péctico contenía dos fracciones, con un peso molecular de 630 y 40 kDa, respectivamente, y era activo en la fijación del complemento. La relación media entre el ácido galacturónico y los residuos de ramosilo de los polisacáridos era de 5,7. El material péctico se degradó por beta-eliminación en una fracción cargada y dos fracciones neutras, con pesos moleculares de 90, 17 y 8 kDa, respectivamente. Las fracciones neutras consisten en cadenas laterales liberadas por beta-eliminación, y la fracción de 17 kDa mostró actividad fijadora del complemento, mientras que la fracción de 8 kDa no mostró actividad fijadora del complemento; la fracción de 90 kDa no se analizó. Aparentemente, en función del peso molecular, la fracción neutra grande contiene moléculas que tienen al menos dos cadenas laterales, mientras que la fracción neutra pequeña contiene sólo cadenas laterales simples.

60 [0007] Sakurai et al (*Immunology*, 1999, vol. 97, p. 540-547) describen una fracción de polisacárido péctico (llamada bupleurano 2IIc) que se preparó a partir de una hierba medicinal (*Bupleurum falcatum* L.) y se administró por vía oral a ratones. El polisacárido comprende una región galacturónica y un núcleo de ramnogalacturonano rico en cadenas de azúcar neutras, y se sugiere que las cadenas laterales del núcleo de RG son importantes para la actividad mitógena del polisacárido.

65 [0008] En la patente WO 2001/76609 A1 se describe el uso de ácidos poligalacturónicos como ingredientes en alimentos. Los ácidos poligalacturónicos se preparan mediante el tratamiento con endopoligalacturonidasa de

plantas que contienen pectina. Los ácidos poligalacturónicos son útiles como viscosificantes en productos alimenticios. Se sabe que las pectinas tienen un efecto fisiológico útil.

[0009] En la patente US 6,794,495 se describe una composición de extensina y pectina que mejora el sistema inmunitario. La extensina es una glucoproteína rica en hidroxiprolina abundante en las paredes celulares de las dicotiledóneas.

[0010] Lau y col. (Carbohydrate Research, 1985, vol. 137, p. 111-125) describen un polisacárido RGI con un peso molecular de aproximadamente 200 kDa, una secuencia alterna de Rha y GalA de aproximadamente 400 residuos. La naturaleza de las cadenas laterales todavía está en duda, aunque contienen residuos L-arabinosilo y D-galactosilo.

[0011] En la patente US 2003/0159178 A1 se describe un polisacárido ramnogalacturonano I que tiene una relación de GalA/Rha de 1,3. Los polisacáridos pueden derivarse de patata modificada genéticamente, en donde la modificación de la planta ha dado como resultado una cantidad reducida de arabinosa o galactosa en las cadenas laterales del RGI.

[0012] En la EP 1 550 448 A1 se describe un inhibidor de la liberación de histamina que comprende una pectina.

[0013] Hansen y col. (Journal of AOAC International, 2001, vol. 84, p. 1851-1854) describen un método para el análisis de la pectina.

[0014] Nergard y col. (Carbohydrate Research, 2005, vol. 340, p. 115-130) describen polisacáridos de la planta *Vernonia kotschyana*, y su efecto sobre la fijación del complemento.

[0015] Zhao y col. (Food Research International, 2006, vol. 39, p. 917-923) describen polisacáridos implicados en la actividad inmunológica, aunque no se especifica qué parte del polisacárido está implicada en la modulación de la respuesta inmunitaria.

[0016] Nakamura y col. (Biosci. Biotechnol. Biochem., 2001, vol. 65, p. 2249-2258) describen la estructura de polisacáridos derivados de la soja.

[0017] Oechslin y col. (Carbohydrate Polymers, 2003, vol. 51, p. 301-310) describen la estructura de RGI aislado a partir de residuo celulósico de manzana.

## RESUMEN DE LA INVENCION

[0018] A pesar de la divulgación de la técnica anterior, existe el deseo de aumentar la defensa natural del cuerpo humano contra intrusos que puedan causar un resfriado o una gripe. El consumidor está especialmente interesado en lograr este objetivo con compuestos o ingredientes naturales, especialmente como parte de un producto alimenticio o dieta común, ya que el consumidor por lo general no desea depender únicamente de medicamentos. Para lograrlo, el consumidor puede consumir uno o más ingredientes o productos comestibles que modulan la respuesta inmunitaria del consumidor y proporcionan la defensa natural requerida. Por tanto, existe una necesidad constante de productos comestibles nuevos o alternativos, especialmente productos alimenticios que tengan tales propiedades inmunoestimulantes. Un objetivo de la presente invención es proporcionar tales productos comestibles, en especial productos alimenticios.

[0019] Para que sea un ingrediente útil para un producto comestible o un producto alimenticio, las propiedades del ingrediente deben ser tales que el ingrediente pueda usarse en un producto comestible o un producto alimenticio sin que tenga influencia negativa sobre las propiedades del producto comestible o producto alimenticio. Estas propiedades pueden estar relacionadas con las propiedades organolépticas del ingrediente, como sabor, aroma, olor, color. Por ejemplo, el ingrediente no debe tener mal sabor u olor; de lo contrario, a los consumidores no les gustará el producto comestible y no lo consumirán. Por otro lado, la propiedad también puede estar relacionada con algunos aspectos técnicos del ingrediente cuando se usa como ingrediente en un producto comestible. Para el fabricante de alimentos es importante que el ingrediente no influya negativamente en las propiedades técnicas del producto comestible o del producto alimenticio, como textura, viscosidad, homogeneidad, emulsificación y otras propiedades relevantes.

[0020] Estos requisitos los cumple un polisacárido obtenido de plantas de la especie *Camellia sinensis*, en el que el esqueleto del polisacárido comprende núcleos alternos de ramnogalacturonano I y núcleos de ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) o de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4), donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 2,5:1 a 1:1, y que tiene un peso molecular de al menos 70 kDa. Por tanto, la cantidad de núcleos de ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) y/o de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4) en este polisacárido es muy baja. Los efectos de inmunoestimulación, inmunosupresión o inmunomodulación de la técnica anterior se basan en diversas estructuras moleculares, que incluyen pequeñas moléculas de tipo alcaloide y polisacáridos de tipo glucano o

combinaciones muy heterólogas de estos. Sus efectos difieren en magnitud. La presente invención emplea materiales polisacáridos aislados bien caracterizados con actividades bien caracterizadas.

[0021] La ventaja del polisacárido según la invención es que no solo es adecuado para modular la respuesta inmunitaria y, con ello, aumentar la defensa natural de un consumidor contra el resfriado o la gripe, o una enfermedad similar, sino que también es útil como ingrediente en productos comestibles, más concretamente productos alimenticios. En comparación con las pectinas estándar, el efecto espesante del polisacárido según la invención es muy limitado. De esta forma, el ingrediente se puede utilizar en diversos productos alimenticios, especialmente en productos alimenticios líquidos como bebidas y sopas, sin que tenga un efecto negativo sobre propiedades como la viscosidad y la textura de esos productos alimenticios. Además, el uso del polisacárido no se limita a productos alimenticios, sino que también se puede usar como medicamento.

[0022] Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la preparación de un producto comestible o una composición farmacéutica, donde dicho método comprende incorporar un 0,5-10 % en peso de un polisacárido que tiene un esqueleto que comprende núcleos de ramnogalacturonano I y núcleos de ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1, 4) o de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4) alternos o que tiene un esqueleto que consiste en un núcleo de ramnogalacturonano I; donde el polisacárido tiene un peso molecular de al menos 70 kD; y donde el polisacárido se obtiene de plantas de la especie *Camellia sinensis* y donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 2,5:1 a 1:1.

[0023] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un producto comestible o composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del resfriado o la gripe, donde dicho producto comestible o composición farmacéutica se obtiene mediante un método que comprende incorporar 0,5-10 % en peso de un polisacárido que tiene un esqueleto que comprende núcleos de ramnogalacturonano I y núcleos de ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) o de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4) alternos o que tienen un esqueleto que consiste en un núcleo de ramnogalacturonano I; donde el polisacárido tiene un peso molecular de al menos 70 kD; y donde el polisacárido:

- se obtiene de plantas de la especie *Camellia sinensis* y la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 2,5:1 a 1:1; o
- se obtiene de plantas de la especie *Daucus carota* y la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 2,5:1 a 1:1; o
- se obtiene de la especie *Glycine max* y la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,5:1 a 1:1; o
- se obtiene de la especie *Malus domestica* y la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,5:1 a 1:1; o
- se obtiene de la especie *Beta vulgaris L.* y la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,5:1 a 1:1;

donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramosilo en el esqueleto del polisacárido se determina usando el método de RMN descrito en los Ejemplos.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0024] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica.

[0025] Todos los porcentajes, a menos que se indique lo contrario, se refieren al porcentaje en peso.

[0026] En caso de que se proporcione un rango en el contexto de la presente invención, el rango indicado incluye los puntos finales mencionados.

[0027] Abreviaturas: kDa - kilo Dalton; Gal - D-galactosa; GalA - Ácido-D-galacturónico; Rha - L-ramnosa; Ara - L-arabinosa; Fuc - L-fucosa; Glc - D-glucosa; GlcA - ácido D-glucurónico. Las formas L y D de estos monómeros como se indica aquí también se aplican a los monómeros como se indica en el resto de esta especificación (que pueden no estar abreviados, sino escritos en su totalidad).

#### *Respuesta inmunitaria*

[0028] El término "respuesta inmunitaria moduladora", como se usa en el presente documento, significa que la actividad o capacidad del sistema inmunitario para defender el cuerpo se modula. Esto puede estar relacionado con la inmunostimulación o la inmunosupresión. La tarea principal del sistema inmunitario es proteger contra patógenos como hongos, bacterias, virus, protozoos y parásitos. En este contexto, la modulación de la respuesta inmunitaria significa preferiblemente la estimulación de la respuesta inmunitaria. De manera adecuada, la

estimulación de la respuesta inmunitaria contribuye a una defensa natural mejorada del cuerpo humano. Por otro lado, el sistema inmunitario a veces genera una respuesta inmunitaria contra sustancias inofensivas, como los ácaros domésticos, el polvo o el polen, lo que provoca alergia. Además, muchos trastornos fisiológicos, como la hipercolesterolemia y la obesidad, dan como resultado un estado inflamatorio de bajo grado. La modulación inmunitaria en el contexto de respuestas inmunitarias anormales, como la alergia o la inflamación, significa amortiguar o contrarrestar la respuesta inmunitaria hipersensible. La presente invención no solo se refiere a la tarea principal del sistema inmunitario, sino también a esta segunda respuesta inmunitaria "anormal".

[0029] Se pueden usar varios ensayos para identificar componentes que podrían modificar la inmunidad. Los presentes inventores eligieron el uso de células fagocíticas y asesinas naturales (NK) para ayudar a la identificación de compuestos inmunoestimulantes, ya que estas células son parte del sistema inmunitario innato, que es una primera línea de defensa no específica de activación rápida contra patógenos.

[0030] Las células fagocíticas, como los neutrófilos, monocitos y macrófagos, pueden generar especies reactivas del oxígeno (ROS) para matar patógenos como hongos y bacterias. Se puede medir el efecto de los ingredientes sobre la actividad de fagocitosis *ex vivo* con sangre reciente de voluntarios humanos sanos después de la incubación con bacterias *E. coli* marcadas con FITC. El porcentaje de células fagocitantes en la población de granulocitos se puede determinar mediante citometría de flujo. Los resultados se normalizan típicamente al efecto del lipopolisacárido (LPS), que es un potente compuesto de referencia inmunoestimulante ampliamente conocido. De manera adecuada, un porcentaje normalizado de granulocitos que fagocitan más del 40 % se considera un efecto estimulante inmunitario significativo.

[0031] Las células NK pueden destruir células concretas que han perdido o expresan cantidades insuficientes de MHC de clase I, algo frecuente en células infectadas por virus o tumores. El efecto de los ingredientes sobre la actividad de las células NK puede medirse *ex vivo* con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas a partir de sangre reciente de voluntarios humanos sanos. Después de la preincubación de las PBMC con el ingrediente, normalmente se añaden células diana K562 previamente marcadas y, después de la incubación posterior, se puede añadir yoduro de propidio para la detección de células muertas. El porcentaje de células diana muertas se puede determinar mediante citometría de flujo. Los resultados se normalizan típicamente al efecto de la interleucina-2 (IL-2), que es un potente compuesto de referencia estimulante de células NK ampliamente conocido. De forma adecuada, un % normalizado de actividad de células NK de más del 17 % se considera un efecto estimulante inmunitario significativo.

#### *Polisacáridos de pectina y ramnogalacturonano*

[0032] La pectina es una mezcla compleja de polisacáridos coloidales que se encuentran en las paredes celulares primarias de las monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se caracteriza por la presencia de residuos de ramnoso, ácido galacturónico, arabinoso y galactoso como componentes principales, y al menos ocasionalmente residuos de xiloso, manoso, glucoso y apio. Tradicionalmente, la pectina es conocida por sus propiedades gelificantes y viscosificantes que se utilizan en preparaciones industriales y domésticas de jaleas, compotas y mermeladas, y se usa ampliamente por sus propiedades espesantes y viscosificantes. En general, se considera que la pectina es ácido poli-D-galacturónico (homogalacturonano, HG), en el que los residuos de ácido galacturónico están unidos mediante enlaces alfa(1-4). El grupo carboxilo de un residuo de ácido galacturónico puede esterificarse con metanol, para crear pectinas con alto contenido de grupos metoxi y con bajo contenido de grupos metoxi. El grado de esterificación metílica influye en el comportamiento gelificante de la pectina. Además, el ácido galacturónico puede acetilarse, además de los ésteres metílicos. En ese caso, una de las posiciones de los grupos hidroxilo 2-OH y 3-OH se sustituye por esterificación para producir los acetatos. La acetilación generalmente evita la formación de gel pero aumenta los efectos estabilizantes y emulsionantes de la pectina. Los polisacáridos pécticos son un grupo heterogéneo de polisacáridos que incluye varias cantidades de varios componentes a veces presentes o ausentes, como (i) homogalacturonano (HG), (ii) xilogalacturonano (XGA), (iii) esqueleto de ramnogalacturonano I, que abarca cadenas laterales de arabinano y arabinogalactano I y II (RGI) y (iv) ramnogalacturonano II (RGII) (Ralet y col., Carbohydrate Research, vol. 344, 2009, pág. 1798-1807). La composición del polisacárido péctico y la estructura fina varían ampliamente según la fuente vegetal y las condiciones de extracción aplicadas. El núcleo de poli-GalA puede tener una longitud de aproximadamente 100 residuos D-GalA consecutivos. El núcleo de RGI que contiene las cadenas laterales se denomina habitualmente "región ramificada" o "región peluda", mientras que el núcleo de poli-GalA (entre 2 núcleos de RGI) no tiene sustituyentes oligosacáridicos.

[0033] Los ramnogalacturonanos son un grupo de polisacáridos pécticos de la pared celular estrechamente relacionados que contienen un esqueleto del disacárido repetido:

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

[0034] El ramnogalacturonano-I (RGI) se conoce como regiones con 30-40 repeticiones de pares de GalA y ramnosa (Rha) [Westereng 2009 *ibidem.*], con un número variable de residuos de Rha. Los residuos de GalA se unen a los residuos de Rha en las posiciones 1 y 4, mientras que el residuo de Rha se une al residuo de GalA por las posiciones anomérica y 2-OH. En general, aproximadamente el 20-80 % de los residuos de Rha están

ramificados en la posición 4-OH (dependiendo de la fuente vegetal y el método de aislamiento), con cadenas laterales neutras y ácidas (o posición 4-OH). Estas cadenas laterales constan principalmente de residuos Ara y Gal unidos de diversas formas, que constituyen polímeros conocidos como arabinogalactano I (AG-I) y/o AG-II. El AG-I está compuesto por un esqueleto de D-Gal con enlaces beta(1,4) con sustituciones en 3-OH de grupos alfa-L-arabinosilo; el esqueleto Gal puede tener unidades alfa(1,5)-L-Ara interespaciadas. EL AG-II consta de galactano altamente ramificado con D-Galp con enlaces beta(1,3) predominantemente en el interior con sustituciones de cadenas cortas con enlaces (1,6) en el exterior. Este último tiene más uniones de L-Ara con enlaces (1,3) y/o alfa(1,5). Las cadenas laterales de oligosacáridos pueden ser lineales o ramificadas, y algunas de estas cadenas laterales pueden terminar con residuos de alfa-L-fucósidos, beta-D-glucurónidos y 4-O-metil beta-D-glucuronilo.

10 *Polisacárido de Camellia sinensis*

15 [0035] En una forma de realización de la invención, el producto comestible o composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del resfriado o la gripe comprende un polisacárido obtenido de plantas de la especie *Camellia sinensis*.

[0036] La especie *Camellia sinensis*, comúnmente conocida como la planta del té, pertenece a la familia de las teáceas (Theaceae). Preferiblemente, el polisacárido se obtiene de las hojas de esta planta.

20 [0037] La relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo se refiere al número total de residuos de ácido galacturónico presentes en el polisacárido según la invención. En consecuencia, esto incluye tanto los residuos de GalA presentes en el núcleo de RGI unidos a residuos de Rha, como los residuos de GalA presentes en los núcleos de ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) o de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4), por lo tanto unidos a otros residuos de GalA. Se considera que el ácido poligalacturónico es (parte de) un polímero de al menos 10 residuos de ácido galacturónico unidos entre sí; El ácido oligogalacturónico se considera una (parte de una) molécula de 2 a 10 residuos de ácido galacturónico unidos entre sí.

30 [0038] Por ejemplo, si la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo es de 2:1, entonces el polisacárido contiene, por residuo de ramnosilo (que está presente en el núcleo de RGI), un residuo de GalA correspondiente (que también está presente en el núcleo de RGI unido a un residuo de Rha), así como un residuo de GalA en el núcleo de ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) o de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4).

35 [0039] Si, por ejemplo, la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo es de 1:1, entonces el polisacárido contiene, por residuo de ramnosilo (presente en el núcleo de RGI), un residuo de GalA con enlaces alfa(1,2) correspondiente (también presente en el núcleo de RGI unido a un residuo de Rha). En ese caso, el polisacárido no contiene residuos de GalA del núcleo de ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) o de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4).

40 [0040] Preferiblemente, la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,2:1 a 1:1. En caso de que la relación molar sea de 1:1 o cercana a 1:1, el polisacárido consiste en su totalidad o casi en su totalidad en un núcleo de RGI, sin o en una proporción muy baja de núcleos de ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) o de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4).

45 [0041] La longitud de un núcleo de RGI varía preferiblemente de 10 a 60 unidades de disacáridos, en donde una unidad de disacárido contiene un residuo de ramnosilo y ácido galacturónico (como se ha explicado antes). Preferiblemente, la longitud del núcleo de RGI está entre 20 y 50, más preferiblemente entre 20 y 40 unidades de disacáridos.

50 [0042] Todos los polímeros según la invención modulan la respuesta inmunitaria, preferiblemente estimulan la respuesta inmunitaria. Preferiblemente, al aumentar el peso molecular, la modulación de la respuesta inmunitaria aumenta también por cantidad en peso de polisacárido. El peso molecular del polisacárido según la invención es de al menos 70 kDa. Preferiblemente, el polisacárido según la invención tiene un peso molecular de entre 70 y 2000 kDa. El polisacárido según la invención tiene preferiblemente un peso molecular de entre 70 y 110 kDa, más preferiblemente entre 110 y 2000 kDa. De manera adecuada, el polisacárido según la invención tiene un peso molecular de entre 110 y 1000 kDa, preferiblemente entre 110 y 500 kDa, o entre 500 y 1000 kDa.

60 [0043] Preferiblemente, el polisacárido según la invención comprende un polisacárido en el que dicho núcleo de ramnogalacturonano I comprende una o más cadenas laterales, en el que una o más cadenas laterales comprenden un esqueleto de al menos uno o más residuos de arabinosilo con enlaces alfa(1,5) y en el que una o más cadenas laterales tienen sustituyentes en la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo. Dicha cadena lateral preferida que comprende residuos de arabinosilo con enlaces alfa(1,5) puede ser sustancialmente lineal o ramificada. En el caso de que la cadena lateral sea principalmente lineal, la cadena lateral comprende principalmente residuos de arabinosilo con enlaces alfa(1,5), que forman el esqueleto de la cadena lateral. En el caso de que dicha cadena lateral sea una cadena lateral ramificada, entonces uno o más residuos alfa-arabinosilo se unen al 2-OH y/o 3-OH de los arabinanos con enlaces alfa(1,5).

[0044] El peso molecular preferido de la cadena lateral preferida que comprende un residuo de arabinosilo con enlaces alfa(1,5) se puede expresar como un número relativo: la relación molar entre el número de residuos de arabinosilo y el número de residuos de ramnosilo. Si el polisacárido de la invención comprende una cadena lateral que comprende un residuo de arabinosilo con enlaces alfa(1,5), preferiblemente la relación molar de residuos de arabinosilo a residuos de ramnosilo está entre 50:1 y 1:2, más preferiblemente entre 40:1 y 1:2, más preferiblemente entre 30:1 y 1:2, más preferiblemente entre 20:1 y 1:2, más preferiblemente entre 20:1 y 1:1, y más preferiblemente entre 20:1 y 2:1. Alternativamente, la relación está preferiblemente entre 10:1 y 1:2, preferiblemente entre 6:1 y 1:2, preferiblemente entre 4:1 y 1:2.

[0045] Si están presentes cadenas laterales que comprenden monómeros de arabinosilo, la longitud de las cadenas laterales (expresada como número de unidades de monómeros) está preferiblemente entre 1 y 100 unidades de monómeros, más preferiblemente entre 1 y 50 unidades, incluso más preferiblemente entre 1 y 30 unidades.

[0046] Otro polisacárido preferido según la invención es un polisacárido en el que dicho núcleo de ramnogalacturonano I comprende una o más cadenas laterales, en el que una o más cadenas laterales comprenden un esqueleto de al menos uno o más residuos de galactosilo con enlaces beta(1,4) y en el que dichas una o más cadenas laterales tienen sustituyentes en la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo. Si el polisacárido preferido según la invención comprende una cadena lateral que comprende uno o más residuos de galactano con enlaces beta(1,4), entonces la cadena lateral es principalmente una cadena lineal sin sustituyentes. Preferiblemente, otros galactanos como galactano con enlaces beta(1,3) y/o galactano con enlaces beta(1,6) están ausentes, o al menos sustancialmente ausentes, lo que significa que preferiblemente menos del 10 % en moles de los residuos de galactano que están presentes en cadenas laterales son residuos de galactano con enlaces beta(1,3) o con enlaces beta(1,6), preferiblemente menos del 5 % en moles, preferiblemente menos del 2 % en moles, preferiblemente menos del 1 % en moles.

[0047] El peso molecular preferido de la cadena lateral preferida que comprende un residuo de galactano con enlaces beta(1,4) puede expresarse como un número relativo: la relación molar entre el número de residuos de galactosilo y el número de residuos de ramnosilo. Si el polisacárido de la invención comprende una cadena lateral que comprende un residuo de galactano con enlaces beta(1,4), entonces preferiblemente la relación molar de residuos de galactosilo a residuos de ramnosilo está entre 80:1 y 1:1, más preferiblemente entre 60:1 y 1:1, más preferiblemente entre 50:1 y 1:1, más preferiblemente entre 30:1 y 1:1, más preferiblemente entre 20:1 y 1:1, más preferiblemente entre 20:1 y 2:1, y más preferiblemente entre 20:1 y 3:1. Alternativamente, preferiblemente la relación está entre 30:1 y 1:2, preferiblemente entre 25:1 y 1:1, preferiblemente entre 20:1 y 1:1, preferiblemente entre 10:1 y 2:1, preferiblemente entre 6:1 y 2:1.

[0048] Si están presentes cadenas laterales que comprenden monómeros de galactosilo, la longitud de las cadenas laterales (expresada como número de unidades de monómeros) preferiblemente está entre 1 y 100 unidades de monómeros, más preferiblemente entre 1 y 50 unidades, incluso más preferiblemente entre 1 y 30 unidades.

[0049] Si el polisacárido según la invención comprende cadenas laterales que tienen sustituyentes en la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo del núcleo de ramnogalacturonano I, entonces preferentemente como máximo el 5 % de las cadenas laterales son cadenas laterales de arabinogalactano, más preferentemente como máximo el 1 % de las cadenas laterales son cadenas laterales de arabinogalactano. Debe entenderse que esto significa que preferiblemente el polisacárido según la invención no tiene sustancialmente cadenas laterales de arabinogalactano, más preferiblemente carece de cadenas laterales de arabinogalactano. Las cadenas laterales de arabinogalactano son cadenas laterales que comprenden residuos tanto de arabinosilo como de galactosilo. El arabinogalactano I (AGI) y el AGII se han descrito anteriormente.

[0050] Preferiblemente, el núcleo de RGI del polisacárido de la invención comprende cadenas laterales, de modo que al menos el 20 % en moles de los residuos de ramnosilo tiene sustituyentes en la posición 4-OH, preferiblemente al menos el 30 % en moles, preferiblemente al menos el 40 % en moles, preferiblemente al menos el 45 % en moles, y preferiblemente como máximo 90 % en moles, preferiblemente como máximo 80 % en moles.

[0051] Preferiblemente, en general el polisacárido según la invención tiene un leve efecto, si es que lo tiene, sobre la viscosidad o espesamiento de las composiciones líquidas cuando se disuelve, en comparación con las pectinas estándar. Con el aumento del peso molecular, el efecto espesante aumenta preferiblemente por unidad de peso; sin embargo, este efecto espesante preferiblemente sigue siendo leve. Preferiblemente, el efecto como espesante depende del grado de ramificación de las posibles cadenas laterales y/o de la longitud media de las cadenas laterales del núcleo de RGI: al aumentar la ramificación y/o aumentar la longitud media de las cadenas laterales, el efecto de espesamiento se reduce.

[0052] El polisacárido según la invención comprende residuos de los monómeros ramnosa, ácido galacturónico y, si el polímero comprende una o más cadenas laterales, el polisacárido puede contener también residuos de arabinosa y/o galactosa. Además, el polisacárido puede contener cantidades menores de residuos de los

monómeros fucosa, glucosa, ácido glucurónico, xilosa y/o ácido urónico. Estos monómeros pueden, por ejemplo, terminar cadenas laterales, si están presentes. En una forma de realización preferida, la invención está orientada a polisacáridos que comprenden xilosa.

5 [0053] Los métodos para determinar las estructuras de los polisacáridos de la presente invención son conocidos por los expertos. Estos métodos incluyen análisis usando RMN de  $^1\text{M}$  y  $^{13}\text{C}$ .

10 [0054] Un método adecuado para la ingesta de los polisacáridos o dicha preparación según la invención puede ser la ingesta oral del producto comestible o composición farmacéutica. Alternativamente, el polisacárido o dicha preparación pueden incorporarse como ingredientes en una composición farmacéutica que es común en el ámbito. Pueden existir diferencias entre los efectos inmunomoduladores entre diferentes especies animales, incluyendo los humanos. Los efectos inmunitarios en la presente invención se han establecido usando células inmunitarias humanas y, por lo tanto, son más pertinentes para la inmunomodulación en humanos y mamíferos relacionados.

15 [0055] La respuesta inmunitaria fisiológica de un consumidor que consume el polisacárido de la invención se puede determinar mediante análisis *ex vivo* de la actividad de las células fagocíticas y asesinas naturales (NK) de ese consumidor. La respuesta inmunomoduladora tras la ingesta de los polisacáridos según la invención ocurre generalmente en unas pocas horas, por ejemplo 2 o 3 horas. El efecto puede durar unas 24 horas o más. De manera adecuada, tras el consumo continuo de productos que contienen el polisacárido según la invención, por ejemplo una o dos veces al día en días consecutivos, la respuesta inmunitaria se puede estimular y prolongar, y se puede reforzar la defensa natural del consumidor contra la gripe o el resfriado.

20 [0056] La dosis diaria de un polisacárido según la invención requerida para obtener el efecto modulador de la respuesta inmunitaria preferido preferiblemente está entre 1 y 10000 miligramos al día. Más preferiblemente, la cantidad de polisacárido dosificada está entre 5 y 10000 miligramos al día, preferiblemente entre 10 y 10000 miligramos al día, incluso más preferiblemente entre 10 y 5000 miligramos al día. Es más preferible que la cantidad dosificada esté entre 10 y 1000 miligramos al día y, de la manera más preferible, entre 10 y 500 miligramos al día. Esta cantidad se puede dosificar como una sola dosis al día, o como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 dosis al día. Preferiblemente, la cantidad adecuada de polisacáridos según la invención se administra en 1 o 2 dosis al día.

30 *Producto comestible o composición farmacéutica*

[0057] Preferiblemente, la concentración del polisacárido en el producto comestible o composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del resfriado o la gripe está entre el 1 % y el 10 % en peso, más preferiblemente entre el 2 % y el 10 % en peso, más preferiblemente entre el 3 % y el 10 % en peso, más preferiblemente entre el 4 % y el 10 % en peso, y de la manera más preferible entre el 5 % y el 9 % en peso. Los polisacáridos según la invención pueden estar presentes en el producto comestible o composición farmacéutica en su forma nativa, es decir, como constituyente de un material vegetal que se utiliza en el producto comestible o composición farmacéutica. No obstante, preferiblemente, el producto comestible o la composición farmacéutica está enriquecido/a con el polisacárido según la invención. Esto significa que el polisacárido posiblemente no solo está presente en su forma nativa como constituyente de un material vegetal, sino que, además, el polisacárido también se agrega como ingrediente al producto comestible o composición farmacéutica. El polisacárido se puede añadir en forma pura o como parte de un extracto enriquecido en el polisacárido o en cualquier otra forma adecuada. Por tanto, preferiblemente, el producto comestible o composición farmacéutica según la invención comprende preferiblemente del 0,0001 al 25 % en peso del polisacárido, en el que al menos una parte de los polisacáridos se agrega al producto comestible o composición farmacéutica en forma enriquecida. Preferiblemente, la concentración del polisacárido en la composición según la invención está entre el 0,5 % y el 10 % en peso, preferiblemente entre el 1 % y el 10 % en peso, más preferiblemente entre el 2 % y el 10 % en peso, más preferiblemente entre el 3 % y el 10 % en peso, más preferiblemente entre el 4 % y el 10 % en peso, y de la manera más preferible entre el 5 % y el 9 % en peso, en el que al menos una parte de los polisacáridos se añade al producto comestible o composición farmacéutica en forma enriquecida. Los polisacáridos según la invención pueden añadirse al producto comestible o composición farmacéutica en una forma de sal específica.

55 [0058] El producto comestible según la presente invención puede adoptar cualquier forma física. En particular, puede ser un producto alimenticio, una bebida, un producto alimenticio dietético o un producto alimenticio clínico. También puede ser un suplemento dietético, en forma de bebida, comprimido, cápsula o cualquier otra forma adecuada de suplemento dietético. Los productos comestibles preferidos para la incorporación del polisacárido según la invención se encuentran en forma de líquido, tal como una sopa o bebida, un producto para untar, un aderezo, un postre o un pan. Si el producto comestible preferido es una sopa, esta puede ser una sopa líquida o una sopa deshidratada a la que el consumidor puede añadir agua caliente. El producto comestible puede estar en forma líquida o untable, puede ser un producto sólido o sólido blando que se puede comer con cuchara, o puede ser un complemento alimenticio. Preferiblemente, el producto comestible es un producto líquido. El producto comestible puede adoptar la forma de, por ejemplo, una sopa, una bebida, un producto para untar, un aderezo, un postre, un pan. Más preferiblemente, el producto comestible es una bebida, un postre o un producto para untar. Más preferiblemente, el producto comestible es una bebida o un producto para untar, especialmente un producto para untar en forma de emulsión de aceite en agua o de agua en aceite. El término "para untar" como se usa en

este documento abarca productos para untar tales como margarina, margarina *light*, productos a base de queso para untar, queso procesado, productos lácteos para untar y productos para untar alternativos a los lácteos. Los productos para untar como se usan en este documento (emulsiones de aceite en agua o agua en aceite) pueden tener una concentración de aceite y/o grasa de entre aproximadamente el 5 % y el 85 % en peso, preferiblemente entre el 10 % y el 80 % en peso, más preferiblemente entre el 20 % y el 70 % en peso. Preferiblemente, el aceite y/o la grasa son de origen vegetal (tales como, entre otros, aceite de girasol, aceite de palma, aceite de colza); También se pueden incluir en la composición aceites y/o grasas de origen no vegetal (tales como, entre otros, grasas lácteas, aceite de pescado).

[0059] De la manera más preferible, el producto es una bebida. Una bebida de este tipo contiene típicamente al menos 60 % en peso de agua y de 0 a 20 % en peso de aceite o grasa dispersos. Preferiblemente, dicha bebida contiene al menos 70 % en peso de agua y de 0 a 10 % en peso de aceite o grasa dispersos.

[0060] Un aderezo en el contexto de la presente invención es generalmente una emulsión de aceite en agua, que puede contener entre un 0,1 y un 85 % de aceite y/o grasa. La mayonesa es un ejemplo de aderezo dentro del contexto de la presente invención. Los aderezos como se usan en este documento (emulsión de aceite en agua) pueden tener una concentración de aceite y/o grasa de entre aproximadamente 50,1 y 85 % en peso, preferiblemente de entre 5 % y 80 % en peso, más preferiblemente de entre 10 % y 70 % en peso. Preferiblemente, el aceite y/o la grasa son de origen vegetal (tales como, entre otros, aceite de girasol, aceite de palma, aceite de colza); También se pueden incluir en la composición aceites y/o grasas de origen no vegetal (tales como, entre otros, grasas lácteas, aceite de pescado).

[0061] Una composición farmacéutica en el contexto de la presente invención abarca, pero no se limita a, medicamentos con receta, medicamentos sin receta, medicamentos de venta libre, suplementos dietéticos, alimentos dietéticos, alimentos clínicos, productos comestibles, comprimidos, cápsulas, píldoras y productos alimenticios tales como bebidas o cualquier otro producto alimenticio adecuado, y cualquier otra composición que sea comúnmente conocida por los expertos. Alternativamente, el medicamento puede ser una sustancia inyectable o una sustancia inhalable, como un aerosol nasal. En el caso de una composición farmacéutica, la composición puede contener más del 25 % en peso del polisacárido según la invención, preferiblemente más del 30 % en peso, preferiblemente más del 40 % en peso, o preferiblemente más del 50 % en peso, o preferiblemente incluso más del 75 % en peso.

[0062] Los productos comestibles adecuados para esta invención pueden ser cualquier producto alimenticio, incluyendo bebidas, productos alimenticios dietéticos y productos alimenticios clínicos. La concentración del polisacárido según la invención debe ser tal que se produzca una modulación de la respuesta inmunitaria después del consumo del producto alimenticio en una cantidad estándar. Una cantidad estándar es la cantidad que un consumidor medio consume de dicho producto alimenticio en un momento de consumo específico.

[0063] La concentración de polisacáridos requerida en el producto comestible depende del producto comestible específico y de la cantidad de dicho producto que se consuma habitualmente. Preferiblemente, los polisacáridos según la invención se incorporan en productos comestibles que normalmente se consumen en una cantidad predefinida. Por ejemplo, una barrita de cereales generalmente va envasada individualmente y también se consume individualmente. Por lo general, el peso de una barrita de este tipo está entre 40 y 80 gramos. Del mismo modo, las minibebidas lácteas se consumen en botellas pequeñas, que tienen un volumen de aproximadamente 100 mililitros.

[0064] Al incorporar los polisacáridos en dichos productos alimenticios, en principio se puede controlar la ingesta diaria de polisacáridos. Preferiblemente, los polisacáridos se administran al consumidor en 1 o 2 dosis al día. El experto en la materia puede calcular la concentración requerida del polisacárido en una cantidad unitaria del producto comestible, preferiblemente producto alimenticio.

[0065] Una cantidad unitaria de un producto alimenticio es una cantidad de un producto alimenticio que generalmente se consume en una sola ración. La cantidad unitaria o el tamaño de la porción de tales productos alimenticios depende del producto específico. Algunos ejemplos no limitativos de tamaños de ración típicos son:

- leche, yogur: 200 mL
- queso natural: 43 gramos
- queso fundido: 57 gramos
- zumos de frutas: 177 mL
- refresco: 200 mL
- pan: 1 rebanada, 35 gramos
- café: 125 mL
- té: 150 mL
- barrita de cereales, barritas de chocolate: 50 gramos
- chocolate: 30 gramos
- helado: 100 mL

productos untables: 15 gramos  
 sopa: 250 mL  
 bebidas de cacao: 200 mL

5 [0066] Una cantidad unitaria de un producto alimenticio en el contexto de la presente invención se puede envasar  
 y vender como una sola ración. Por ejemplo, el helado se puede envasar como unidades individuales, haciendo  
 que dicha ración individual sea una cantidad unitaria en el contexto de la presente invención. El peso o volumen  
 real de dicho producto envasado individualmente puede ser mayor o menor que el indicado anteriormente para un  
 tamaño de porción estándar. Por ejemplo, las bebidas lácteas probióticas se consumen en botellas pequeñas,  
 10 envasadas individualmente, que tienen un volumen de aproximadamente 100 ml.

*Polisacáridos de Daucus carota*

15 [0067] En una forma de realización de la invención, el producto comestible o composición farmacéutica para su  
 uso en el tratamiento del resfriado o de la gripe comprende polisacáridos que se obtienen de plantas de la especie  
*Daucus carota*. El polisacárido más preferido se obtiene de la raíz de la especie *Daucus carota* subesp. *sativus*.

20 [0068] La especie *Daucus carota* incluye la zanahoria silvestre, cuya raíz es comestible. Preferiblemente, el  
 polisacárido se obtiene de la especie *Daucus carota* subesp. *sativus*, que se llama zanahoria común. La zanahoria  
 es un tubérculo ampliamente conocido, generalmente de color naranja, rojo, morado, blanco o amarillo.

25 [0069] Cuando el producto comestible o composición farmacéutica según la invención comprende polisacáridos  
 que se obtienen de la especie *Daucus carota* subesp. *sativus*, más preferiblemente de la raíz de la especie *Daucus*  
*carota* subesp. *sativus* (de la zanahoria), la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de  
 ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,5:1 a 1:1, preferiblemente de 1,2:1 a 1:1.

[0070] Preferiblemente, el polisacárido tiene un peso molecular de al menos 110 kDa, de la manera más preferible  
 de entre 110 y 2000 kDa.

30 [0071] Preferiblemente, el polisacárido según la invención que se obtiene de *Daucus carota* subesp. *sativus*  
 contiene cadenas laterales conectadas a la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo, donde las cadenas  
 laterales comprenden residuos de arabinosilo, y donde la relación molar de residuos de arabinosilo a residuos de  
 ramnosilo del polisacárido está entre 50:1 y 5:1, más preferiblemente entre 30:1 y 5:1, de la manera más preferible  
 entre 20:1 y 5:1.

35 [0072] Preferiblemente, el polisacárido según la invención que se obtiene de *Daucus carota* subesp. *sativus*,  
 contiene cadenas laterales conectadas a la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo, donde las cadenas  
 laterales comprenden residuos de galactosilo, y donde la relación molar de residuos de galactosilo a residuos de  
 ramnosilo del polisacárido está entre 50:1 y 5:1, más preferiblemente entre 30:1 y 5:1, de la manera más preferible  
 40 entre 20:1 y 5:1.

[0073] Preferiblemente, el número de cadenas laterales es tal que al menos el 40 % en moles de los residuos de  
 ramnosilo del núcleo de ramnogalacturonano I tiene sustituyentes, preferiblemente al menos el 50 % en moles y  
 preferiblemente como máximo el 90 % en moles, más preferiblemente como máximo el 80 % en moles.

45 [0074] En otra forma de realización preferida, cuando el producto comestible o composición farmacéutica según la  
 invención comprende polisacáridos que se obtienen de la raíz de la especie *Daucus carota* subesp. *sativus* (de la  
 zanahoria), la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del  
 polisacárido puede variar de 25:1 a 1:1, preferiblemente de 20:1 a 1:1, más preferiblemente de 20:1 a 10:1. En ese  
 50 caso, el polisacárido tiene preferiblemente un peso molecular de entre 70 y 110 kDa.

[0075] Además, dicho polisacárido obtenido de *Daucus carota* subesp. *sativus* contiene cadenas laterales  
 conectadas a la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo, donde las cadenas laterales comprenden residuos  
 de arabinosilo, y donde la relación molar de residuos de arabinosilo a residuos de ramnosilo del polisacárido está  
 55 entre 20:1 y 2:1, más preferiblemente entre 15:1 y 3:1, de la manera más preferible entre 14:1 y 7:1. Además, dicho  
 polisacárido obtenido de *Daucus carota* subesp. *sativus* preferiblemente contiene cadenas laterales conectadas a  
 la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo, en donde las cadenas laterales comprenden residuos de galactosilo,  
 y donde la relación molar de residuos de galactosilo a residuos de ramnosilo del polisacárido está entre 20:1 y 2:1,  
 más preferiblemente entre 15:1 y 3:1, de la manera más preferible entre 10:1 y 3:1.

60 [0076] Preferiblemente, el número de cadenas laterales es tal que al menos el 50 % en moles de los residuos de  
 ramnosilo del núcleo de ramnogalacturonano I tiene sustituyentes, preferiblemente al menos el 60 % en moles, y  
 preferiblemente como máximo el 90 % en moles, más preferiblemente como máximo el 80 % en moles.

65 *Polisacáridos de Glycine max*

[0077] En otra forma de realización, el producto comestible o composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del resfriado o la gripe comprende un polisacárido que se obtiene de una o más plantas pertenecientes a la especie *Glycine max*, comúnmente conocida como soja.

5 [0078] Cuando el producto comestible o composición farmacéutica según la invención comprende polisacáridos que se obtienen de la especie *Glycine max*, más preferiblemente de soja, la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,5:1 a 1:1, preferiblemente de 1,2:1 a 1:1.

10 [0079] Preferiblemente, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 70 y 2000 kDa, más preferiblemente entre 70 y 110 kDa, más preferiblemente al menos 110 kDa, de la manera más preferible entre 110 y 2000 kDa.

[0080] Preferiblemente el polisacárido según la invención que se obtiene de *Glycine max* contiene cadenas laterales conectadas a la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo, donde las cadenas laterales comprenden 15 residuos de arabinosilo, y donde la relación molar de residuos de arabinosilo a residuos de ramnosilo del polisacárido está entre 50:1 y 1: 2, más preferiblemente entre 40:1 y 1:1, y más preferiblemente entre 30:1 y 2:1, más preferiblemente entre 25:1 y 3:1.

[0081] Preferiblemente el polisacárido según la invención que se obtiene de *Glycine max* contiene cadenas laterales conectadas a la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo, en donde las cadenas laterales comprenden 20 residuos de galactosilo, y donde la relación molar de residuos de galactosilo a residuos de ramnosilo del polisacárido está entre 70:1 y 1: 2, más preferiblemente entre 60:1 y 1:1, y más preferiblemente entre 50:1 y 2:1, más preferiblemente entre 40:1 y 5:1.

25 [0082] Preferiblemente, el número de cadenas laterales es tal que al menos el 40 % en moles de los residuos de ramnosilo del núcleo de ramnogalacturonano I tiene sustituyentes, preferiblemente al menos el 50 % en moles, y preferiblemente como máximo el 90 % en moles, preferiblemente como máximo el 80 % en moles.

*Polisacáridos de Malus domestica*

30 [0083] En otra forma de realización, el producto comestible o composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del resfriado o de la gripe comprende un polisacárido según la invención, donde dicho polisacárido se obtiene de una o más plantas pertenecientes a la especie *Malus domestica*, comúnmente conocida como manzano. De la manera más preferible, el polisacárido se obtiene del fruto de la especie *Malus domestica*, que es la 35 comúnmente conocida manzana.

[0084] Cuando el producto comestible o composición farmacéutica según la invención comprende polisacáridos que se obtienen de la especie *Malus domestica*, más preferiblemente de la manzana, entonces la relación molar 40 de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,5:1 a 1:1, preferiblemente de 1,2:1 a 1:1.

[0085] Preferiblemente, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 70 y 2000 kDa, preferiblemente de entre 70 y 110 kDa, preferiblemente de entre 110 y 2000 kDa. Preferiblemente, el polisacárido según la invención que 45 se obtiene de *Malus domestica* contiene cadenas laterales conectadas a la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo, donde las cadenas laterales comprenden residuos de arabinosilo, y donde la relación molar de residuos de arabinosilo a residuos de ramnosilo del polisacárido está entre 10:1 y 1:2, preferiblemente entre 5 :1 y 1:2.

[0086] Preferiblemente, el polisacárido según la invención que se obtiene de *Malus domestica* contiene cadenas laterales conectadas a la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo, donde las cadenas laterales comprenden 50 residuos de galactosilo, y donde la relación molar de residuos de galactosilo a residuos de ramnosilo del polisacárido está entre 10:1 y 1:2, preferiblemente entre 5 :1 y 1:1.

[0087] Preferiblemente, el número de cadenas laterales es tal que al menos el 50 % en moles de los residuos de ramnosilo del núcleo de ramnogalacturonano I tiene sustituyentes, preferiblemente al menos el 60 % en moles, y 55 preferiblemente como máximo el 90 % en moles, preferiblemente como máximo el 80 % en moles.

*Polisacáridos de Beta vulgaris L.*

60 [0088] En otra forma de realización, el producto comestible o composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del resfriado o de la gripe comprende un polisacárido según la invención, donde dicho polisacárido se obtiene de una o más plantas pertenecientes a la especie *Beta vulgaris* L., de la manera más preferible, el polisacárido se obtiene de la raíz de la especie *Beta vulgaris* L., que es la comúnmente conocida remolacha 65 azucarera.

[0089] Cuando el producto comestible o composición farmacéutica según la invención comprende polisacáridos que se obtienen de la especie *Beta vulgaris* L., más preferiblemente de la raíz de *Beta vulgaris* L. (remolacha

azucarera), la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,5:1 a 1:1, preferiblemente de 1,2:1 a 1:1.

5 [0090] Preferiblemente, el polisacárido tiene un peso molecular de al menos 110 kDa, más preferiblemente de entre 110 y 2000 kDa.

10 [0091] Preferiblemente, el polisacárido según la invención que se obtiene de *Beta vulgaris* L. contiene cadenas laterales conectadas a la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo, donde las cadenas laterales comprenden residuos de arabinosilo, y donde la relación molar de residuos de arabinosilo a residuos de ramnosilo del polisacárido está entre 50:1 y 1: 2, preferiblemente entre 40:1 y 1:1, más preferiblemente entre 35:1 y 5:1.

15 [0092] Preferiblemente, el polisacárido según la invención que se obtiene de *Beta vulgaris* L. contiene cadenas laterales conectadas a la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo, en donde las cadenas laterales comprenden residuos de galactosilo y donde la relación molar de residuos de galactosilo a residuos de ramnosilo del polisacárido está entre 10:1 y 1:2, preferiblemente entre 5:1 y 1:1.

20 [0093] Preferiblemente, el número de cadenas laterales es tal que al menos el 40 % en moles de los residuos de ramnosilo del núcleo de ramnogalacturonano I tiene sustituyentes, preferiblemente al menos el 50 % en moles, y preferiblemente como máximo el 90 % en moles, preferiblemente como máximo el 80 % en moles.

25 [0094] Los productos alimenticios preferidos según la invención pueden estar deshidratados y contener menos del 40 % de agua en peso de la composición, preferiblemente menos del 25 %, más preferiblemente del 1 al 15 %. Alternativamente, el alimento puede ser sustancialmente acuoso y contener al menos 40 % de agua en peso de la composición, preferiblemente al menos 50 %, más preferiblemente de 65 a 99,9 %.

30 [0095] El alimento comprende preferiblemente nutrientes que incluyen carbohidratos (incluyendo azúcares y/o almidones), proteínas, grasas, vitaminas, minerales, fitonutrientes (incluyendo terpenos, compuestos fenólicos, organosulfuros o una mezcla de los mismos) o mezclas de los mismos. La fuente del material proteico no está limitada y puede ser, por ejemplo, de origen lácteo (como caseína, lactoglobulina) o de origen vegetal (como soja, guisante, etc.). El alimento puede ser bajo en calorías (por ejemplo, tener un contenido de energía de menos de 100 kCal por 100 gramos de la composición) o puede tener un alto contenido en calorías (por ejemplo, tener un contenido de energía de más de 100 kCal por 100 g de la composición, preferiblemente entre 150 y 1000 kCal). El alimento también puede contener sal, aromas, colorantes, conservantes, antioxidantes, edulcorantes no nutritivos o mezclas de estos. Las vitaminas y minerales adecuados incluyen, pero no se limitan a, vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina C, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, ácido fólico, vitamina B12 (cianocobalamina), biotina, ácido pantoténico, calcio, fósforo, potasio, hierro, zinc, cobre, yodo, selenio, sodio, magnesio, manganeso, molibdeno, vitamina K, cromo y mezclas de estos. Los ingredientes preferidos para suministrar vitaminas y minerales incluyen, pero no se limitan a, fosfato de potasio, fosfato de calcio, óxido de magnesio, fosfato de magnesio, ácido ascórbico, ascorbato de sodio, acetato de vitamina E, niacinamida, ortofosfato férrico, pantotenato de calcio, óxido de zinc, gluconato de zinc, palmitato de vitamina A, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, mononitrato de tiamina, biotina, ácido fólico, cloruro de cromo, yoduro de potasio, molibdato de sodio, selenato de sodio, fitonadona (vitamina K), colecalciferol (vitamina D3), sulfato de manganeso y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el producto según la invención contiene al menos un 10 % o más de la cantidad diaria recomendada ("CDR") de las vitaminas y minerales.

45 [0096] Los productos según la invención pueden incluir además carne, pescado, extractos de carne y pescado, frutas, frutos secos, concentrados de frutas, extractos de frutas, zumos de frutas, té (por ejemplo, té verde), verduras, extractos y concentrados de verduras, frutos secos, extractos de frutos secos, chocolate, pan, vinagre, sal, pimienta, cacao en polvo, hierbas (por ejemplo, perejil), extractos de hierbas, especias (por ejemplo, canela), extractos de especias, emulsionantes, reguladores de la acidez (por ejemplo, ácidos fosfórico, málico, cítrico, tartárico y sus sales), flavonoides, conservantes (por ejemplo, ácido láctico, EDTA, tocoferoles, benzoato de sodio), colorantes (por ejemplo, betacaroteno, licopeno, caramelo, rojo carmín), fibras (por ejemplo, soja), agentes leudantes (por ejemplo, bicarbonato de sodio), pectina, ácido cítrico, levadura, sal, glicerina y mezclas de los mismos.

50 [0097] La presente invención proporciona además un método para la preparación de un producto comestible o composición farmacéutica, donde dicho método comprende incorporar 0,5-10 % en peso de un polisacárido que tiene un esqueleto que comprende núcleos alternos de ramnogalacturonano-I y ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) o núcleos de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4) o que tiene un esqueleto que consiste en un núcleo de ramnogalacturonano I; en el que el polisacárido tiene un peso molecular de al menos 70 kD; y en el que el polisacárido se obtiene de plantas de la especie *Camellia sinensis* y en el que la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 2,5:1 a 1:1.

65 [0098] El polisacárido según la invención se puede incorporar en un producto comestible o composición farmacéutica poniendo en contacto el polisacárido en forma purificada con otros ingredientes del producto

comestible o composición farmacéutica. De manera adicional o alternativa, un material vegetal que contiene los polisacáridos según la invención puede ponerse en contacto con otros ingredientes del producto comestible o composición farmacéutica. Estos pasos pueden realizarse en cualquier etapa del proceso de producción. Por ejemplo, los polisacáridos pueden mezclarse en un producto comestible o una composición farmacéutica ya preparado/a o casi preparado/a o pueden ponerse en contacto con ingredientes, de modo que los ingredientes se mezclen posteriormente y se prepare el producto comestible o la composición farmacéutica.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0099]

**Figura 1:** Representación esquemática de un polisacárido preferido según la invención:

- 1: residuo de ácido galacturónico en el núcleo de RGI
- 2: residuo de ramnosilo en el núcleo de RGI
- 3: residuo de galactosilo en la cadena lateral, conectado a la posición 4-OH del residuo de ramnosilo
- 4: residuo de arabinosilo en la cadena lateral, conectado a la posición 4-OH del residuo de ramnosilo

**Figura 2:** Efecto inmunomodulador de los polisacáridos, obtenidos del fruto de la especie *Malus domestica* (manzana); análisis de células de sangre total.

Concentración de extracto en microgramos por mililitro (eje x) frente a porcentaje de fagocitosis (eje y).

**Figura 3:** Efecto inmunomodulador de los polisacáridos, obtenidos del grano de la especie *Glycine max* (soja); Ensayo de células HL60.

Concentración de extracto en microgramos por mililitro (eje x) frente a porcentaje de fagocitosis (eje y).

## EJEMPLOS

[0100] Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran la presente invención.

### Métodos

#### *Separación de polisacáridos por peso molecular*

[0101] Los polisacáridos obtenidos por extracción con agua hirviendo se separan mediante cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 (1 x 30 cm; GE Healthcare). Las muestras de polisacárido se disuelven en bicarbonato de amonio 0,1 M y se procesan alícuotas de 5-15 mg en la columna en el mismo tampón. Los componentes de elución se detectan por absorción a 214 nm.

[0102] Los polisacáridos se agrupan en tres fracciones:  $P_M > 110$  kDa, 70-110 kDa y 40-70 kDa. Los límites de agrupación se determinan comparando las posiciones de elución de los estándares de dextrano de 40 kDa, 70 kDa y 110 kDa (de GE Healthcare).

#### *Análisis de sustitución y composición de polisacáridos*

[0103] La composición de las fracciones de polisacáridos obtenidas del proceso de extracción se determina mediante análisis de RMN. Antes del análisis de RMN, las muestras secas de polisacárido (1-10 mg) se disuelven en óxido de deuterio ( $D_2O$ ) y se secan en una centrifuga de vacío. Luego, las muestras se disuelven en 600 microlitros de  $D_2O$ . Los espectros de se recogen en un espectrómetro de RMN Varian Unity 500 a 296 K y se determinan según el estándar interno de acetona (2,225 ppm).

[0104] En referencia a la tabla 1, el nivel de sustitución de polisacáridos y la composición molar de las unidades de construcción se analizan utilizando los datos de RMN de la siguiente manera:

- Nivel de sustitución de ramnogalacturonano  
La relación entre las unidades ramnosilo con sustituyentes en la posición 4 y las unidades sin sustituyentes se estima integrando las señales  $-CH_3$  desdobladas de ramnosa. Los protones  $CH_3$  en las unidades de ramnosilo con sustituyentes en la posición 4 resuenan a alrededor de 1,32 ppm, mientras que los de las unidades de ramnosilo sin sustituyentes lo hacen a 1,25 ppm.
- Relación molar de galactanos y arabinanos  
La cantidad molar de galactanos y arabinanos se analiza integrando la señal H-1 de  $\beta$ 1,4-galactano observada (4,64 ppm) y las señales H-1 de arabinano (-5Ara H-1, 5,09 ppm; -3,5Ara H-1 5,12 ppm; Ara $\alpha$ 1-3 terminal 5,15 ppm; Ara $\alpha$ 1-2 terminal 5,18 ppm; - 2,3,5Ara H-1 5,26 ppm. Estos valores de integración se comparan con las señales  $-CH_3$  de ramnosa integradas.
- Relación ácido poligalacturónico/RGI

La relación de ácido poligalacturónico a RGI se analiza de la siguiente manera: La cantidad total de señales H-4 de ácido galacturónico se integra entre 4,42 y 4,47 ppm, y la cantidad de ramnosa se obtiene mediante la integración de las señales -CH<sub>3</sub> (1,25-1,32 ppm). La señal H-4 de la unidad GalAα1-2 específica de RGI está ubicada en la misma señal 4,42-4,47, y su porción debe deducirse de la señal H-4 total. Este valor es el mismo que la cantidad de ramnosa, ya que RGI es un polímero 1:1 de Rha y GalA. La señal H-4 restante representa la parte de la señal H-4 de ácido poligalacturónico de tipo GalAα1-4.

#### Ensayos *in vitro*

[0105] Se utilizan dos ensayos para determinar la respuesta inmunomoduladora de los polisacáridos *in vitro*, ambos basados en la actividad de fagocitosis. Estos ensayos son:

#### Análisis de células de sangre total

[0106] La actividad de fagocitosis en sangre total se evalúa usando el kit Phagotest® de Orpegen Pharma (Heidelberg, Alemania) usando un protocolo ajustado. Se obtiene sangre reciente de voluntarios humanos sanos en *vacutainers* de heparina sódica (BD Biosciences). Se incuban 30 microlitros de sangre total y 5 microlitros del ingrediente por duplicado durante 30 minutos en una placa de polipropileno de 96 pocillos a 37 °C en baño de agua. Las incubaciones de referencia consistieron en PBS (= actividad de fagocitosis basal) o 100 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* (= muestra de referencia positiva) por triplicado. Después del paso de incubación, se añaden 10 microlitros de *E. coli* marcado con FITC (proporción de glóbulos blancos a *E. coli* de 25:1). Esta incubación a 37 °C se detiene después de 6,5 minutos mediante la adición de 50 microlitros de atenuador enfriado con hielo. Las células se lavan tres veces mediante la adición de 230 microlitros de tampón de lavado enfriado con hielo y se centrifugan durante 3 min a 300 g (4 °C). Los eritrocitos se lisan usando 290 microlitros de tampón de lisis. Después de la incubación en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente, las células se centrifugan durante 5 minutos a 300 g (4 °C). Las células se resuspenden en 150 microlitros de tampón de lavado y se tiñen con yoduro de propidio. El análisis se realiza mediante citometría de flujo (citómetro de flujo Coulter FC500 MPL, Beckman Coulter Nederland BV, Mijdrecht). Dentro de los leucocitos, los granulocitos se agrupan de acuerdo con el perfil FSC/SSC. Se determina el porcentaje de células fagocitantes en la población de granulocitos. Los resultados se normalizan al rango dinámico entre la fagocitosis basal y estimulada por LPS y se expresan como un porcentaje relativo de actividad de fagocitosis. Un porcentaje normalizado superior al 40 % se considera positivo.

#### Ensayo de células HL60

[0107] La línea celular de la leucemia promielocítica humana HL60 se usa para determinar la capacidad de los ingredientes para potenciar la fagocitosis. Esta línea celular se puede diferenciar hacia el linaje de monocitos con vitamina D3 y posteriormente las células obtienen capacidad fagocítica. 48 horas antes del inicio del ensayo, las células HL60 se diferencian a lo largo del linaje monocítico mediante la adición de 1α,25-dihidroxitamina D3 (VitD3) al medio. Tras la diferenciación, 200 microlitros de células HL60 (8x10<sup>5</sup> células/ml) se transfieren a placas de fondo plano de 96 pocillos por triplicado. Se añaden microesferas marcadas con fluorescencia (relación perlas: células, 19:1) y se incuban durante 24 horas a 37 °C. Las incubaciones de referencia consisten en células HL60 diferenciadas en PBS (= nivel de fagocitosis basal) o 100 ng/ml de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* (= muestra de referencia positiva) por triplicado. Después del período de incubación, las células se transfieren a una placa de fondo en V de 96 pocillos, se lavan tres veces y se fijan con formaldehído. Para el análisis, las células se transfieren a una placa de fondo transparente de 96 pocillos y la intensidad de la fluorescencia se analiza usando un fluorómetro Flex Station II. Los datos se normalizan usando el control positivo y se expresan como un porcentaje relativo de actividad de fagocitosis. Un porcentaje normalizado superior al 40 % se considera positivo.

#### 50 Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de polisacáridos

[0108] Se utilizaron diversos materiales vegetales para extraer los polisacáridos. Los polisacáridos se obtuvieron de las siguientes materias primas:

- 55 - hojas de la especie *Camellia sinensis* (té); se determinó la composición de polisacáridos de varias muestras;
- raíces de la especie *Daucus carota* subesp. *sativus* (zanahoria);
- fruto de la especie *Malus domestica* (manzana);
- raíz de la especie *Beta vulgaris* L. (remolacha azucarera);
- 60 - grano de la especie *Glycine max* (soja), la fuente de los polisacáridos son los polisacáridos de soja solubles en agua de Fuji Oil (Japón).

[0109] El procedimiento para obtener los materiales fue el siguiente. Se lavaron 25 g de material vegetal insoluble en metanol 2 veces con 200 ml de etanol al 85 % (VWR Prolabo) en agua durante 2,5 horas a 80 °C y 1 vez con 200 ml de etanol al 85 % en agua durante 1,5 horas a 80 °C. Después de decantar el etanol, el sedimento se secó durante la noche en una cabina de humos. Los polisacáridos se extrajeron añadiendo 200 ml de agua

desmineralizada (MilliQ) y se hirvieron durante 3 horas a presión atmosférica. Después de centrifugar a 2000 g durante 20 min a temperatura ambiente (TA), el sedimento se resuspendió en 200 ml de agua desmineralizada (MilliQ) y se volvió a hervir durante 3 horas. Los sobrenadantes de la primera y segunda extracción se recogieron, se liofilizaron y se almacenaron a temperatura ambiente.

5 [0110] A partir de los extractos liofilizados enriquecidos con polisacáridos, se preparó una suspensión al 2 % (p/p) en agua desmineralizada y se esterilizó en autoclave a una temperatura de aproximadamente 121 °C durante aproximadamente 15 minutos. La suspensión se centrifugó a 2000 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se purificaron adicionalmente pasándolos a través de un filtro de 0,2 micrómetros, se dividieron en pequeñas porciones y se almacenaron a -20 °C.

10 [0111] Posteriormente, se disolvieron aproximadamente 650 mg de extracto en 30 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, y se dejaron disolver con mezclado frecuente durante 1 hora. La materia insoluble se eliminó mediante centrifugación y el sobrenadante transparente se sometió a cromatografía de intercambio aniónico en una columna DEAE-sepharose (50 x 150 mm, aprox. 290 ml) equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, a un caudal de 10 ml/min. Después de la inyección, se hizo pasar el tampón de equilibrado por la columna durante 30 min en condiciones isocráticas, seguido de un gradiente de NaCl 0-1 M durante 30 min y NaCl 1 M durante 40 min adicionales. Se registró la absorbancia a 214 nm y se recogieron fracciones de 25 ml. La fracción ácida se concentró y se desaló mediante ultrafiltración sobre una membrana de 10 kDa antes de la GPC. El rendimiento no se midió en este momento.

15 [0112] Las fracciones ácidas obtenidas anteriormente se combinaron (procedentes de varias tandas) y luego se sometieron a cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 (5 cm de diámetro, 95 cm de longitud). Se utilizó Superloop en la inyección debido a los grandes volúmenes de muestra. La columna se eluyó a un caudal de 5 ml/min con bicarbonato de amonio 100 mM y se registró la absorbancia a 214 nm. Se recogieron fracciones de 25 ml.

20 [0113] Se obtuvieron polisacáridos procedentes de manzanas de la siguiente manera. Se rallaron manzanas frescas y se trataron con una preparación enzimática pectolítica experimental, Rapidase C600 (0,02 % p/p, 4 h a 45 °C; enzima obtenida de Gist Brocades, Delft, Países Bajos). La parte soluble se recuperó por centrifugación y se sometió a ultrafiltración en una membrana de corte de peso molecular de 60 kDa y luego se liofilizó. Esta fracción se saponificó adicionalmente para eliminar los ésteres metílicos y acetílicos lábiles: se disolvió una muestra de 50,4 mg de RG de manzana en 5 ml de carbonato de sodio 0,2 M, pH 10, y se dejó reaccionar durante 18 h a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se dializó durante 24 h con tres cambios de solución con bicarbonato de amonio 50 mM en un tubo de diálisis MWCO 6000-8000. Finalmente, la muestra se sometió a SPE en sílice C-18.

30 [0114] Se determinaron las siguientes composiciones de polisacáridos obtenidos de diversas fuentes.

40 **Tabla 1.** Análisis de sustitución y composición de polisacáridos obtenidos de diversas fuentes; fracciones de polisacárido separadas en Superdex 200.

Material y fracción de P <sub>M</sub>	Sust Rha 4-OH. <sup>(1)</sup>	β1-4Gal <sup>(2)</sup>	Ara <sup>(3)</sup>	α1-4GalA <sup>(4)</sup>
Té #7				
> 110 kDa	45 %	3	5	-- <sup>(5)</sup>
70-110 kDa	45 %	2	3	-- <sup>(5)</sup>
40-70 kDa (comparativo como P <sub>M</sub> <70)	65 %	3	3	-- <sup>(5)</sup>
Té #15				
> 110 kDa	50 %	6,5	0,5	-- <sup>(5)</sup>
70-110 kDa	70 %	8	1,5	-- <sup>(5)</sup>
40-70 kDa (comparativo como P <sub>M</sub> <70 kDa)	60 %	9	0,8	-- <sup>(5)</sup>
Té #218				
> 110 kDa	35 %	17	19	-- <sup>(5)</sup>
70-110 kDa (comparativo como GalA: Rha > 2,5)	70 %	8	20	46
Té #244				
> 110 kDa	37,50 %	7,5	11	-- <sup>(5)</sup>
70-110 kDa (comparativo como GalA: Rha > 2,5)	50 %	3	--	
Manzana				
> 110 kDa	80 %	3	3	-- <sup>(5)</sup>
70-110 kDa	60 %	1,5	1	1,2
40-70 kDa (comparativo como P <sub>M</sub> <70 kDa)	80 %	2	0,7	1,5
Remolacha azucarera				
> 110 kDa	60 %	1.7	29	-- <sup>(5)</sup>
70-110 kDa	60 %	1.9	20	-- <sup>(5)</sup>
40-70 kDa (comparativo como P <sub>M</sub> <70 kDa)	45 %	2.1	11	-- <sup>(5)</sup>

Zanahoria				
> 110 kDa	55 %	15	17	-- <sup>(5)</sup>
70-110 kDa (comparativo como GalA: Rha > 2,5)	70 %	5	10	16
40-70 kDa (comparativo como P <sub>M</sub> <70 kDa)	40 %	1,5	6	16
Soja				
> 110 kDa	55 %	44	23	--
70-110 kDa	50 %	26	13	--
40-70 kDa (comparativo como P <sub>M</sub> <70 kDa)	40 %	6	4	3
<b>Leyenda</b> (1) <i>Sust. Rha 4-OH</i> : fracción molar de los residuos Rha en el núcleo de RGI con una cadena lateral en la posición C-4 ; medida a partir del cambio de señal de CH <sub>3</sub> de Rha; (2) <i>β1-4Gal</i> : relación molar de Gal con enlaces beta(1,4) en comparación con Rha (mol/mol); se refiere a la longitud de las cadenas laterales que contienen residuos de galactano con enlaces beta(1,4); (3) <i>Ara</i> : relación molar de arabinano con enlaces alfa(1,5) en comparación con Rha (mol/mol); se refiere a la longitud de cadenas laterales que contienen residuos de arabinosilo con enlaces alfa(1,5); (4) <i>α1-4GalA</i> : residuos de ácido alfa-1,4-galacturónico frente a residuos de ramnosilo (mol/mol); es decir, este número indica la relación molar entre los residuos de GalA en el ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) o los núcleos de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4) en el polisacárido y los residuos de Rha en el núcleo de RGI del polisacárido; (5) Por debajo del nivel medible; es decir, la cantidad de residuos de GalA con enlaces alfa(1,4) presente en el polisacárido procedente de núcleos de ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) o de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4) es tan baja que no es detectable. Si este es el caso, entonces la relación GalA: Rha es 1.				

**Ejemplo 2: Efecto inmunomodulador de polisacáridos de diversas fuentes**

5 [0115] El efecto inmunomodulador de varias muestras se ha determinado a diversas concentraciones, utilizando los dos ensayos descritos anteriormente. Los resultados se dan en la siguiente tabla.

[0116] Los polisacáridos se obtuvieron de las siguientes materias primas:

- 10
- hojas de la especie *Camellia sinensis* (té); el efecto inmunomodulador de una mezcla combinada de muestras de té nº 7, té nº 15, té nº 218, té nº 244 (véase la tabla 1) se indica en la siguiente tabla;
  - raíces de la especie *Daucus carota* subesp. *sativus* (zanahoria);
  - fruto de la especie *Malus domestica* (manzana);
  - raíz de la especie *Beta vulgaris* L. (remolacha azucarera);
  - 15 - grano de la especie *Glycine max* (soja).

**Tabla 2.** Actividad inmunomoduladora *in vitro* de varias muestras, analizadas utilizando un ensayo de células de sangre total y/o un ensayo de células HL60. Concentración de extracto (microgramos por mililitro) obtenido de acuerdo con el método anterior, frente a la actividad de fagocitosis del ensayo.

Material y fracción de P <sub>M</sub>	Ensayo de células de sangre total		Ensayo de células HL60	
	3 microgramos/ml	30 microgramos/ml	0,3 microgramos/ml	3 microgramos/ml
Té				
> 110 kDa	+	++	+	++
70-110 kDa	-	++	-	+
Manzana				
> 110 kDa	++	++	++	++
70-110 kDa	-	++	-	+
40-70 kDa (comparativo como P <sub>M</sub> <70 kDa)				
Remolacha azucarera				
> 110 kDa	+	++		
Zanahoria				
> 110 kDa	++	++	-	++
<b>Leyenda:</b> ++ efecto muy positivo ( % fagocitosis > 80 % ) + efecto positivo ( % fagocitosis 40 % -80 % ) - sin efecto en blanco: sin analizar				

20 [0117] Las Figuras 2 y 3 indican el porcentaje de fagocitosis medido para algunas de las muestras de polisacáridos:

Figura 2: Manzana (como en la tabla 1 y 2), ensayo de células de sangre total.

Figura 3: Soja; Ensayo de células HL60; esta muestra no figura en la tabla 2, polisacáridos de soja: Ramnogalacturonano (soja) de Megazyme International Ireland Ltd. (Wicklow, Irlanda).

5 [0118] Dos de las muestras obtenidas de la planta del té (*Camellia sinensis*) también se analizaron en las dos pruebas, esta vez a concentraciones más bajas. Estas muestras fueron té nº 7 y té nº 15. También se analizaron las muestras de zanahoria y manzana. Las características estructurales de estos materiales ya se han dado en la tabla 1. Los resultados de estas pruebas son los siguientes:

10 **Tabla 3.** Actividad inmunomoduladora *in vitro* de dos muestras obtenidas de la planta *Camellia sinensis*, y de zanahoria y manzana, analizadas usando un ensayo de células de sangre total y/o un ensayo de células HL60. Concentración de extracto (microgramos por mililitro) obtenido de acuerdo con el método anterior, frente a la actividad de fagocitosis del ensayo.

Material y fracción de P <sub>M</sub>	Ensayo de células de sangre total		Ensayo de células HL60	
	0,03 microgramos/ml	0,3 microgramos/ml	0,003 microgramos/ml	0,03 microgramos/ml
Té #7				
> 110 kDa	++	++		
70-110 kDa	++	++		
40-70 kDa	-	++		
Té #15				
> 110 kDa	++	++	++	++
70-110 kDa	++	++	-	-
40-70 kDa	-	++	-	-
Zanahoria				
> 110 kDa	-	-		
70-110 kDa	-	-		
40-70 kDa	-	-		
Manzana				
> 110 kDa	-	-		
70-110 kDa	-	-		
40-70 kDa	-	-		
<i>Leyenda:</i>				
++ efecto muy positivo ( % fagocitosis > 80 %)				
+ efecto positivo ( % fagocitosis 40 % -80 %)				
- sin efecto				
en blanco: sin analizar				

15 [0119] Este ejemplo demuestra que los extractos obtenidos de la planta *Camellia sinensis* tuvieron una actividad inmunoestimulante muy alta *in vitro*. Ya a concentraciones tan bajas como 0,003 microgramos por mililitro se midió una actividad inmunoestimulante muy alta en el ensayo de células de sangre total, en comparación con varios otros polisacáridos obtenidos de otros materiales vegetales. Los polisacáridos obtenidos de la manzana o de la zanahoria no mostraron efecto inmunoestimulante en el ensayo de células de sangre total a concentraciones de  
20 0,03 y 0,3 microgramos por mililitro.

**Ejemplo 3: Propiedades del polisacárido**

25 [0120] Durante el aislamiento de polisacáridos de zanahoria, se observó que estos polisacáridos no daban lugar a un espesamiento de los fluidos en los que estaban disueltos. Esto contrasta con las pectinas normales, en las que concentraciones similares de polímero hacen que los fluidos se espesen.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la preparación de un producto comestible o una composición farmacéutica, donde dicho método comprende incorporar un 0,5-10 % en peso de un polisacárido que tiene un esqueleto que comprende núcleos alternos de ramnogalacturonano I y ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) o núcleos de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4) o que tiene un esqueleto constituido por un núcleo de ramnogalacturonano I;
- 10 donde el polisacárido tiene un peso molecular de al menos 70 kD; y donde el polisacárido se obtiene de plantas de la especie *Camellia sinensis* y donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 2,5:1 a 1:1; donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido se determina usando el método de RMN descrito en los Ejemplos.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 2:1 a 1:1, preferiblemente de 1,5:1 a 1:1.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el polisacárido tiene un peso molecular de entre 70 y 2000 kDa, preferiblemente de entre 110 y 2000 kDa.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el método comprende incorporar al menos un 1 % en peso del polisacárido.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho núcleo de ramnogalacturonano I comprende una o más cadenas laterales, en el que una o más cadenas laterales comprenden un esqueleto de al menos uno o más residuos de arabinosilo con enlaces alfa(1,5); en el que una o más cadenas laterales tienen sustituyentes en la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo; y en el que la relación molar de residuos de arabinosilo a residuos de ramnosilo está entre 50:1 y 1:2.
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho núcleo de ramnogalacturonano I comprende una o más cadenas laterales, en el que una o más cadenas laterales comprenden un esqueleto de al menos uno o más residuos de galactosilo con enlaces beta(1,4); en el que dichas una o más cadenas laterales tienen sustituyentes en la posición 4-OH de los residuos de ramnosilo; y en el que la relación molar de residuos de galactosilo a residuos de ramnosilo está entre 80:1 y 1:1.
- 40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el polisacárido se obtiene mediante un proceso que comprende los siguientes pasos:
- poner en contacto material vegetal con un alcohol a una temperatura de 60-80 ° C durante un período de entre 15 minutos y 5 horas;
  - separar el residuo sólido del líquido;
  - extraer el residuo sólido con al menos una cantidad triple de agua (p/p) a una temperatura de 60-100 ° C durante al menos 1 hora para obtener el polisacárido extraído.
- 45 8. Método según la reivindicación 7, en el que el polisacárido extraído se somete a un procesamiento adicional, donde dicho procesamiento adicional comprende al menos uno de los siguientes pasos:
- diálisis del polisacárido extraído para eliminar moléculas que tienen un peso molecular inferior a 10 kDa;
  - separación del polisacárido extraído en una fracción ácida y compuestos no ácidos mediante intercambio iónico.
- 50 9. Producto comestible o composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del resfriado o la gripe, donde dicho producto comestible o composición farmacéutica se obtiene mediante un método que comprende incorporar 0,5-10 % en peso de un polisacárido que tiene un esqueleto que comprende núcleos alternos de ramnogalacturonano I y núcleos de ácido poligalacturónico con enlaces alfa(1,4) o de ácido oligogalacturónico con enlaces alfa(1,4) o que tiene un esqueleto que consiste en un núcleo de ramnogalacturonano I; donde el polisacárido tiene un peso molecular de al menos 70 kD; y donde el polisacárido:
- se obtiene de plantas de la especie *Camellia sinensis* y donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 2,5:1 a 1:1; o
  - se obtiene de plantas de la especie *Daucus carota* y donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 2,5:1 a 1:1; o
- 55 60

- se obtiene de la especie *Glycine max* y donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,5:1 a 1:1; o
- se obtiene de la especie *Malus domestica* y donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,5:1 a 1:1; o
- 5     • se obtiene de la especie *Beta vulgaris L.* y donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,5:1 a 1:1;

donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido se determina usando el método de RMN descrito en los Ejemplos.

10

10. Producto comestible o composición farmacéutica según la reivindicación 9, en el que el polisacárido se administra en una dosis diaria de entre 10 y 1000 miligramos al día.

15

11. Producto comestible o composición farmacéutica según la reivindicación 9 o 10, en el que la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 2:1 a 1:1, preferiblemente de 1,5:1 a 1:1.

20

12. Producto comestible o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el polisacárido tiene un peso molecular de entre 70 y 2000 kDa, preferiblemente de entre 110 y 2000 kDa.

13. Producto comestible o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el producto comestible o composición farmacéutica se obtiene mediante un método que comprende incorporar al menos un 1 % en peso del polisacárido.

25

14. Producto comestible o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde el polisacárido se obtiene de la raíz de la especie *Daucus carota* subesp. *sativus* (zanahoria), donde la relación molar de residuos de ácido galacturónico a residuos de ramnosilo en el esqueleto del polisacárido varía de 1,5:1 a 1:1.

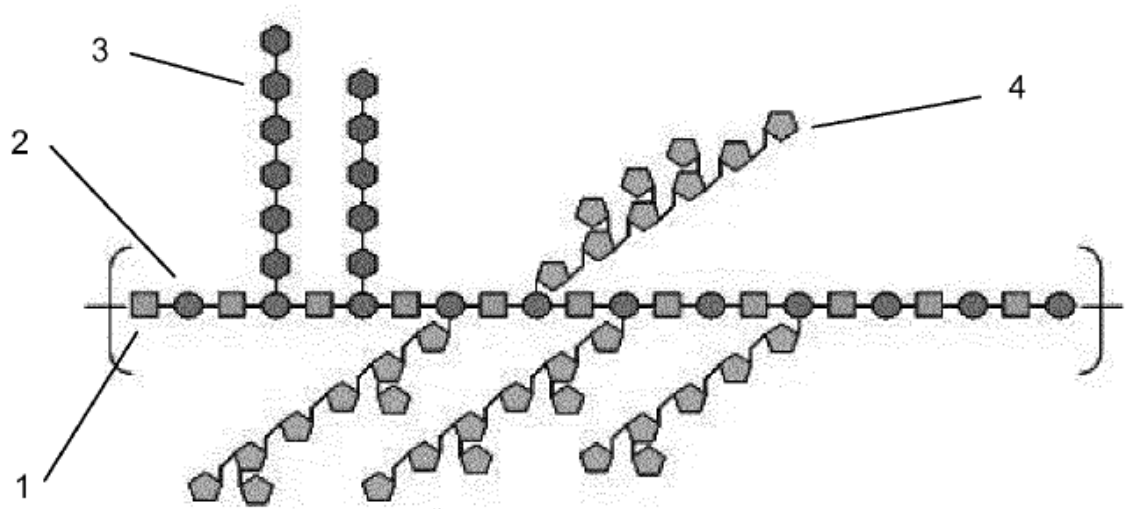


Figura 1

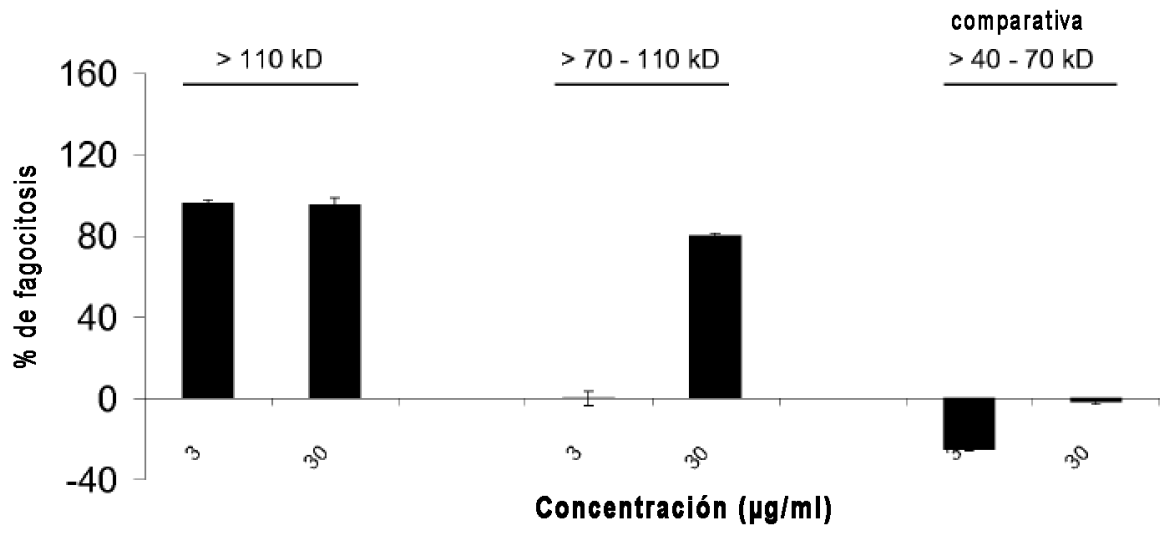


Figura 2

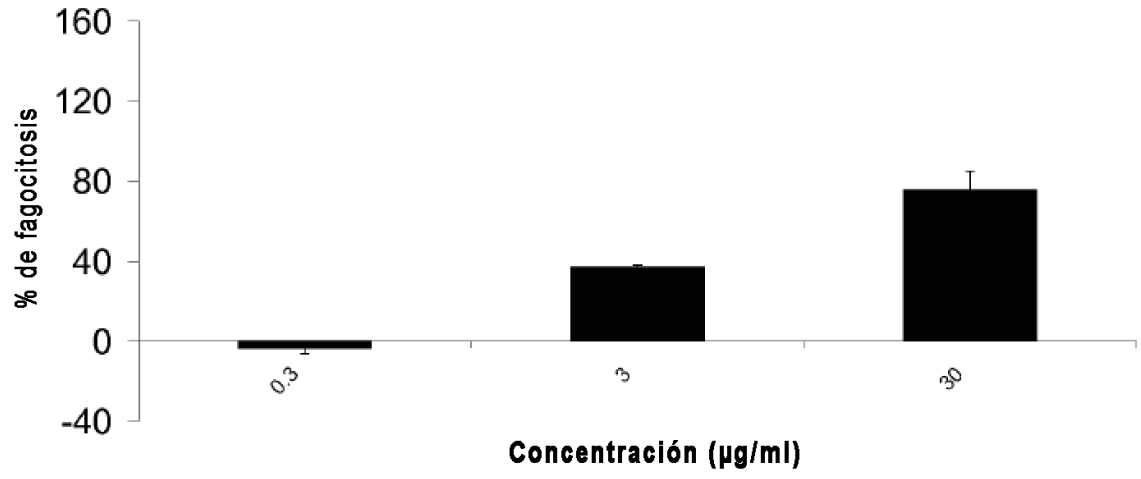


Figura 3