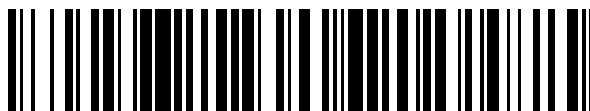


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 592**

51 Int. Cl.:
A61K 31/702 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07834613 .7**
96 Fecha de presentación: **01.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2076271**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.07.2009**

54 Título: **INHIBICIÓN DE TOXINAS DEL CÓLERA POR GALACTOOLIGOSACÁRIDOS (GOS).**

30 Prioridad:
02.10.2006 EP 06076810

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.02.2012

73 Titular/es:
Friesland Brands B.V.
Stationsplein 4
3818 LE Amersfoort, NL

72 Inventor/es:
SINCLAIR, Haydn Robert;
DE SLEGTE, Jaap y
KLARENBECK, Gijsbertus

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

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).

ES 2 373 592 T3

DESCRIPCIÓN

Inhibición de toxinas del cólera por galactooligosacáridos (GOS)

5 La invención se refiere a composiciones nutricionales y farmacéuticas que comprenden galactooligosacáridos (GOS) no digeribles y a las utilidades de las mismas. En particular, se refiere a la utilización de especies de GOS en la prevención, reducción o, en cualquier caso, tratamiento de una enfermedad causada por toxinas bacterianas.

10 La infección intestinal con la toxina de *Vibrio cholerae* ha aquejado al mundo desarrollado durante casi 200 años. La *Vibrio cholerae* se transmite a través de la vía fecal-oral, la forma más habitual mediante el consumo de agua contaminada y en menor grado los alimentos (W.H.O. Cholera (Cólera), 2004. Wkly Epidemiol Rec 2005; 80(31): 261-8). En individuos inmunocomprometidos y mal nutridos, las *Vibrios* sobreviven a través de la barrera gástrica y finalmente colonizan el intestino delgado (Tamplin y otros, Appl Environ Microbiol 1990; 56(6): 1977-80). Los brotes recientes de cólera como consecuencia del tsunami asiático y el huracán Katrina en los Estados Unidos, ilustran adicionalmente la importancia del tratamiento de la enfermedad.

15 Sin embargo, no existen medidas profilácticas contra la toxina del cólera y sin tratamiento las tasas de mortalidad pueden alcanzar el 30-50%. Se ha conseguido un éxito limitado utilizando dos tipos de Vacunas Orales para Cólera (OCV), aunque no son efectivas contra la cepa *Vibrio cholerae* 0139. Además, el descubrimiento de que las cepas de *Vibrio cholerae* productoras de toxinas poseen resistencia a múltiples fármacos tiene implicaciones significativas en la utilización de anticuerpos como tratamiento y estrategia de control. Claramente, existe cierta urgencia por desarrollar tecnologías alternativas para combatir el cólera y enfermedades relacionadas.

20 Existen muchas toxinas bacterianas que se unen a gangliósido, un glicoesfingolípido ácido, como receptor en la superficie celular de células diana e invaden células diana mediante la posterior internalización del complejo toxina-receptor. La más conocida de éstas es la toxina del cólera (Ctx), una enterotoxina producida por *Vibrio cholerae*, y se identificó su receptor específico de la superficie celular como monosialogangliósido gal(beta1-3)galNAc(beta1-4)[(alfa2-3)]gal(beta1-4)glc(beta1)-ceramida (GM1) del ácido siálico.

25 La toxina del cólera es un ensamblaje hexamérico AB₅ que consiste en una estructura anular de cinco subunidades B idénticas (Ctx-B) y una subunidad A (Ctx-A). Como con muchas otras toxinas bacterianas, la actividad catalítica reside en Ctx-A, mientras que la unión al receptor y la liberación de la toxina a la célula diana están mediadas por el pentámero Ctx-B. La unión de las subunidades B a la membrana GM1 se cree que induce un cambio conformacional en la toxina, dando lugar a la entrada del ensamblaje hexamérico que comprende la subunidad A tóxica en la célula diana.

30 La subunidad A muestra actividad de ADP ribosiltransferasa hacia G α s, que es un miembro del grupo de proteínas que hidrolizan GTP, responsable de la regulación de muchos aspectos de la función celular (Shah BH. Exp Mol Med 1999; 31(2):89-94). G α s regula la actividad de adenilato ciclasa y determina la concentración de cGMP en la célula huésped. A continuación, la subunidad A ribosila con ADP la subunidad alfa de Gs, eliminando la actividad innata de GTPasa. Consecuentemente, el estímulo no se puede suprimir y, de este modo, la adenilato ciclasa continúa produciendo cAMP, manteniendo la cascada activa.

35 Normalmente, en ausencia de Ctx, un mecanismo de activación-desactivación asegura que la G α s se active según se requiera por la célula en respuesta a la estimulación de la adenilato ciclasa intestinal. Por lo tanto, normalmente, este sistema mantiene la concentración de cGMP lo suficientemente elevada para realizar su función (Faruque y otros, Mol Biol Rev 1998; 62(4):1301-14). La ribosilación incontrolada con ADP de G α s da lugar a un incremento continuo en la actividad de adenilato ciclasa que finalmente provoca que se acumulen niveles elevados de cGMP. En los intestinos, los niveles de cGMP afectan a los transportadores de sodio y cloruro, provocando un desequilibrio iónico y la alteración del potencial osmótico de membrana. El flujo masivo resultante de iones cloruro y bicarbonato en el lumen del intestino delgado arrastra grandes cantidades de agua con el mismo mediante ósmosis pasiva.

40 La clase de toxinas AB₅ se pueden subdividir en familias en base a la homología de secuencias y tropismo de los receptores. Tanto la toxina del cólera como las enterotoxinas LT y LT-II de *E. coli* lábiles al calor están estructuralmente relacionadas. La subunidad B de ambas toxinas presenta una afinidad elevada para la parte de oligosacáridos de un conjunto de glicolípidos, incluyendo GM1. La adherencia de la toxina del cólera o la enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli* a GM1 presente en la superficie de células epiteliales que recubren el intestino es la primera etapa de una serie que da lugar a la inducción de diarrea acuosa. Aunque la cólera es más grave, ambas pueden conducir a la muerte como resultado de una deshidratación severa.

45 Un objetivo de la presente invención es dar a conocer composiciones que son efectivas en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades asociadas con toxinas bacterianas patógenas *Vibrio cholerae* y *E. coli* Enterotoxigénica. En particular, los presentes inventores exponen la identificación de compuestos que son útiles como inhibidores de la adhesión de la toxina del cólera a su receptor GM1 con la subyacente idea de que reconociendo la toxina bacteriana se puede solventar la resistencia a los fármacos de la cepa bacteriana.

Sorprendentemente, se descubrió que ciertas fracciones de un preparado de oligosacáridos de grado alimenticio no digerible son inhibidores muy eficientes de la unión de Ctx-B a su preceptor natural. De manera más específica, se encontró que las fracciones enriquecidas en galactooligosacáridos (GOS) con un grado de polimerización de cinco o superior, que comprenden GOS pentasacáridos (también referidos en la presente invención como DP5) y GOS hexasacáridos (DP6), eran adhesivos anti-Ctx-B efectivos al evitar la unión de Ctx a GM1 en una célula diana.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición que comprende galactooligosacáridos (GOS), en la que las especies de GOS que tienen un grado de polimerización de 5 o superior, preferentemente de 6 o superior, están presentes en una cantidad, como mínimo, del 35% en peso (%p), en base al peso total en seco de todas las especies de GOS presentes en la composición y en la que el contenido de GOS pentasacáridos y/o hexasacáridos es del 2-100% en peso en base al peso total de la composición. También se da a conocer la utilización de dicha composición de GOS para la fabricación de una composición nutricional o farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una enfermedad aguda o crónica asociada con la adhesión y/o captación de un miembro de la familia de toxinas del cólera o causada por las mismas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de fraccionamiento para el aislamiento de una fracción de GOS que tiene actividad inhibidora de Ctx a partir de una mezcla de GOS. También se da a conocer una fracción de GOS obtenible mediante dicho método y la utilización de dicha fracción como adhesivo anti-Ctx-B.

También se da a conocer una composición, por ejemplo una composición farmacéutica o nutricional o un concentrado de la misma, que comprende una cantidad elevada de especies GOS DP5 y/o DP6.

Los GOS pertenecen al grupo de carbohidratos no digeribles que se pueden considerar como fibras alimenticias solubles porque se adaptan a la definición generalmente aceptada de fibra alimenticia, que incluye el criterio tanto bioquímico como nutricional/fisiológico (Food Industry ad hoc Working Group on Dietary Fibre (Grupo de Trabajo sobre la Fibra Alimenticia apropiado para la Industria Alimenticia (1994) Int. Food Ingrid., 1, 46-49). Los GOS han generado un interés creciente porque pueden inducir la proliferación de bifidobacteria y ácido láctico bacteriano en el intestino humano y, de este modo, mejoran la salud humana. Los GOS no se caracterizan únicamente como prebióticos que mejoran la salud intestinal, sino que también demostraron que reducían el riesgo de cáncer de colon. La posible actividad antitumoral de GOS podría justificarse por la posible acción antitumoral de butirato, una de las sustancias producidas a partir de GOS en el colon.

Los GOS se pueden producir enzimáticamente utilizando la fracción de D-lactosa purificada del suero como sustrato (Wallenfels y otros, Adv Carbohydr Chem, (1961). 16: pág. 239-98). La enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* presenta una actividad catalítica de transgalactosilo en la lactosa dando lugar a la formación de disacáridos a octasacáridos compuestos de 1-7 unidades de galactosa unidas a una molécula de glucosa en el extremo reductor, es decir (galactosa)_nglucosa, en la que n es 1-7 (Matsumoto y otros, Galactooligosaccharides (Galactooligosacáridos), en Oligosaccharides: production, properties and applications., T. Nakakuki, Editor. 1995, Gordon and Breach Science Publishers.: Shizuoka, Japón. pág. 90-106). Sin embargo, la síntesis enzimática produce mezclas de GOS que frecuentemente son impuras. Por ejemplo, el jarabe comercial Vivinal GOS® contiene únicamente el 59% de GOS p/p⁻¹, representando la lactosa, glucosa y galactosa el 41% restante. Entre las especies de GOS presentes en VivinalGOS, los disacáridos (DP2) y trisacáridos (DP3) son los más abundantes, representando aproximadamente el 33% en peso y el 39% en peso, respectivamente, en base al peso total en seco de todas las especies de GOS. DP4 y DP5 representan aproximadamente el 18% en peso y el 7% en peso. Las especies de GOS que tienen un grado de polimerización de seis y superior representan únicamente aproximadamente el 3% en peso de las especies de GOS en VivinalGOS. Otras mezclas de GOS disponibles comercialmente están enriquecidas de forma similar en especies de GOS de peso molecular inferior, en particular en disacáridos y trisacáridos de GOS. Tal como se describe a continuación en la presente invención, los presentes inventores desarrollaron un método para el fraccionamiento de la mezcla compleja de especies de GOS derivadas del suero. Después de la extracción de la glucosa y la galactosa, la mezcla se separó mediante cromatografía de intercambio iónico. Esto dio lugar a 15 fracciones con un perfil diferente de especies de GOS, es decir, que difieren en la abundancia relativa de GOS trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos y hexasacáridos, referidos en la presente invención como DP3, DP4, DP5 y DP6, respectivamente. Al aumentar el número de la fracción, se observó que la abundancia de DP5 y DP6 disminuía de una manera secuencial con un incremento simultáneo en DP3 y DP4, indicando un desplazamiento de las fracciones que contenían predominantemente DP6-DP5 a fracciones que contenían DP4-DP3.

Se realizaron análisis ELISA competitivos en los que se evaluaron las fracciones de GOS por su capacidad de inhibir la unión de la subunidad de Ctx B a GM1. Esto reveló que las fracciones de GOS enriquecidas relativamente en GOS pentasacáridos (DP5) y hexasacáridos (DP6) y que tienen una abundancia relativa baja de DP3 y DP4 son inhibidores de la adhesión de Ctx particularmente potentes. El término "enriquecido relativamente" pretende indicar que la abundancia aumenta en comparación con el material de partida no fraccionado.

Las fracciones de GOS activas incluían aquellas que comprenden el 15% en peso o más de DP6 en base al peso total en seco de especies de GOS presentes en la fracción, correspondiente a, como mínimo, 15 mg/ml en el análisis ELISA. Además, DP6 estaba presente en las fracciones activas en una cantidad, como mínimo, del 40% en peso en

base a todas las especies de GOS presentes, correspondiente, como mínimo, al 40 mg/ml en el análisis. Sin desear que se relacione por la teoría, las correlaciones estadísticas entre la constante de inhibición de cada fracción y la composición de cada fracción determinada utilizando los datos de espectrometría de masas sugieren que el DP6 es el componente inhibidor más probable del VivinalGOS fraccionado. Sin embargo, otras especies de GOS presentes en las fracciones activas pueden representar también parte o toda la actividad observada.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer en un aspecto la utilización de una composición, según la reivindicación 1 o la reivindicación 6, para la fabricación de una composición nutricional o farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una enfermedad aguda o crónica asociada con la adhesión y/o captación de un miembro de la familia de toxinas del cólera o causada por las mismas. La composición nutricional o farmacéutica es adecuada para la prevención o el tratamiento de una enfermedad aguda o crónica causada por un miembro de la familia de toxinas del cólera, en particular enfermedades diarreicas. En una realización, la enfermedad está causada por la toxina del cólera *V. cholera* (Ctx-B) o la enterotoxina lábil al calor (LT-B) de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC).

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición anti-adhesiva que comprende galactooligosacáridos (GOS), en la que las especies de GOS que tienen un grado de polimerización de 5 o superior, preferentemente 6 o superior, están presentes en una cantidad, como mínimo, del 35% en peso, más preferentemente, como mínimo, el 40% en peso, en base al peso total en seco de todas las especies de GOS presentes en la composición y en la que el contenidos de GOS pentasacáridos y/o hexasacáridos es del 2-100% en peso en base al peso total de la composición. En una realización, la composición comprende GOS que tienen un grado de polimerización de 6 en una cantidad, como mínimo, del 10% en peso, preferentemente, como mínimo, 15% en peso, más preferentemente, como mínimo, el 20% en peso, en base al peso total en seco de todas las especies de GOS presentes en la composición. Alternativamente o adicionalmente, una composición comprende GOS que tienen un grado de polimerización de 5 en una cantidad, como mínimo, del 15% en peso, preferentemente, como mínimo, del 20% en peso, más preferentemente, como mínimo, del 30% en peso, en base al peso total en seco de todas las especies de GOS presentes en la composición. Un aspecto específico se refiere a una composición que comprende desde, aproximadamente, el 10% en peso hasta, aproximadamente, el 20% en peso de GOS DP6, desde, aproximadamente, el 40% en peso hasta, aproximadamente, el 50% en peso de DP5, siendo el resto GOS DP4.

Una composición, según la presente invención, puede comprender otros componentes además de las especies de GOS, por ejemplo, un diluyente, portador y/o compuestos de valor nutricional y/o farmacéutico. Una composición también puede ser una composición concentrada de GOS, por ejemplo, en la que todas las especies de GOS presentes en la composición forman, como mínimo, el 50% en peso, preferentemente, como mínimo, el 60% en peso, más preferentemente, como mínimo, el 70% en peso, tal como el 80% en peso, el 85% en peso, el 90% en peso, el 95% en peso o incluso el 99% en peso, en base al peso en seco de la composición. Además, los porcentajes relativos anteriores de DP5 y DP6 en una composición pueden aumentar hasta valores elevados. También se prevén composiciones que comprenden esencialmente únicamente GOS DP5 y/o DP6. De este modo, se dan a conocer composiciones en las que las especies de GOS presentes comprenden únicamente GOS DP5, sólo GOS DP6 o una mezcla de GOS DP5 y DP6.

Los datos anteriores muestran que el propio fraccionamiento ha aumentado la eficacia inhibidora de la unión de Ctx mediante la concentración de especies de GOS particulares, es decir GOS pentasacáridos y hexasacáridos, que de todos modos se encuentran diluidos en la formulación de GOS comercial. De este modo, el proceso proporciona un medio rápido y efectivo de extraer los carbohidratos de peso molecular bajo que no presentan propiedades prebióticas, nutracéuticas y/o biológicas. La concentración de carbohidratos activos, en particular GOS DP5 y/o DP6, permite preparar una composición que tiene una actividad (antiadhesivo de Ctx) por unidad de peso (en seco) más elevada. Dicha composición se utiliza de forma ventajosa en la fabricación de formulaciones farmacéuticas o nutracéuticas para el tratamiento o la prevención de una enfermedad aguda o crónica asociada con la adhesión y/o captación de un miembro de la familia de toxinas del cólera o causada por las mismas.

Los estudios de dosis-respuesta para determinar la EC50 de las fracciones de GOS enriquecidas en DP6 revelaron valores de EC50 para DP6 que variaban entre 30 y 42 mg/ml. EC50 se refiere a la concentración de inhibidor que compite por la mitad de la unión específica y es el mismo valor que IC50. La correlación de los valores EC50 con el contenido relativo de DP6 sugiere un valor de EC50 de aproximadamente 5 mg/ml para DP6.

Por consiguiente, en una realización, la composición anti-adhesiva comprende, como mínimo, el 0,5% (p/p), preferentemente, como mínimo, el 0,7%, más preferentemente, como mínimo, el 1,0% de GOS hexasacáridos. Por ejemplo, dicha composición es una composición líquida que comprende, como mínimo, 5 mg/ml de GOS hexasacáridos, preferentemente, como mínimo, 7 mg/ml, más preferentemente, como mínimo, 10 mg/ml.

La utilización de varios tipos de oligosacáridos como inhibidores de la adhesión de patógenos a las células de mamífero se ha descrito previamente. Por ejemplo, Leach y otros (Antimicrob Agents Chemother. 2005 Septiembre; 49 (9): 3842-3846) dieron a conocer la capacidad de un globotriosa monovalente soluble de interferir con la unión y la colonización de *Escherichia coli* uropatogénica.

El documento WO 2005/02766 da a conocer la utilización de varios oligosacáridos como inhibidores de la adhesión de patógenos a células de mamíferos. Los compuestos analizados incluían GOS obtenidos comercialmente (Vivinal GOS; vGOS) y oligosacáridos pépticos que habían sido purificados mediante ultrafiltración para eliminar los nitratos. No se realizó ningún fraccionamiento de los GOS. Los vGOS indicaron positivo en la inhibición de la adhesión de una cepa de *E. coli* VTEC (0157:H7). Ni *V. cholera*, ni sus toxinas se mencionan en el documento WO 2005/02766.

El documento US 6.224.891 da a conocer la utilización de un derivado multivalente de oligosacáridos α -galactosa que comprenden la subunidad α Gal(1 $\rightarrow$ 4) β Gal como inhibidores de la unión de toxinas de tipo shiga (SLT) a células que expresan GB3 (glicolípido neutro, globotriaosilceramida Gb3 (α -D-Gal(1-4) β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 4) β -D-Glc(1 $\rightarrow$ O-ceramida, también conocida como CD77) en su superficie celular. Las SLT son producidas por *E. coli* patológico. STARFISH es el nombre dado a un inhibidor oligovalente sintético específico desarrollado para bloquear la unión de SLT. Es una molécula sintética construida con una simetría pseudo pentámera. El núcleo es una molécula de glucosa funcionalizada en la que se insertan espaciadores y en los extremos de los espaciadores se colocan 2 trisacáridos idénticos que corresponden a los oligosacáridos reconocidos por la toxina de tipo Shiga. Las estructuras de oligosacáridos del documento US 6.224.891 no están relacionadas con los GOS hexasacáridos y son inefectivas como adhesivos anti-Ctx. Esto no es sorprendente considerando la diferencia estructural entre el receptor de SLT (gangliósido Gb3) y el receptor de Ctx (gangliósido GM1).

Las composiciones que comprenden una mezcla de especies de GOS, incluyendo estructuras de GOS pentasacáridos y hexasacáridos, son conocidas en la técnica.

El documento WO2005/00332 da a conocer una mezcla del 20-85% p/v de disacáridos, 20-35% p/v de trisacáridos, 15-25% p/v de tetrasacáridos y 10-20% p/v de pentasacáridos, y la utilización de la misma para la preparación de un medicamento para prevenir la adhesión de patógenos o toxinas a la pared intestinal.

El documento WO2004/052121 se refiere a composiciones nutricionales que comprenden oligosacáridos GOS y FOS para controlar la enfermedad inflamatoria intestinal y trastornos relacionados. Las composiciones de ejemplo comprenden GOS que tienen de 2 a 6 unidades de sacáridos. Se indica preferencia por las composiciones que comprenden el 0-30% en peso de pentasacáridos, más preferentemente el 2-10%, incluso más preferentemente el 7% en peso. Una preferencia similar se expresa en los documentos WO2004/089115 y WO2005/085781.

Tzortzis y otros (2005, The Journal of Nutrition, Vol. 135, páginas 1726-1731) evaluaron el potencial prebiótico de una mezcla de GOS que comprende el 9,9% de disacáridos, el 23,1% de trisacáridos, el 11,55% de tetrasacáridos y el 10,45% de pentasacáridos, en base al peso total en seco de la composición en polvo. La mezcla inhibió fuertemente la adhesión de algunas bacterias en un sistema modelo de intestinos *in vitro*. Este efecto se atribuyó a la fracción de disacárido.

Claramente, una composición, según la presente invención, en la que las especies de GOS que tienen un grado de polimerización de 5 o superior, preferentemente 6 o superior, están presentes en una cantidad, como mínimo, del 35% en peso no se da a conocer ni se sugiere en la técnica. El fuerte efecto inhibitor de DP5 y/o DP6 en la captación o unión de un miembro de la familia de toxinas del cólera, tal como se da a conocer en la presente invención, no puede derivar de la técnica anterior.

La única descripción de un oligosacárido que tiene un efecto sobre la acción de la toxina del cólera es la de Idota y otros (Biotech. Biochem, 59 (3), 417-419 (1995)), en la que la 3-sialilactosa presente en cantidades significativas en la leche humana, se identifica como un inhibidor de la acumulación de fluido inducida por la toxina del cólera en los intestinos de los conejos.

En conjunto, el presente hallazgo de que las especies de GOS de peso molecular elevado son capaces de inhibir la unión de la toxina del cólera no se describe ni se sugiere en la técnica anterior.

Tal como quedará claro a partir de lo anterior, una composición preferente tiene una abundancia relativamente elevada de GOS pentasacáridos y/o hexasacáridos. En una realización, la invención se refiere a una composición que está enriquecida en GOS hexasacáridos. La expresión "enriquecida en" pretende indicar que la composición se ha tratado o procesado mediante cualquier medio con el objetivo específico de incrementar la concentración de la especie GOS deseada. Esto puede ser a través de la concentración global de una composición y/o a través de la eliminación de estructuras diferentes de los GOS pentasacáridos y/o hexasacáridos deseados. Por ejemplo, en base a la cantidad total de estructuras de GOS individuales (por ejemplo, especies de GOS con un grado distinto de polimerización) presentes en la composición, la composición comprende, como mínimo, 7, preferentemente, como mínimo, 10, más preferentemente, como mínimo, 15% (p/p) de GOS que tiene un grado de polimerización de seis. En una realización, los GOS DP5-6 representan desde, aproximadamente, el 15 hasta, aproximadamente, el 100% en peso de las estructuras de GOS totales, por ejemplo el 20%-100%, 25%-90%, 35%-96%, 40%-60%, 50%-75%, 25-100%, 36-100%, 40-100%, 50-100%, 60-100%, 75-100%.

Una composición tiene, preferentemente, una abundancia relativamente baja de GOS trisacáridos. Por ejemplo, entre la cantidad total de estructuras de GOS individuales presentes en la composición, la composición comprende

menos del 10, preferentemente menos del 7, más preferentemente menos del 5% (p/p) de GOS con un grado de polimerización de tres. En una realización, una composición de GOS está esencialmente libre de GOS trisacáridos.

La abundancia relativa de GOS tetrasacáridos en una composición de GOS dada a conocer en la presente invención puede ser inferior al 50, preferentemente inferior al 45, más preferentemente inferior al 40% (p/p).

En un aspecto adicional, la composición está esencialmente libre de monosacáridos y/o disacáridos, en particular de galactosa y/o lactosa. La lactosa se puede hidrolizar para formar glucosa y galactosa utilizando la β -galactosidasa. Estos monosacáridos se pueden extraer utilizando una cromatografía de intercambio catiónico.

En una realización preferida, una composición de la presente invención comprende residuos galactosilos unidos en beta con un grado de polimerización de seis, en particular GOS hexasacáridos con enlaces β (1-4) y/o β (1-6). Los GOS hexasacáridos unidos en beta se pueden obtener, por ejemplo, a partir de una mezcla de GOS que se produce enzimáticamente a partir de la lactosa del suero como un sustrato utilizando β -galactosidasa bacteriana. Por ejemplo, la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* presenta una actividad catalítica de transgalactosilo en la lactosa que da lugar a la formación de una mezcla de GOS que comprende de disacáridos a octasacáridos compuestos de unidades de galactosilo unidos en beta 1-7. Dicha mezcla también se conoce en el sector como "transgalacto-oligosacáridos", abreviado como TGOS o TOS:

Los preparados de GOS comerciales se pueden utilizar de forma ventajosa para producir una composición de la presente invención. Una fuente particularmente adecuada de GOS DP5 y/o DP6 para realizar la presente invención es el ingrediente prebiótico disponible comercialmente que contiene galacto-oligosacáridos comercializado bajo el nombre comercial de Vivinal-GOS® de Friesland Foods Domo®, Holanda.

Las estructuras de GOS individuales se pueden separar y aislar de una mezcla de especies de GOS mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la nanofiltración, tal como se ha descrito en Goulas, A.K., y otros (Journal of membrane science, 2002. 209(1): pág. 321.). En una realización preferida, se fracciona una mezcla de GOS utilizando cromatografía de intercambio catiónico. Más preferentemente, el contraíón de la resina de intercambio catiónico es potasio (K^+). Tal como se ejemplifica en la presente invención, la resina de intercambio catiónico que se comercializa bajo el nombre comercial de UniBead UBK-530 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd, Tokyo, Japón) es particularmente adecuada para el fraccionamiento de una mezcla de GOS que no tiene actividad anti-adhesiva de Ctx en fracciones que tienen actividad anti-adhesiva de Ctx.

El grado de polimerización en cada una de las fracciones se puede determinar utilizando varias técnicas analíticas conocidas en la técnica, tales como la cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) o espectrometría de masas con ionización por desorción láser asistida por matriz – tiempo de vuelo (MALDI-TOF), o se pueden utilizar combinadas.

En un aspecto adicional, la presente invención da a conocer un método para proporcionar una fracción de GOS que tiene actividad anti-adhesiva de Ctx que comprende las etapas de:

- disponer una mezcla de galactooligosacáridos (GOS) con diferentes grados de polimerización;
- opcionalmente, extraer la lactosa libre mediante la conversión de la lactosa libre de la mezcla de GOS en monosacáridos (glucosa y galactosa);
- aplicar dicha mezcla de GOS (lactosa libre) a una resina de intercambio catiónico;
- elución por etapas de las especies de GOS que tienen un grado creciente de polimerización utilizando una fase móvil acuosa y recoger las fracciones de eluyente separadas comprendiendo cada una especie de GOS con un grado diferente de polimerización;
- analizar cada fracción de eluyente por el efecto inhibidor en la unión de Ctx a GM1; y
- seleccionar una o más fracciones capaces de inhibir la unión de Ctx a GM1.

La resina de intercambio catiónico es preferentemente Unibead UBK-530 o un equivalente funcional de la misma, más preferentemente en forma de potasio.

El documento EP1352967 da a conocer un método para preparar GOS mezclando galactosa con una galactosidasa, dando lugar a la formación de GOS, utilizando una resina de intercambio catiónico para separar la mezcla en tres fracciones diferentes. Sin embargo, a diferencia del método de la presente invención, no implica la elución/fraccionamiento por etapas de una mezcla de GOS en fracciones individuales que contienen especies de GOS que tienen un grado creciente de polimerización. En cambio, el método del documento EP1852967 está dirigido a separar y concentrar los GOS a partir de lactosa y todas las especies de lactosa se eluyen en la segunda fracción.

Según la presente invención, el efecto inhibidor sobre la unión de Ctx se determina fácilmente utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo Ensayo por Inmunoabsorción Unido a Enzimas Competitivo con GM1 (GM1-ELISA) utilizando la Ctx acoplada a peroxidasa de rábano picante (Ctx-HRP). Preferentemente, la fracción o fracciones seleccionadas son capaces de inhibir, como mínimo, el 50%, más preferentemente, como mínimo, el

70%, la forma más preferente, como mínimo, el 80%, tal como el 90-999%, de la unión de Ctx a GM1 observada en ausencia de dicha fracción o fracciones.

También se da a conocer una fracción de GOS anti-adhesiva obtenible mediante el método descrito anteriormente. De manera opcional, la fracción de GOS obtenida se puede concentrar y/o purificar adicionalmente, por ejemplo para incrementar la concentración de estructuras de GOS anti-adhesivas de Ctx, tales como GOS hexasacáridos. Por ejemplo, la levadura de panadería se puede utilizar para este propósito.

La etapa de proporcionar una mezcla de galactooligosacáridos (GOS) con un grado de polimerización diferente comprende, por ejemplo, someter el permeado del suero o la lactosa a una transgalactosidación enzimática utilizando β -galactosidasa.

Alternativamente, dicha mezcla de galactooligosacáridos (GOS) con diferentes grados de polimerización comprende una mezcla de GOS comercial, por ejemplo el jarabe de GOS comercializado bajo el nombre comercial de Vivinal GOS.

Una composición de la presente invención puede consistir en o comprender una fracción de GOS con propiedades anti-adhesivas de Ctx obtenible mediante el método descrito anteriormente.

Una composición de la presente invención puede comprender además otros componentes beneficiosos, incluyendo oligosacáridos no digeribles diferentes de GOS. Se ha observado que los oligosacáridos sialilados no digeribles (SOS) de grado alimenticio son capaces de inhibir la unión de la toxina del cólera a su receptor. En una realización, la presente invención da a conocer una composición que comprende GOS pentasacáridos y/o hexasacáridos, comprendiendo además SOS de grado alimenticio. Los SOS (oligosacáridos sialilados no digeribles) se pueden aislar de fuentes naturales, por ejemplo de la yema de huevo o productos lácteos. Se puede utilizar la mezcla de oligosacáridos con sialilo disponible comercialmente Sunsial E[®] de yema de huevo de gallina que contiene, aproximadamente, el 17% de SOS y, aproximadamente, el 68% de proteína.

En una realización, la composición comprende SOS derivados de leche, en particular leche bovina. Se identificaron cinco sialiloligosacáridos en leche bovina, de los cuales los más abundantes eran 6'-sialillactosamina y 3'-sialillactosa (S. Martin-Sosa y otros, (2003). J. Dairy Sci. 86: 52-59).

Cabe indicar que las estructuras de SOS son significativamente diferentes de las especies de GOS identificadas en la presente invención al ser activas como anti-adhesivas de Ctx.

También se da a conocer la utilización de GOS pentasacáridos y/o hexasacáridos, o de una fracción de GOS obtenible mediante el método descrito anteriormente en la presente invención, para la fabricación de una composición nutricional o farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad aguda o crónica causada por la toxina del cólera (Ctx) y/o una enterotoxina lábil al calor, en particular enfermedades diarreicas.

También se da a conocer la utilización de GOS pentasacáridos y/o hexasacáridos, o de una fracción de GOS obtenible mediante el método descrito anteriormente en la presente invención, para la inhibición *in vitro* de la unión del miembro de la familia de toxinas del cólera, en particular la subunidad B pentamérica de la misma, a su receptor GM1.

El medicamento, composición nutricional o farmacéutica de la presente invención pueden comprender opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Además, según la presente invención, se da a conocer un preparado farmacéutico combinado para la utilización simultánea, separada o secuencial para inhibir la adhesión del patógeno a células de mamífero, por ejemplo, para controlar, por ejemplo, tratar, prevenir o mejorar trastornos entéricos agudos o crónicos asociados a bacterias en un mamífero que son dependientes de la captación de toxinas bacterianas mediadas por GM1.

Las composiciones de la presente invención comprenden opcionalmente aditivos alimenticios convencionales, tales como cualquiera entre emulsionantes, estabilizantes, edulcorantes, aromatizantes, agentes colorantes, conservantes, agentes quelantes, agentes osmóticos, tampones o agentes para el ajuste del pH, acidulantes, espesantes, texturizantes, y así sucesivamente.

Las composiciones farmacéuticas y los suplementos alimenticios se pueden disponer en forma de gel suave, sobrecitos, polvos, jarabes, suspensiones líquidas, emulsiones y solución en formas de dosificación convenientes. En cápsulas blandas, los principios activos están disueltos o suspendidos preferentemente en líquidos adecuados, tales como ácidos grasos, aceite de parafina o polietilenglicoles líquidos. Opcionalmente, se pueden añadir estabilizantes.

La cantidad de GOS pentasacáridos y/o hexasacáridos o fracción de GOS activos incorporada en las composiciones de la presente invención puede depender de la forma de las composiciones de la presente invención, por ejemplo un polvo o una composición lista para el consumo. Las cantidades de GOS pentasacáridos y/o

hexasacáridos comprendidas en las composiciones, según la presente invención, están en el intervalo del 2-100% en peso, por ejemplo desde, aproximadamente, el 5 hasta, aproximadamente, el 95% en peso, por ejemplo, desde, aproximadamente, el 15 hasta, aproximadamente, el 90% en peso, en base al peso total de la composición.

La cantidad y régimen de dosificación de las composiciones de la presente invención a administrar se determinan según los diversos factores relevantes, incluyendo el objetivo y la forma de administración, la edad, el sexo, el peso corporal y la salud general y condición del paciente individual y la gravedad de los síntomas del paciente. Cuando la composición según la presente invención se suministra en forma de un alimento o una bebida, una cantidad útil adecuada de GOS hexasacáridos puede ser desde, aproximadamente, 1 mg hasta, aproximadamente, 20 g, preferentemente desde, aproximadamente, 10 mg hasta, aproximadamente, 10 g, más preferentemente desde, aproximadamente, 10 mg hasta, aproximadamente, 1 g. Si se dispone una forma farmacéutica, las dosis diarias adecuadas de los GOS anti-adhesivos de Ctx de la presente invención son de hasta, aproximadamente, 250 mg, preferentemente hasta, aproximadamente, 150 mg, más preferentemente hasta, aproximadamente, 100 mg, y de manera óptima, en el intervalo desde, aproximadamente, 1 mg hasta, aproximadamente, 100 mg.

Las formas farmacéuticas o de suplemento alimenticio se pueden fabricar mediante procedimientos convencionales de composición conocidos en el sector farmacéutico, es decir, mezclando las sustancias activas junto con portadores y/o excipientes sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo cargas, tales como, celulosa, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol y fosfatos de calcio y aglutinantes, tales como almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa y/o polivinilpirrolidona (PVP). Entre los aditivos opcionales se incluyen lubricantes y acondicionantes del flujo, por ejemplo, ácido silicio, dióxido de silicio, talco, ácido esteárico, estearatos de magnesio/calcio, diluentes de polietilenglicol (PEG), agentes desintegrantes, por ejemplo, almidón, carboximetil almidón, PVP reticulada, agar, ácido algínico y alginatos, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes de fusión. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o los recubrimientos de las grageas, por ejemplo, para fines de identificación o para indicar diferentes dosis de principio activo.

Opcionalmente, las composiciones según la presente invención pueden ser completas nutricionalmente, es decir, pueden incluir vitaminas, minerales, elementos traza, así como fuentes de nitrógeno, carbohidrato y ácidos grasos, de manera que se pueden utilizar como la única fuente de nutrición que suministra esencialmente todas las cantidades diarias necesarias de vitaminas, minerales, carbohidratos, ácidos grasos, proteínas y similares. Por consiguiente, las composiciones de la presente invención se pueden disponer en forma de una comida completa nutricionalmente equilibrada, por ejemplo, adecuada para la alimentación oral o por tubos.

Alternativamente, las composiciones de la presente invención se pueden disponer como parte de una comida, es decir, un suplemento alimenticio, por ejemplo, en forma de una bebida saludable. Puede ser deseable disponer la composición de la presente invención en forma de un producto de sustitución de un alimento bajo en calorías u otro producto nutricional. En este caso, el producto de sustitución de un alimento u otro producto nutricional es, preferentemente, bajo en grasas, es decir, menos de, aproximadamente, el 10% de grasas o sustancialmente libre de grasas, es decir, menos de, aproximadamente, el 2,5% de contribución grasa, tal como, aproximadamente, el 2% de grasa, en base al contenido total calórico de la composición. De forma adecuada, una única utilización de un sustituto del alimento bajo en calorías tendrá un valor calórico de menos de, aproximadamente, 1000 cal, y preferentemente entre, aproximadamente, 200 cal y, aproximadamente, 500 cal.

Entre las composiciones adecuadas de la presente invención, por ejemplo, un producto nutricional adecuado bajo en calorías, se pueden incluir refrescos, tales como zumos, smoothie o bebidas basadas en soja, o dispersadas en alimentos de cualquier tipo, tales como barras lácteas, sopas, cereales para el desayuno, muesli, golosinas, galletas, productos para untar, fórmulas infantiles, fórmulas pre-infantiles, alimentos después del destete, dulces, pasteles, galletas saladas, tales como galletas saladas de arroz, y productos lácteos, tales como batidos lácteos, yogur en bebida, leche fermentada.

Las composiciones de la presente invención comprenden opcionalmente aditivos alimenticios convencionales, tales como cualquiera entre emulsionantes, estabilizantes, edulcorantes, aromatizantes, agentes colorantes, conservantes, agentes quelantes, agentes osmóticos, tampones o agentes para el ajuste del pH, acidulantes, espesantes, texturizantes, y así sucesivamente.

En un aspecto adicional de la presente invención, se da a conocer la utilización de una fracción de GOS o una composición de la presente invención como aditivo alimenticio.

Entre los formatos adecuados para productos, según la presente invención, se incluye una solución, composición lista para el consumo, por ejemplo composiciones listas para beber, bebidas instantáneas, comestibles líquidos, como refrescos, zumos, bebidas deportivas, bebidas lácteas, batidos lácteos, yogures en bebida o sopas. En una realización adicional de la presente invención, las composiciones de la presente invención se pueden fabricar y comercializar en forma de un concentrado, un polvo, o gránulos, por ejemplo, gránulos efervescentes, los cuales se diluyen con agua u otro líquido, tal como leche o zumo de frutas, para producir una composición lista para el consumo, por ejemplo, composiciones listas para beber o bebidas instantáneas.

La composición de la presente invención puede estar en cualquier forma adecuada para la administración humana y, en particular, para la administración en cualquier parte del tracto gastrointestinal. La administración entérica de las composiciones de la invención y, preferentemente, la administración oral y la administración a través de un tubo o un catéter, están cubiertas por la presente invención.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar bajo la supervisión de un especialista médico o se pueden autoadministrar.

Una composición farmacéutica o nutricional o un alimento o bebida que incorpora GOS pentasacáridos/hexasacáridos según la invención, puede ser consumido de forma segura por cualquiera. Están especialmente recomendados para cualquiera que perciba que está en riesgo de contraer enfermedades, afecciones y síntomas relacionados con toxinas de la familia de las toxinas del cólera, por ejemplo, individuos inmunocomprometidos y/o malnutridos.

La presente invención también se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad asociada con la captación de un miembro de la familia de toxinas del cólera o causada por el mismo, por ejemplo Ctx o LT, en un mamífero, incluyendo humano, con necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de GOS pentasacáridos/hexasacáridos o una fracción de GOS activa según la invención. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "una cantidad efectiva" se refiere a una cantidad efectiva para conseguir un efecto terapéutico deseado, tal como el tratamiento y/o la prevención de síntomas agudos asociados con la acción de la toxina, en particular la acumulación de fluidos en los intestinos.

En otro aspecto, se da a conocer un método para inhibir la adhesión de la toxina del cólera a células de mamíferos, por ejemplo, a células del intestino o células epiteliales intestinales de un mamífero.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de las composiciones de la presente invención, en el que dicho proceso comprende la mezcla íntima de los componentes de la composición de la presente invención con excipientes farmacéutica o nutricionalmente aceptables. Dichos procesos son conocidos por el experto en la materia.

La utilidad de todas las composiciones de la presente invención se puede observar en las pruebas clínicas estándar en, por ejemplo, las indicaciones descritas anteriormente en la presente invención, por ejemplo, utilizando una o más fracciones de GOS anti-adhesivas de Ctx de la presente invención, en un intervalo de, aproximadamente, 1 g a 15 g, por ejemplo, aproximadamente 10 g, para un mamífero, y en modelos estándar de animales. El alivio de los síntomas que caracterizan los trastornos entéricos agudos o crónicos asociados a toxinas del cólera proporcionado por las composiciones se puede observar en pruebas estándar con animales utilizando, por ejemplo, el modelo experimental del cólera en el bucle intestinal de conejo (Leitch y otros, J Infect Dis. 1967 Jun;117(3):197-202).

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: Correlación entre el número de fracción de GOS purificada por intercambio catiónico y la abundancia relativa de GOS trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos y hexasacáridos (indicados como DP₃, DP₄, DP₅ y DP₆, respectivamente). Para los detalles experimentales, véase el ejemplo 1. Figura 2: Inhibición de Ctx-HRP n = 6 por la fracción 2 de GOS. P = 0,000 indica que la interacción entre la fracción 2 de GOS y Ctx-HRP en este ELISA unido a GM1 es muy significativa. El ANOVA se calculó a partir de los valores de Ctx-HRP unidos transformados a logaritmo. Para detalles experimentales, véase el ejemplo 2.

Figura 3: Dosis-respuesta de la fracción 2 de GOS. n = 6. r^2 global = 0,925 indica una respuesta muy ajustada a forma sigmoideal. Se observó que las diferencias entre el log EC50 y los valores de EC50 no eran significativamente diferentes (P = 0,9411), por tanto no se rechazó la hipótesis nula.

Figura 4: Actividad inhibidora de las fracciones de GOS 1 – 15 sobre la unión de Ctx-HRP a GM1. Véase la figura 1 para el contenido de las especies de GOS de cada fracción. Panel A: 100 mg/ml frente a la inhibición de 10 ng/ml de Ctx-HRP. n = 6. El valor r^2 grande indica que el 73,56% de la variación está causada por las diferencias en la composición de las especies entre las fracciones de GOS. Panel B: 100 mg/ml de fracciones de GOS 1-15 frente a la inhibición de 20 ng/ml de Ctx-HRP. n = 6. El valor r^2 grande indica que el 74,14% de la variación está causada por las diferencias en la composición de las especies entre las fracciones de GOS

Figura 5: Correlación entre la dosis de DP6 y la inhibición de Ctx-HRP n = 6. P = 0,2748 indica que no existe diferencia estadística entre cada una de las curvas dosis-respuesta ajustadas de forma sigmoideal. Además, las concentraciones de Ctx-HRP no afectan a la eficacia de DP6. Los valores de DP6 se transformaron a escala logarítmica. R^2 = 0,8516 y EC50 = 5,10% de DP6.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Purificación y caracterización de galactooligosacáridos (GOS) de "grado alimenticio" utilizando

cromatografía de intercambio catiónico y HILIC-ESI-MS

Los galactooligosacáridos producidos enzimáticamente derivados del suero consisten en disacáridos a heptasacáridos compuestos de 1-7 unidades de galactosa unidas a una molécula de glucosa en el extremo reductor. Esta mezcla de GOS compleja es un ejemplo de un producto comercial que contiene oligosacáridos no digeribles que fomentan la buena salud y azúcares de peso molecular bajo, que únicamente incrementan el valor calorífico del producto. Este ejemplo describe la utilización de resina de intercambio catiónico en forma de sodio para eliminar cromatográficamente la glucosa y la galactosa en una escala semi-preparativa. Las fracciones de oligosacáridos resultantes se caracterizaron satisfactoriamente y se obtuvo el perfil utilizando cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) acoplada a espectrometrías de masas por electrospray (ESI-MS).

1. Materiales y métodos

1.1. Productos químicos

Todas las soluciones se prepararon utilizando agua MilliQ. La mezcla comercial de galactooligosacáridos VivinalGOS[®] utilizada presentaba una composición habitual de: 73% p/p de materia seca, de la cual el 57% p/p era de galactooligosacáridos; 23% p/p de lactosa anhidra; 19% p/p de glucosa anhidra y 0,9% p/p de galactosa (Friesland Foods Domo, Zwolle, Holanda). Los patrones para la generación de curva patrón de HPLC fueron monohidrato de D-(+)-Glucosa y B-Lactosa de grado analítico, adquiridos de Sigma-Aldrich Company Ltd. (Gillingham, Dorset, Reino Unido). El MeOH y H₂O de grado HPLC se adquirieron de Rathburns Chemical Co., (Peebleshire, Escocia), NH₄AC de BDH (VWR International, Poole, Reino Unido). La maltoheptanosa, maltohexanosa, maltopentanosa, maltotetraosa, rafinosa, lactosa y glucosa se adquirieron de Sigma-Aldrich (Gillingham, Dorset, Reino Unido). Los polvos de GOS fraccionados se produjeron con la resina de intercambio catiónico UBK-530 (Mitsubishi chemical corporation, Tokyo, Japón). La escalera de homopolímero de glucosa (GHP) marcada con 2-AB (2-aminobenzamida) se adquirió de Ludger Ltd (Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido). Inicialmente, todos los oligosacáridos se disolvieron en H₂O hasta 10 mg/ml y, a continuación, se diluyeron adicionalmente antes de la inyección.

1.2. Hidrólisis de la lactosa de VivinalGOS[®] con β -galactosidasa:

La extracción de la lactosa de VivinalGOS se realizó para mejorar la separación entre la glucosa y la galactosa y los trisacáridos - heptasacáridos. En la reacción, la lactosa se hidroliza para formar glucosa y galactosa. Estos monosacáridos se retienen con una mayor afinidad en el intercambio catiónico. Para este fin, se trató previamente el VivinalGOS[®] con el preparado de β -galactosidasa Maxilact[®] L5000 antes de la purificación con intercambio catiónico. Inicialmente, se preparó una solución al 30% p/p de VivinalGOS[®] y se ajustó a pH 6,5 utilizando hidróxido de sodio 1 M. Después de calentar hasta 40°C, se añadieron 0,9 g de Maxilact al VivinalGOS[®] y se incubaron durante 4 horas. Después del tratamiento, la solución se ajustó hasta pH 4,5 y se calentó para desactivar la lactasa durante 10 minutos a 100°C. La enzima precipitada se extrajo mediante centrifugación a 19.000 RPM durante 60 minutos. La solución de VivinalGOS libre de lactosa resultante se utilizó en experimentos de intercambio catiónico.

1.3. Purificación de VivinalGOS[®] con cromatografía de intercambio catiónico a escala preparativa

La técnica está adaptada de Matsumoto y otros (Method for producing galactooligosaccharides (Método para producir galactooligosacáridos), E.P. Office, Editor. 1987). Resumidamente, se seleccionó la resina en forma de Na Unibead UBK-530 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd, Tokyo, Japón). Se hidrataron 2000 ml de resina UBK-530 y se extrajeron las partículas finas según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, la resina se trató con una solución de KCl 1 M durante 12 horas en una bañía de agua bajo agitación a 20°C a efectos de intercambiar el ion Na⁺ por el ion K⁺.

La columna estaba compuesta de vidrio de borosilicato con un diámetro interno de 0,05 m y una longitud de 1 m. Esta columna de vidrio estaba rodeada de una carcasa termostática de plástico acrílico (columna Pharmacia XK-50/100, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido). Se enrolló alrededor de la columna tubos adicionales de Teflón para que actuaran como intercambiador de calor. La columna se calentó con un baño de agua circulante Haake Modelo FE (Haake, Reino Unido). Las muestras se bombearon a través de la resina utilizando un módulo de bombas de 3 pistones libre de pulsaciones (Modelo C-601, Buchi, Flawil, Suiza). Los carbohidratos separados de las columnas se detectaron utilizando un refractómetro diferencial modelo Gilson, detector 132 RI (Anachem, Bedfordshire, Reino Unido), que se purgó con eluyente al inicio de cada experimento.

Antes de la carga de las muestras, todo el equipo, incluyendo la resina de intercambio iónico, la columna, VivinalGOS[®] y el agua utilizada para la elución se calentaron hasta 55°C durante un periodo de 60 minutos para asegurar el equilibrio. En total, se cargaron en la columna 1800 ml de los 2000 ml de la resina UBK-530. Inicialmente, se bombeó a través de la misma agua desmineralizada a 1 ml por minuto incrementando gradualmente hasta un flujo final de 15 ml por minuto a efectos de evitar un choque de presión en la resina. Antes de su uso, todo el eluyente se desgasificó utilizando helio. Después del tratamiento previo con Maxilact L5000, se inyectó una solución de 150 ml de Vivinal GOS[®] al 30% p/p libre de lactosa en la columna a 15 ml por minuto. Concentraciones

más elevadas que ésta produjeron una alteración en el patrón de separación. El volumen vacío de esta columna fue de 675 ml ó 45 minutos antes de que el carbohidrato empezara a eluirse. El eluyente que contenía carbohidratos separados se recogió cada minuto en fracciones hasta que no se detectaron más carbohidratos mediante el detector RI (Colector de fracciones, Modelo 2128, Bio-Rad, Hertfordshire, Reino Unido).

1.4. Determinación de la pureza de Vivinal GOS mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento utilizando cromatografía de intercambio catiónico a escala preparativa

Las fracciones recogidas durante la cromatografía de intercambio iónico se analizaron utilizando cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) (Dionex corp., CA, Estados Unidos) siguiendo el protocolo desarrollado para los galactooligosacáridos por de Slegte y otros ("Determination of trans-Galactooligosaccharides in Selected Food Products by Ion Exchange Chromatography: Collaborative Study" (Determinación de trans-Galactooligosacáridos en Productos Alimenticios Seleccionados mediante Cromatografía de Intercambio Iónico: Estudio Colaborativo). Journal of AOAC International, 2002. 85 Parte 2: págs. 417-423). Resumidamente, se utilizó una columna de resina de intercambio aniónico pelicular CarboPac PA-1 con una columna de protección de diámetro interno 250 x 4 mm de partículas de etilvinilbenceno-divinilbenceno sulfonado. La fase móvil fue un gradiente de (A) NaOH 12,5 mM, (B) NaOH 125 mM y (C) NaOH 125 mM con acetato de sodio 500 mM. El gradiente del eluyente para el análisis se realizó tal como se ha descrito anteriormente por de Slegte y otros. Se inyectaron 20 µl de cada muestra y se analizaron a temperatura ambiente con una velocidad de flujo de 1 ml por minuto.

1.5. Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)

Se seleccionó la columna ZIC®-HILIC, PEEK, 150 x 2,1 mm 5 µm ya que se ha observado que el "sangrado" de la fase estacionaria de la columna es particularmente bajo (SeQuant AB, Umea, Suecia). La fase estacionaria zwitteriónica ZIC®-HILIC está unida a sílice porosa. La separación se consigue mediante un mecanismo de separación hidrofílica superpuesto a las interacciones electrostáticas débiles. Los otros parámetros de análisis fueron: 1 µl de volumen de inyección, detección UV a 214 nm, y 31 minutos de trabajo. Una de las fracciones de GOS se analizó a 20, 30, 40, 50 y 60°C. Todas las cromatografías posteriores se realizaron a 60°C. Se utilizó metanol en lugar de acetonitrilo porque era posible disolver las fracciones de GOS en concentraciones más elevadas de MeOH:H₂O que de ACN:H₂O. La inyección de carbohidratos en 100% de H₂O no permitió que el disolvente se separara en la fase estacionaria y, consecuentemente, la muestra se eluyó como un "tapón" ("plug") sin separación. La fase móvil estaba compuesta de 95% de MeOH-5 mM NH₄AC en H₂O. Los experimentos en gradiente variaron el tiempo en el que se llegaba a una concentración 50:50 de MeOH:H₂O mediante la programación de las bombas del gradiente. El contenido bajo de agua del 5% se utilizó para mantener la hidratación adecuada y mejorar las interacciones electrostáticas entre la fase estacionaria y la fase móvil. El HPLC Agilent 1100 consistía en una bomba capilar de la serie Agilent 1100 con un desgasificador en línea (Agilent, Stockport, Reino Unido), un detector UV, un automuestreador, y una columna de protección de intercambio catiónico Dionex CS 14 (4 mm x 50 mm). Las velocidades de flujo variaban desde 100 a 200 µl por minuto y se monitorizaron a 214 nm con el detector de UV.

1.6. Espectrometría de masas con ionización por electrospray para analizar los azúcares

La descripción de la ionización y la detección, incluyendo los parámetros específicos de trabajo, se describen según las instrucciones de los fabricantes modificadas (instrumentos microTOF Bruker Daltonics, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

2. Resultados

2.1. GOS fraccionados por intercambio catiónico

El método de intercambio catiónico se modificó a partir de Matsumoto y otros [12] siguiendo las comunicaciones personales con J. de Slegte en Royal Friesland Foods. Previamente, se analizaron los contraiones Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ para determinar cuál proporcionaba la separación más limpia de GOS de la lactosa, galactosa y glucosa. La forma de potasio de la resina UBK-530 proporcionó los mejores resultados con respecto a la separación de Vivinal GOS[®] y, por lo tanto, se seleccionó para experimentos posteriores (datos no publicados). Se utilizó HPAEC-PAD en cada fracción de 1 minuto para determinar la composición de oligosacáridos. Las fracciones iniciales contenían concentraciones elevadas de GOS. Hubo un desplazamiento en la composición desde galactooligosacáridos de peso molecular elevado a glucosa y galactosa con cada fracción sucesiva recogida de la columna de IEX. La resina UBK-530 mostró una resistencia excelente a la compresión, los azúcares también se eluyeron sin disolvente orgánico y la columna no requirió de equilibrado entre las inyecciones, por tanto, se consiguió una purificación semicontinua.

2.2. Análisis y comparación entre las fracciones de GOS de números 1-15

Utilizando una columna calentada a 60°C ± 0,5°C, una velocidad de flujo de 200 µl por minuto y un gradiente de MeOH al 95%-NH₄AC 5 mM en agua hasta MeOH al 50%-NH₄AC 5 mM en agua en 25 minutos separó parcialmente

la composición de las fracciones de GOS 1-15. Utilizando las características de integración del software en el programa DataAnalysis v3.2, fue posible integrar el área bajo la cual cada uno de los grupos de azúcares se identificaron como DP₃, seguido de DP₄, DP₅, DP₆ y DP₇.

5 Mediante la integración de los cromatogramas de los iones extraídos de cada azúcar era posible calcular un valor de abundancia para los disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, hexasacáridos y heptasacáridos en cada fracción. Sin embargo, se ha observado que los oligosacáridos no se ionizan con la misma eficiencia en la fuente (Harvey, D.J., Rapid communications in mass spectrometry: RCM, 1993. 7(7): pág. 614) y, de este modo, la expresión de los datos en forma de abundancia relativa es una práctica común en la espectrometría de masas (Lamari, y otros, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. 793(1): pág. 15-36). Si los azúcares individuales no consiguen ionizarse con la misma eficiencia o, en cambio, los hexasacáridos (DP₆) se ionizan escasamente, la abundancia de ionización relativa en porcentaje reduce este efecto cuando se realizan comparaciones entre fracciones. Por ejemplo, si se añade la abundancia total de todos los aductos de carbohidratos (todos los DP₃ por ejemplo) en relación con todos los iones formados. La figura 1 es una representación gráfica de la abundancia relativa de trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos y hexasacáridos frente al número de fracción. La regresión lineal entre el número de fracción y la abundancia de DP₆ proporciona un coeficiente de correlación de 0,958, lo que indica que existe una fuerte relación entre estas 2 variables. La probabilidad de obtener un valor r calculado superior a 0,9 con más de 10 réplicas cuando 2 variables no están relacionadas es inferior a 0,001. La abundancia de DP₅ también está inversamente relacionada con el número de fracción con un coeficiente de 0,720.

EJEMPLO 2: Inhibición por galactooligosacáridos de la unión de la toxina del cólera a su receptor

En este ejemplo se mide la capacidad de las fracciones de galactooligosacáridos obtenidas en el ejemplo 1 de inhibir la unión de la toxina del cólera a GM1 utilizando un ELISA competitivo. La bioactividad o los valores EC₅₀ se correlacionan con la información estructural de los experimentos con HILIC-ESI-MS del ejemplo 1 para elucidar qué estructuras de los GOS son las más eficientes en la inhibición de la unión de Ctx a los receptores naturales GM1. El receptor natural GM1 se utilizó como azúcar modelo ya que se ha observado que presenta la mayor eficacia para la toxina del cólera.

1. Materiales y métodos

1.1 Productos químicos

35 El monohidrato de D-(+)-glucosa de grado analítico, la β-lactosa, el monosialogangliósido-GM1 aislado de cerebro bovino, el TWEEN® 20, la albúmina de suero bovino (BSA), la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), el dimetil sulfóxido (DMSO) y el ácido sulfúrico (H₂SO₄) se adquirieron todos de Sigma Aldrich (Gillingham, Dorset, Reino Unido). La solución salina tamponada en fosfato (PBS) se adquirió de Oxoid Ltd (Basingstoke, Hamps, Reino Unido) en forma de comprimidos y correspondía con la formulación original de Dulbecco y Vogt (1954), a excepción de que se omitieron el calcio y el magnesio. Cada comprimido se diluyó en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante. La subunidad B de la toxina de *Vibrio cholera* conjugada a peroxidasa de rábano picante fue importada y adquirida de Quadrant Ltd, Surrey, Reino Unido (fabricada por List Biologicals, CA, USA). Los galactooligosacáridos fueron una donación de Friesland Foods Domo (Zwolle, Holanda) y se purificaron y fraccionaron utilizando la cromatografía de intercambio catiónico antes de la utilización. Todas las soluciones se prepararon utilizando agua ultrapura MilliQ.

1.2 ELISA unido a GM1 inhibidor

Se incubaron las placas de microtitulación (F96 Maxisorp; Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) a temperatura ambiente durante la noche con 100 µl de gangliósido GM1 500 ng/ml disueltos por pocillo en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2) que contenía NaCl 160 mM y fosfato de potasio (PBS) 9 mM. Se extrajo el gangliósido no unido mediante el lavado de los pocillos tres veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Los sitios de unión adicionales en la superficie de la placa se bloquearon mediante la incubación de los pocillos con 200 µl de una solución al 2% (p/v) de albúmina de suero bovino (BSA)-PBS durante la noche a temperatura ambiente y, a continuación, se lavaron con Tween 20 al 0,1%-PBS tres veces.

Las soluciones de análisis se prepararon en BSA-PBS al 0,1%; consistiendo cada una en 5, 10 y 15 ng/ml de conjugado de Ctx-B5 con peroxidasa de rábano picante, se incubaron previamente con inhibidores potenciales durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la adición de 200 µl de cada solución de análisis, las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La toxina no unida se extrajo lavando tres veces con Tween 10 al 0,1%-PBS. A continuación, las siguientes etapas revelaron la toxina unida a GM1: (1) incubación con 100 µl de solución (TMB) recién preparada (1 mg de TMB en 500 µl de DMSO, 50 ml de tampón de citrato de potasio 0,1 M y 5 µl de peróxido de hidrógeno al 30%) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La TMB es un sustituto no carcinogénico para la bencidina y se utilizó como sustrato de la peroxidasa. El sustrato produjo un producto final soluble que tenía un color azul pálido y se leyó espectrofotométricamente (Genios, Tecan UK Ltd, Thatcham, Reino

Unido) después de detenerlo con H_2SO_4 2 M (dando lugar a un color amarillo) a 450 nm.

Todos los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado y se validaron frente a una curva patrón de 0, 0,97, 1,95, 3,90, 7,81, 15,62, 31,25 y 62,5 ng/ml de conjugado de toxina con peroxidada. Se preparó una solución madre de 30 ng/ml de Ctx-HRP y se utilizó en cada placa como control para medir el coeficiente de variación entre ensayos o las variaciones mínimas de absorbancia y la estabilidad de los ensayos. Las lecturas de absorbancia desconocidas y los posteriores valores EC50 se calcularon a partir de la curva patrón y se compararon con el programa Prism versión 4.0 (GraphPad® Software Inc, CA, Estados Unidos). Se calculó el ANOVA utilizando Minitab® version 14 (Mintab Ltd, Coventry, Reino Unido).

La media estadística de cada grupo de lecturas de absorbancia se utilizó para calcular la concentración de cólera que no se inhibía y, consecuentemente, era capaz de unirse a la superficie de GM1 inmovilizada. Las lecturas de absorbancia más elevadas eran indicativas de mayores concentraciones de cólera no inhibido y/o un rendimiento bajo del inhibidor. Las barras de error reflejan el error estándar de la media de los conjugados Ctx-HRP no inhibidos reales en los diferentes días de los experimentos de replicación.

2. Resultados

2.1 Inhibición por las fracciones de GOS de la unión de Ctx-HRP a GM1-ELISA

La figura 2 muestra una representación de la interacción entre la concentración de Ctx-HRP unido y la dosis de fracción de GOS número 2 a cada concentración diferente de Ctx-HRP. La fracción de GOS número 2 se seleccionó como ejemplo, aunque se observaron habitualmente niveles similares de inhibición para las fracciones 1-9 con una reducción visual en la respuesta colorimétrica en las 3 concentraciones de Ctx-HRP con, como mínimo, 12,5 mg/ml de azúcar. Las barras de error más amplias a concentraciones bajas de GOS son causadas por la inhibición parcial entre los replicados y/o la afinidad débil a concentraciones bajas. Además, el ANOVA de dos vías entre la concentración de Ctx-HRP unida y la dosis de la fracción 2 de GOS y la dosis de Ctx-HRP confirma que la dosis de GOS afecta a la inhibición ($P < 0,001$). Además, la R^2 estadística descriptiva (η^2 o eta al cuadrado) representa la fracción de la variancia global atribuible a diferencias entre las medias de la "dosis de Ctx-HRP" y la "dosis de GOS". Una R^2 de 98,43% significa que una fracción amplia de la variación es debida al tratamiento que define un grupo (es decir, concentración creciente) y además refuerza la relación entre las concentraciones de Ctx-HRP unido y la fracción 2 de GOS. Un valor de F amplio significa que la variación entre los valores promedio de la "dosis de GOS" y el "Ctx-HRP unido" es mayor de la que se observaría al azar, apoyando adicionalmente el concepto de que la "dosis de GOS" afecta al Ctx-HRP unido.

Las concentraciones promedio de Ctx-HRP unido en todos los experimentos de fracción 2 de GOS sin ningún inhibidor fueron 4,25, 8,31 y 21,90 ng/ml y no 5, 10 y 20 ng/ml tal como se calculó. Sin embargo, estas variaciones están dentro de los límites de los coeficientes "intra" ensayos e "inter" ensayos (no mostrados). Además, también hubo diferencias menores en los valores de inhibidor cero entre las fracciones, por tanto, a efectos de realizar comparaciones entre las fracciones, se calculó el valor EC50 y se comparó entre las curvas. Se utilizó el programa Prism® v4 (GraphPad Software, Inc, CA, Estados Unidos) para transformar la concentración de Ctx-HRP de ng/ml a porcentaje de inhibición y para normalizar los valores de inhibidor a escala logarítmica. El programa Prism® ajustó una curva de dosis-respuesta a una forma sigmoidal o una curva logística de tres parámetros (figura 3). La normalización de este modo alarga el eje y verticalmente desde 0 a 100% por definición; por tanto, era esencial la precisión de los valores mínimo y máximo. El programa Prism también comparó las curvas dosis-respuesta en cada concentración de Ctx-HRP y se halló que los valores de EC50 no eran estadísticamente diferentes ($P = 0,9411$, F, 0,061). Esto indica que la fracción 2 de GOS inhibía de manera efectiva el Ctx-HRP con la misma eficacia, independientemente de la cantidad de Ctx-HRP tal como se muestra en la figura 3. Esta situación probablemente cambiará si la concentración de Ctx-HRP se incrementara por encima de 20 ng/ml. En cambio, este ensayo está limitado por la linealidad de la curva patrón del sustrato de peroxidasa y la observación de que la unión a la mitad del máximo se estima que es de 15 ng/ml ó 0,153 nM [34]. El valor de EC50 se calculó como 30,77 mg/ml, con una curva sigmoidal perfectamente ajustada con un R^2 de 0,9253.

Entre las fracciones 1-10, el valor de EC50 varió mínimamente, en particular comparando los valores de EC50 de 30,77 mg/ml de la fracción 2 de GOS y 42,19 mg/ml de la fracción 8 de GOS. Los valores de EC50 de Ctx-HRP no se pudieron obtener para las fracciones 9-15 porque no se observó la inhibición total, o bien la curva dosis-respuesta sigmoidal no se ajustaba adecuadamente. Por lo tanto, a efectos de comparar la eficacia entre las fracciones, se seleccionó la inhibición máxima con 100 mg/ml de la fracción de GOS. De forma destacada, las fracciones de GOS de números 11-15 produjeron representaciones con barras de error más amplias, sin embargo, esto está causado probablemente por la unión no específica o la afinidad más débil por Ctx-HRP. A pesar de esta observación, un análisis ANOVA de una vía entre la inhibición de Ctx-HRP 10 ng/ml (0,102 nM) y cada fracción de GOS revela que existe una diferencia estadística entre las fracciones con $P < 0,0001$ (figura 4A). Las fracciones 1-8 inhiben entre el 91,84% y el 89,05% de Ctx-HRP, respectivamente. Comparando este porcentaje de inhibición con la concentración real de Ctx-HRP unido cuando se incuban con 100 mg/ml de fracción 2 de GOS, el valor es bajo (0,621 ng/ml) siendo los límites de confianza del 95% 0,374 – 0,868 ng/ml. Además, a 100 mg/ml, existe un 95% de certeza de que la fracción 2 de IEX inhibirá entre el 95,67% y el 89,95% del Ctx-HRP, el 95% del tiempo.

La figura 4B compara de forma similar la inhibición de Ctx-HRP 20 ng/ml (0,204 nM) y cada fracción de GOS a 100 mg/ml. Los valores inhibidores se expresaron de nuevo en relación con el Ctx-HRP unido con 0 mg/ml de inhibidor. Las fracciones 1-7 de GOS proporcionan un mínimo del 92% de inhibición, mientras que las fracciones 10-15 inhiben menos del 66% de Ctx-HRP con una mayor desviación estándar entre los replicados. Al igual que antes, un análisis ANOVA de una vía entre la inhibición de Ctx-HRP 20 ng/ml y cada fracción de GOS revela que existe una diferencia estadística entre las fracciones con $P < 0,0001$. La diferencia máxima en la inhibición entre las diferentes concentraciones de Ctx-HRP es pequeña en comparación con el efecto observado entre las fracciones de GOS. Utilizando cromatografía de intercambio catiónico, se elucidó la diferencia entre el perfil de las especies de GOS de cada fracción. Con HILIC-ESI-MS se midieron directamente las diferencias entre los grados de polimerización en cada fracción y se observó que las concentraciones de DP₆ y DP₅ disminuyen con el número de fracción sucesivo, mientras que aumentan las concentraciones de DP₃ y DP₄. Utilizando modelos matemáticos y técnicas de análisis, se investigó la correlación entre los cambios en la masa y la eficacia biológica

2.2 Comparación entre la inhibición de Ctx-HRP por la fracción de GOS y la composición de GOS

La figura 1 muestra el cambio en el perfil de GOS entre cada fracción separada utilizando cromatografía de intercambio catiónico tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Dado que la abundancia de DP₆ parece correlacionarse estrechamente con la actividad anti-adhesiva de Ctx, se representó la media del Ctx-HRP unido frente a la abundancia relativa de GOS DP₆ (hexasacáridos) en cada fracción (figura 5). La correlación seguía una relación de descenso exponencial; además, la expresión de la concentración de DP₆ a escala logarítmica (representación semilogarítmica) da lugar a un dispersograma sigmoidal. A continuación, se utilizó el programa Prism para normalizar los datos en términos de inhibición de Ctx-HRP y se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidal para calcular los valores EC50 para cada concentración de Ctx-HRP. Al igual que antes, EC50 se refiere a la concentración de inhibidor que compite por la mitad de la unión específica y es igual que el valor de IC50. El intervalo de confianza del 95% para cada valor EC50 de las curvas se solapa y, además, no existe diferencia estadística entre los valores logarítmicos de EC50. Se calculó que los valores de EC50 eran de 4,40, 5,11 y 6,25% de abundancia relativa de DP₆, con un valor calculado global de 5,1%. Esta similitud confirmó además que la eficacia de GOS es similar a lo largo de las concentraciones de Ctx-HRP utilizadas. De manera destacada, la actividad biológica de cada fracción de GOS se midió a una concentración de 100 mg/ml y, por tanto, la principal diferencia entre cada fracción es la abundancia relativa de azúcar y, de este modo, la composición.

3. Conclusión

Las fracciones de GOS 1-8 muestran niveles consistentemente elevados de inhibición contra la toxina del cólera en el ensayo ELISA. Los perfiles de las especies de GOS de cada fracción de GOS de HILIC-ESI-MS se correlacionaron frente a la concentración de Ctx unida en ELISA y revelaron que las estructuras DP₆ son el ligando inhibidor más probable con un valor R^2 global de 0,925. El ejemplo 1 anterior de la presente invención muestra que la abundancia de DP₆ desciende de una forma secuencial con cada fracción desde el 23% en la fracción 1 de los GOS hasta el 9% en la fracción 10 de los GOS y el 0% en la fracción 16 de los GOS. Además, la abundancia de DP₅ parece correlacionarse con la actividad inhibidora. Se observó un incremento simultáneo en DP₃ y DP₄, indicativo de un desplazamiento de las fracciones predominantes que contienen DP₆-DP₄ a las fracciones que contienen DP₄-DP₃. Las concentraciones de las fracciones de GOS globales elevadas pueden ser importantes para mantener una concentración de DP₆ suficientemente elevada para inhibir totalmente Ctx-HRP. Esto podría explicar por qué los GOS no fraccionados no inhiben en absoluto a Ctx (fracción 0 de GOS; figuras 4A y B). Por lo tanto, el propio fraccionamiento ha aumentado la eficacia mediante la concentración de especies de GOS particulares, es decir GOS pentasacáridos y hexasacáridos, que en cualquier caso están diluidos en la formulación comercial de GOS.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende galactooligosacáridos (GOS), en la que las especies de GOS que tienen un grado de polimerización de 5 o superior, preferentemente 6 o superior, están presentes en una cantidad, como mínimo, de 35% (% en peso), en base al peso total en seco de todas las especies de GOS presentes en la composición, y en la que el contenido de GOS pentasacáridos y/o hexasacáridos es del 2-100% en peso en base al peso total de la composición.
2. Composición, según la reivindicación 1, que comprende especies de GOS que comprenden residuos galactosilo unidos en β , en particular $\beta(1-4)$ y/o $\beta(1-6)$
3. Composición, según la reivindicación 1 ó 2, en la que todas las especies de GOS presentes en la composición forman, como mínimo, el 50% en peso, preferentemente, como mínimo, el 60% en peso, más preferentemente, como mínimo, el 70% en peso en base al peso en seco de la composición.
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende GOS que tienen un grado de polimerización de 5 en una cantidad, como mínimo, del 40% en peso en base al peso en seco de la composición.
5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende GOS que tienen un grado de polimerización de 6 o superior en una cantidad, como mínimo, del 10% en peso, en base al peso en seco de la composición.
6. Composición que comprende galactooligosacáridos (GOS), entre los que las especies de GOS que tienen un grado de polimerización de 5 o más están presentes en exceso sobre las especies de GOS que tienen un grado de polimerización inferior a 5, en base al peso en seco de dichas especies de GOS en la composición, y en la que el contenido de GOS pentasacáridos y/o hexasacáridos es del 2-100% en peso en base al peso total de la composición.
7. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha composición está esencialmente libre de mono y/o disacáridos, en particular galactosa y/o glucosa y/o lactosa.
8. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende, como mínimo, el 15% en peso de especies de GOS que tienen un grado de polimerización de 6 en base al peso total en seco de todas las especies de GOS presentes en la composición.
9. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además oligosacáridos sialilados no digeribles (SOS) de grado alimenticio, preferentemente SOS derivados de la leche, tales como 3'-sialyllactosa.
10. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un alimento o una bebida que comprende de, aproximadamente, 1 mg a, aproximadamente, 20 g de GOS hexasacáridos por parte utilizada.
11. Método para proporcionar una fracción de GOS capaz de inhibir la unión de la toxina del cólera (Ctx) a GM1, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - proporcionar una mezcla de galactooligosacáridos (GOS) que tienen diferentes grados de polimerización;
 - opcionalmente extraer la lactosa libre de dicha mezcla de GOS;
 - aplicar dicha mezcla de GOS (libre de lactosa) a una resina de intercambio catiónico;
 - eluir por etapas los GOS con un grado creciente de polimerización utilizan una fase móvil acuosa y recoger las fracciones de eluyente separadas;
 - analizar cada fracción de eluyente por el efecto inhibitorio en la unión de Ctx a GM1; y
 - seleccionar una o más fracciones capaces de inhibir la unión de Ctx a GM1.
12. Método, según la reivindicación 11, en el que proporcionar dicha mezcla de GOS con diferentes grados de polimerización comprende someter el permeado del suero o la lactosa a una transgalactosidación enzimática utilizando β -galactosidasa.
13. Método, según la reivindicación 11 ó 12, en el que dicha mezcla de GOS que tienen diferentes grados de polimerización comprende una mezcla comercial de GOS, preferentemente la mezcla de GOS comercializada bajo el nombre comercial de VivinalGOS®.
14. Utilización de una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la fabricación de una composición nutricional o farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una enfermedad aguda o crónica asociada con la adhesión y/o captación de un miembro de la familia de las toxinas del cólera o causadas por las mismas.
15. Utilización, según la reivindicación 14, para la fabricación de una composición nutricional o farmacéutica para la

prevención o el tratamiento de una enfermedad aguda o crónica causada por un miembro de la familia de toxinas del cólera, en particular enfermedades diarreicas.

5 16. Utilización, según la reivindicación 14 ó 15, en la que dicho miembro de la familia de toxinas del cólera es la toxina del cólera *V. cholerae* (Ctx-B) o la enterotoxina lábil al calor (LT-B) de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC).

17. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en la que la dosis diaria de GOS pentasacáridos y/o hexasacáridos es de hasta, aproximadamente, 250 mg.

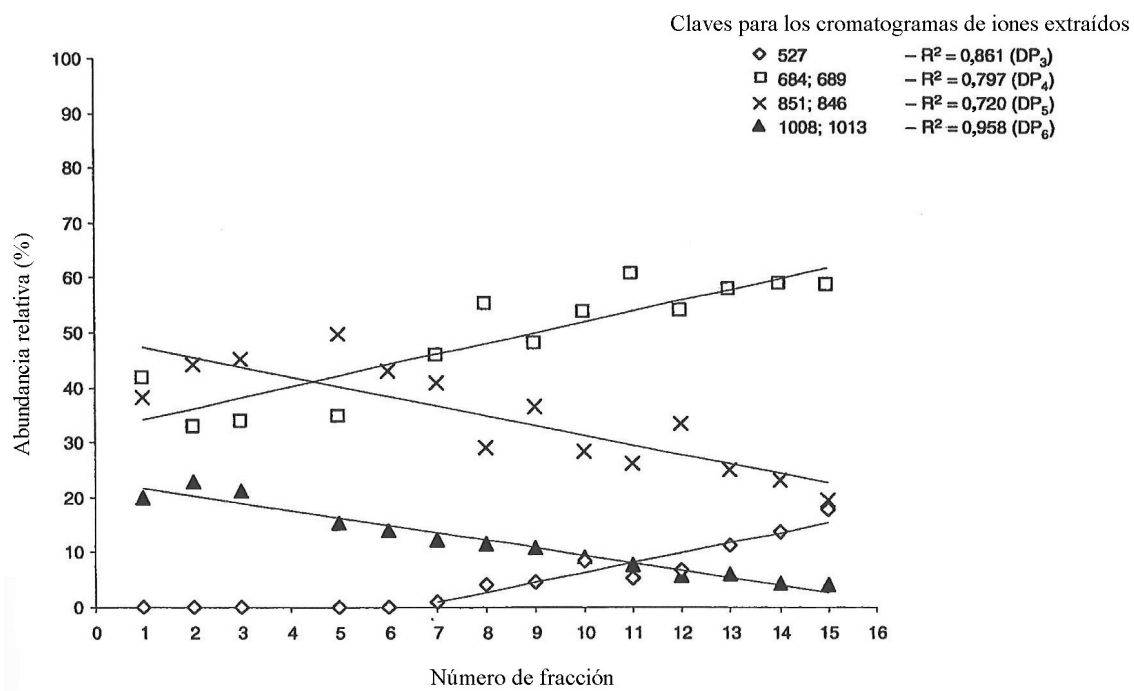
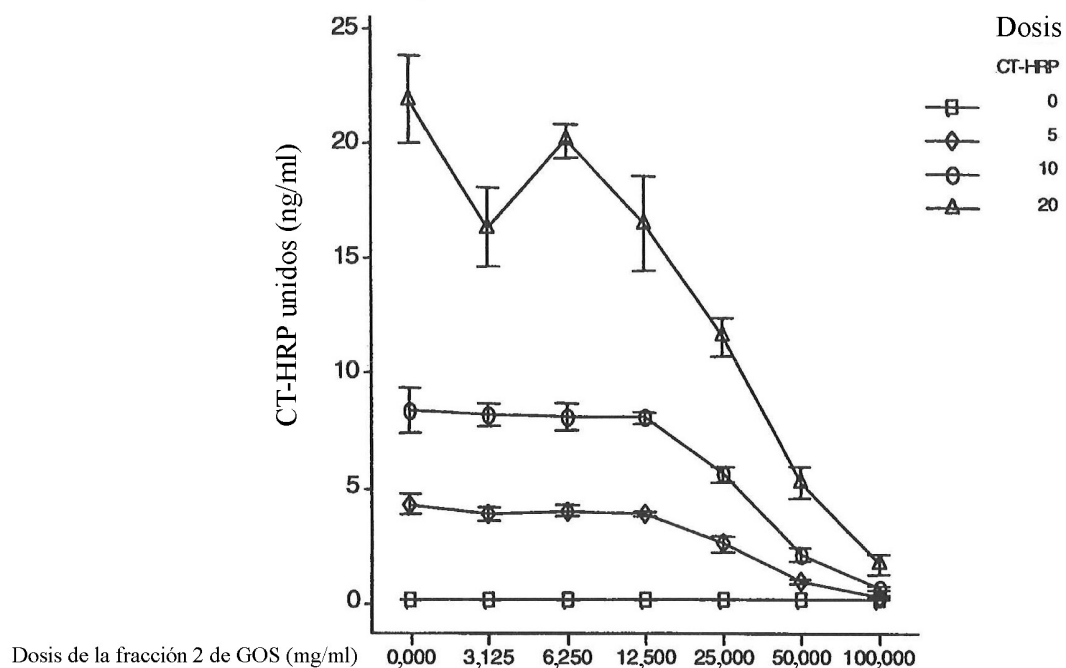


Figura 1

Representación por Intervalos de la CT unida frente a la Dosis de la Fracción de GOs, Dosis de CT

Las Barras representan Un Error Estándar desde la Media



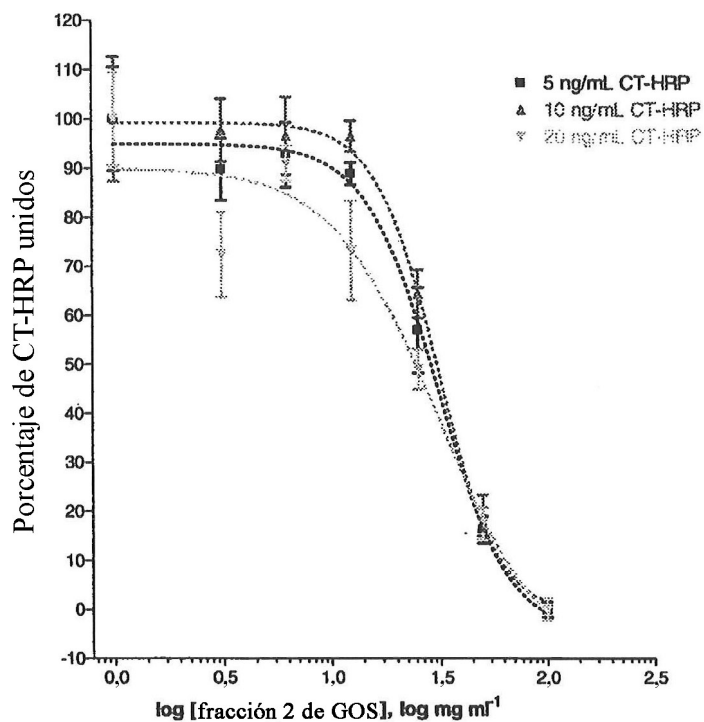
ANOVA de dos vías: log CT Unida frente a la Dosis de CT, Dosis de la fracción 2 de GOS

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Dosis de CT	3	51,1363	17,0454	1439,14	0,000
Dosis de la fracción 2 de GOS	6	8,0822	1,3470	113,73	0,000
Interacción	18	2,7981	0,1555	13,12	0,000
Error	56	0,6633	0,0118		
Total	83	62,6799			

S = 0,1088 R-Sq = 98,94% R-Sq(adj) = 98,43%

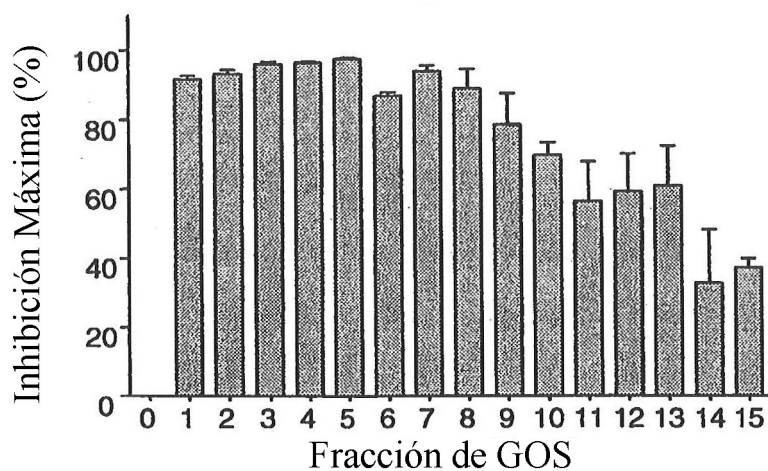
Figura 2

Curva Dosis-Respuesta de la fracción 2 de GOS



LOGEC50 diferentes para cada grupo de datos			
Valores individuales de mejor ajuste			
LOGEC50	1,473	1,501	1,482
EC50	29,72	31,73	30,31
Intervalos de confianza del 95 %			
LOGEC50	1,362 a 1,584	1,396 a 1,607	1,218 a 1,745
EC50	23,01 a 38,39	24,89 a 40,44	16,52 a 55,61
Bondad de ajuste			
Grados de libertad	17	17	17
R ²	0,9397	0,9414	0,8862
Suma absoluta de los cuadrados	1880	1964	3071
Sy.x	10,52	10,75	13,44

Figura 3

10 ng ml⁻¹ de CT-HRP frente a 100 mg m⁻¹ de fracciones de GOS**ANOVA de una vía: % de Inhibición frente a Fracción**

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Fracción	14	16825	1202	9,35	0,000
Error	28	3601	129		
Total	42	20426			

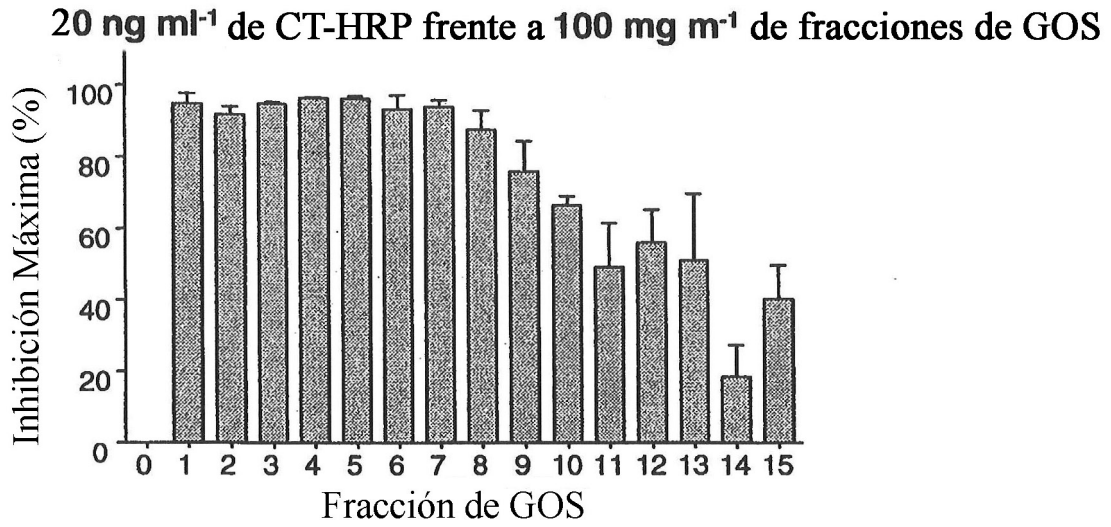
S = 11,34 R-Sq = 82,37% R-Sq(adj) = 73,56%

Nivel	N	Media	Desviación estándar	CI del 95% individuales para la Media basada en Desviaciones estándar agrupadas
1	3	91,84	1,82	(-----*-----)
2	3	93,33	2,35	(-----*-----)
3	3	96,21	1,28	(-----*-----)
4	3	96,80	0,53	(-----*-----)
5	3	97,69	0,75	(-----*-----)
6	3	87,04	1,72	(-----*-----)
7	3	94,00	2,81	(-----*-----)
8	3	89,05	9,78	(-----*-----)
9	3	78,66	15,65	(-----*-----)
10	3	69,90	6,21	(-----*-----)
11	3	56,38	19,82	(-----*-----)
12	3	59,29	18,96	(-----*-----)
13	3	60,94	20,04	(-----*-----)
14	2	32,71	21,85	(-----*-----)
15	2	37,24	3,62	(-----*-----)

Desviaciones estándar agrupadas = 11,34

25 50 75 100

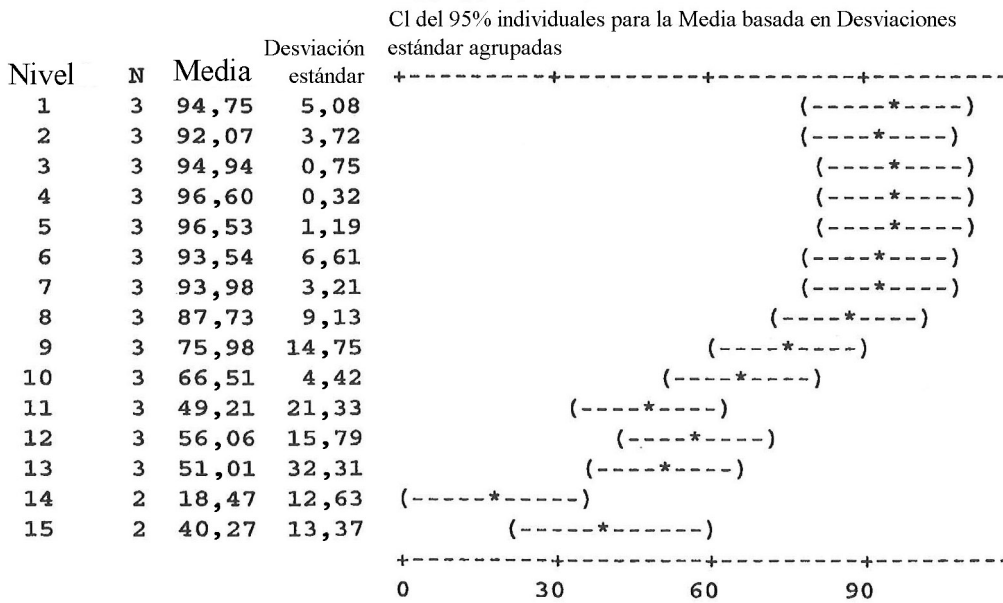
Figura 4A.



ANOVA de una vía: % de Inhibición frente a Fracción

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Fracción	14	22408	1601	9.60	0.000
Error	28	4667	167		
Total	42	27075			

S = 12,91 R-Sq = 82,76% R-Sq(adj) = 74,14%



Desviaciones estándar agrupadas = 12,91

Figura 4B.

Dosis-Respuesta entre la abundancia de DP6 y la inhibición de CT-HRP

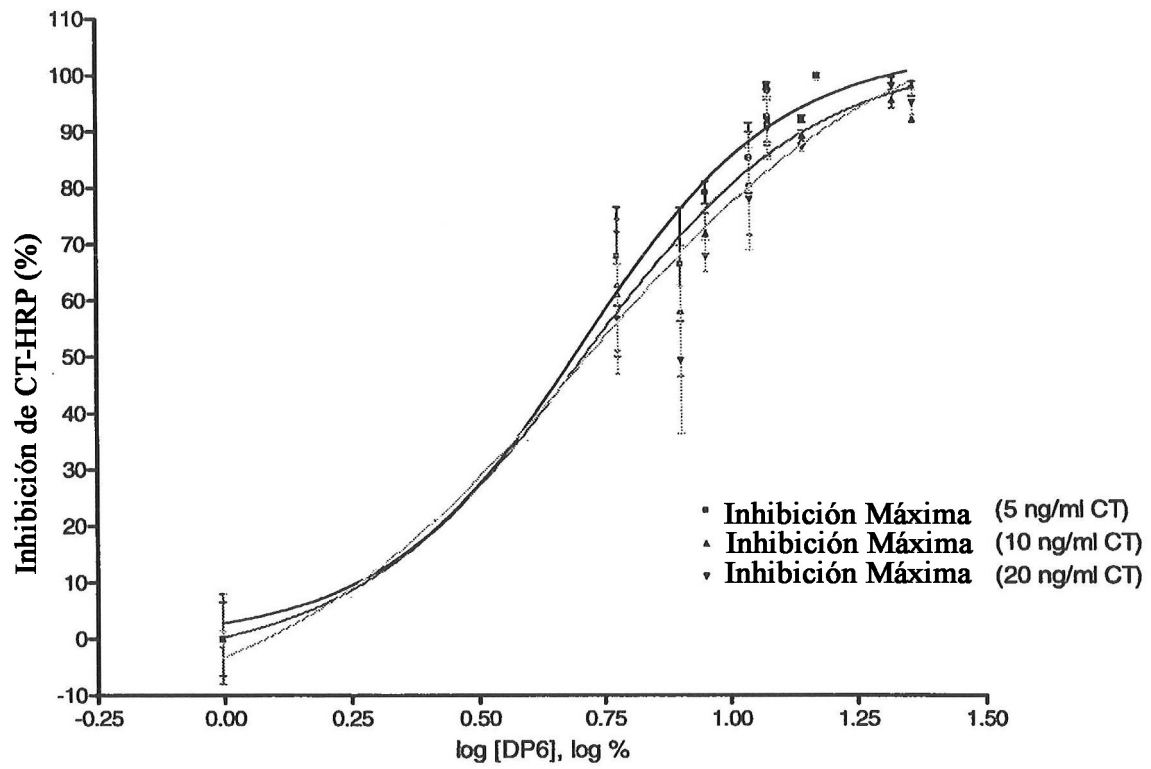


Figura 5