(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 392 906**

(21) Número de solicitud: 201130784

(51) Int. CI.:

A61K 31/702 (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

16.05.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

14.12.2012

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:

14.12.2012

(71) Solicitantes:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
SERRANO, 117
28006 MADRID, ES

(72) Inventor/es:

CLEMENTE GIMENO, Alfonso;
RUBIO SAN MILLAN, Luis Angel;
SANZ HERRANZ, Yolanda;
LAPARRA LLOPIS, José Moisés;
SANZ MURIAS, María Luz;
HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, Oswaldo Jesús;
MONTILLA CORREDERA, Antonia;
OLANO VILLÉN, Agustín y
MORENO ANDÚJAR, Francisco Javier

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

(54) Título: **GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LACTULOSA MULTIFUNCIONALES CON ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA Y PREBIÓTICA**

ES 2 392 906 A1

(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 392 906**

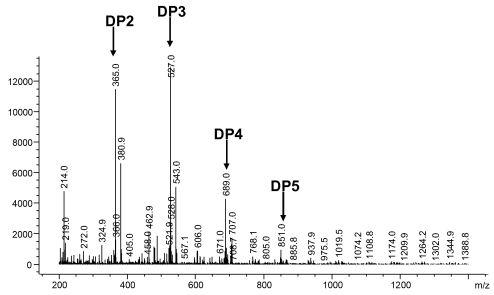
(21) Número de solicitud: 201130784

(57) Resumen:

Galacto-oligosacáridos derivados de lactulosa multifuncionales con actividad inmunomoduladora y prebiótica.

La presente invención reivindica el carácter multifuncional de unos galactooligosacáridos derivados de la lactulosa (GOS-Lactulosa) empleando modelos in vivo (ratas Wistar) e in vitro utilizando líneas celulares intestinales de origen humano (Caco-2 y HT29-MTX) validadas como modelo de epitelio intestinal. Las ventajas principales derivadas del uso de este producto son múltiples y de gran valor añadido: propiedades prebióticas mejoradas y adicionales a las de los prebióticos comerciales utilizados habitualmente. Este producto se obtiene bien mediante la transgalactosilación directa de la lactulosa empleando una ß-galactosidasa procedente de Aspergillus oryzae, o bien mediante la transgalactosilación de la lactosa y posterior isomerización química. Los GOS-Lactulosa objeto de la patente podrían ser descritos como prebióticos de segunda generación y, por tanto, de alto valor añadido y superior al de los prebióticos convencionales ya comercializados como la lactulosa o los GOS derivados de lactosa.

FIG. 1



ES 2 392 906 A1

DESCRIPCION

Galacto-Oligosacáridos derivados de lactosa multifuncionales con actividad inmunomoduladora y prebiótica.

La presente invención está dirigida al sector alimentario, más concretamente al sub-sector de los alimentos funcionales, y al sector de la industria farmacéutica.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El estado fisiológico del intestino grueso, y en particular del colon, tiene una gran importancia para la salud humana debido en gran parte a las actividades metabólicas de la microbiota que lo coloniza. Un gran número de enfermedades (diarrea, colitis ulcerosa, inflamación, cáncer, etc.) están relacionadas con alteraciones en la composición de la microbiota del colon. Además, es bien conocido que cepas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* pueden ejercer efectos beneficiosos sobre estos trastornos mediante la modulación de las funciones fisiológicas, metabólicas e inmunológicas del hospedador. Desde que hace más de una década se introdujera el concepto de "prebiótico", referido a oligosacáridos resistentes a la digestión gastrointestinal que afectan beneficiosamente al individuo al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de especies bacterianas beneficiosas en el intestino [Gibson & Roberfroid, 1995], existe un considerable interés en su utilización como ingredientes alimentarios como respuesta a la alta demanda existente en el mercado de alimentos saludables y complementos alimentarios. Por ello, la investigación en este campo se ha centrado en el desarrollo y caracterización de nuevos prebióticos que cumplan los requisitos necesarios para ser considerados como tales. Estas propiedades se basan en ser resistentes a la digestión gastrointestinal, la capacidad de ser fermentables y favorecer selectivamente el crecimiento y/o actividad de especies bacterianas beneficiosas en el colon (fundamentalmente *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp.) con el objetivo final de mejorar la salud gastrointestinal.

Los principales ingredientes prebióticos disponibles comercialmente en el mercado se basan en los siguientes carbohidratos: i) lactulosa (isómero de la lactosa) que es probablemente el primer carbohidrato utilizado como factor

bifidogénico para el consumo humano [Méndez & Olano, 1979]; ii) galactooligosacáridos (GOS) obtenidos tras un proceso de transgalactosilación enzimática a partir de la lactosa; iii) fructooligosacáridos (FOS) producidos mediante la acción enzimática de la fructosiltransferasa sobre la sacarosa; y iv) oligofructosas obtenidas a partir de la hidrólisis parcial de la inulina.

Para evaluar la actividad prebiótica de carbohidratos no digeribles se consideran una serie de aspectos que incluyen: cambios cuantitativos en la población microbiana, formación de productos finales de fermentación, así como la velocidad de fermentación. No obstante, se cree que gran parte de los carbohidratos prebióticos disponibles comercialmente hasta el momento fermentan rápidamente en el intestino grueso de tal modo que su acción tiene lugar principalmente en las zonas proximales [Rastall y col., 2000; McBain & Macfarlane, 2001; Tzortzis y col., 2005]. Estos resultados explican en parte el gran interés actual que existe por disponer de una "segunda generación" de nuevos ingredientes prebióticos que posean una serie de propiedades como:

i) ser activos a dosis bajas;

ii) no presentar efectos secundarios;

iii) tener una velocidad de fermentación más lenta, de modo que puedan presentar una mayor persistencia en el intestino grueso y, especialmente, en el colon ya que es esta región intestinal la que presenta una mayor incidencia de patologías digestivas y oncológicas [Roberfroid, 2007];

iv) presentar una gran selectividad en cuanto al control de la microbiota intestinal (por ejemplo, poder ser metabolizados por bifidobacterias específicas);

v) poseer actividad biológica adicional ejerciendo efectos beneficiosos sobre funciones fisiológicas específicas y/o reduciendo el riesgo de enfermedad, por ejemplo a través de su efecto sobre el desplazamiento de patógenos y la regulación de la función del sistema inmunitario [Gibson y col., 2005].

La mejora de las propiedades de los prebióticos comercializados, de modo que favorezcan de forma más selectiva el crecimiento y actividad de microorganismos beneficiosos (*Bifidobacterium* spp. y *Lactobacilus* spp.) en el colon, sería muy ventajoso para reforzar su función fisiológica en el epitelio intestinal y sistema inmunológico asociado al intestino y, así, mejorar las defensas del hospedador frente a microorganismos patógenos. En esta línea, se están realizando esfuerzos

importantes dirigidos a la identificación de oligosacáridos prebióticos con bioactividades añadidas, aunque por el momento los resultados obtenidos han tenido un éxito limitado [Ouwehand y col., 2005]. A modo de ejemplo, una mezcla de GOS comerciales derivados de lactosa mostró tener afinidad por receptores de membrana de microorganismos comensales como *Escherichia coli*; aunque este hecho ocasiona una menor interacción y adhesión con células intestinales (Caco-2) y hepáticas (HepG2) de origen humano [Shoaf y col., 2006], además es necesario emplear elevadas concentraciones del prebiótico, lo que dificulta que su uso en la práctica tenga efectos fisiológicamente relevantes [Macfarlane y col., 2008].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se han desarrollado nuevos productos basados en mezclas de ingredientes prebióticos con bacterias probióticas [Patentes WO 2010081126, WO 2009071578] y/o compuestos con propiedades inmunológicas [Patente EP 2014181] con el objetivo de reforzar la salud gastrointestinal del consumidor. Sin embargo, estos productos basados en múltiples ingredientes suelen presentar un coste elevado en el mercado y, además, en ciertos casos es difícil garantizar la supervivencia de determinadas bacterias probióticas en matrices alimentarias, así como tras el proceso de digestión. Por tanto, la producción de carbohidratos prebióticos con funciones beneficiosas añadidas presentaría un potencial interés para la industria alimentaria y/o farmacéutica.

Por otra parte, recientemente se han sintetizado una serie de nuevos galactooligosacáridos obtenidos por transgalactosilación a partir de la lactulosa empleando β-galactosidasas procedentes de *Kluyveromyces lactis* (Martínez-Villaluenga y col., 2008), o *Aspergillus aculeatus* (Cardelle-Cobas y col., 2008a), así como a partir de la isomerización con aluminato sódico de los galactooligosacáridos obtenidos a partir de lactosa con la β-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (Cardelle-Cobas y col., 2008b). Posteriormente, un estudio *in vitro* realizado con heces humanas ha mostrado el potencial poder bifidogénico de estos nuevos galactooligosacáridos (Cardelle-Cobas y col., 2009), aunque en este estudio ni se determinó el patrón de carbohidratos obtenidos tras transgalactosilación ni se evaluó el efecto de los mismos sobre otros grupos bacterianos presentes en la microbiota intestinal y que pueden tener, igualmente, un efecto en la salud gastrointestinal del individuo. No obstante, para explorar la

posible aplicación de estos nuevos GOS como carbohidratos prebióticos es necesario estudiar el perfil de oligosacáridos obtenido, su digestibilidad (íntimamente relacionada con su composición estructural), así como su capacidad para modular la microbiota intestinal con ensayos *in vivo* y su efecto sobre la biodiversidad de grupos bacterianos beneficiosos para la salud. Asimismo, y con el objetivo de satisfacer la demanda actual de prebióticos de segunda generación, sería conveniente evaluar posibles bioactividades añadidas no estudiadas hasta el momento como su capacidad de interacción con bacterias probióticas y/o inmunomoduladora.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores han demostrado el carácter multifuncional de unos galactooligosacáridos derivados de la lactulosa (GOS-Lactulosa) empleando modelos *in vivo* (ratas Wistar) e *in vitro* utilizando líneas celulares intestinales de origen humano (Caco-2 y HT29-MTX) validadas como modelo de epitelio intestinal.

Las ventajas principales derivadas del uso de este producto son múltiples y de gran valor añadido:

1.- Resistencia muy elevada a la digestión gastrointestinal *in vivo*, siendo muy superior a prebióticos comerciales (GOS-Lactosa).

2.- Capacidad inmunomoduladora.

- aumento de la expresión génica de interleucinas antiinflamatorias o implicadas en la regulación de la inflamación como la IL-6 e IL-10.

- reducción de la producción de los factores TNF-α e IL-1β (pro-inflamatorios) por células intestinales.

- mayor expresión del factor de transcripción nuclear (NFκB) implicado en diversos procesos de señalización intracelular, crecimiento y supervivencia

celular.

3.- Mayor capacidad de interacción con bacterias probióticas.

4.- Disminución de la interacción y posible supervivencia de bacterias patógenas intestinales típicas.

5.- Propiedades prebióticas en el intestino grueso (ciego y colon) a dosis bajas (1%, p/p) y tras un periodo de ingesta de 14 días.

6.- Actividad bifidogénica muy superior a prebióticos conocidos y ya comercializados como galacto-oligosacáridos derivados de lactosa (GOS-Lactosa) evaluados bajo las mismas condiciones de experimentación animal.

7.- Mayor biodiversidad en cuanto a las cepas de bifidobacterias específicas que metabolizan los GOS-lactulosa frente a los prebióticos comerciales (Lactulosa y GOS-Lactosa).

8.- Efecto prebiótico sin efectos secundarios (relativos a la ganancia de peso, la cantidad diaria ingerida de dieta o los pesos relativos de órganos tales como el estómago, hígado y bazo).

Hasta el momento existían únicamente en la bibliografía datos sobre la síntesis y el potencial carácter bifidogénico *in vitro* de GOS-Lactulosa obtenidos con β-galactosidasas procedentes de *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus aculeatus* (Cardelle-Cobas y col., 2009). No obstante, la presente solicitud de la patente aporta un amplio número de datos que muestran, por un lado, una serie de ventajas de GOS-Lactulosa, sintetizados empleando una β-galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, frente a prebióticos ya comercializados y, por otra parte, una serie de bioactividades añadidas no descritas hasta el momento. Estos resultados avalan que los GOS-Lactulosa objeto de la patente podrían ser descritos como prebióticos de segunda generación y, por tanto, de alto valor añadido y superior al de los prebióticos convencionales ya comercializados como la lactulosa o los GOS derivados de lactosa.

Concretamente, la resistencia a la digestión de los GOS-Lactulosa a lo largo del tracto intestinal fue muy elevada, observándose una digestibilidad ileal nula (0%), mientras que los carbohidratos prebióticos comercialmente disponibles (a los que también se le eliminó previamente la fracción de mono- y disacáridos) presentaron una digestibilidad en torno al 42% bajo las mismas condiciones de experimentación. Consecuentemente, la fermentación de GOS-Lactulosa en el intestino grueso de los animales estudiados provocó un incremento significativo en el número de bifidobacterias en el ciego, así como en el porcentaje relativo de bifidobacterias respecto a bacterias totales en ciego y colon, pero no así tras la ingesta de los prebióticos comerciales (GOS derivados de lactosa). Además, se observó que la fermentación de los GOS-Lactulosa favoreció un incremento significativo en diversidad poblacional del grupo de bifidobacterias respecto a los tratamientos con la lactulosa o los GOS-Lactosa; dicho incremento ha sido descrito por la comunidad científica como favorecedor de salud intestinal. Estos datos tan positivos respecto a prebióticos ya comercializados no pueden deducirse de los antecedentes publicados hasta el momento. Asimismo, la mayor biodiversidad de bifidobacterias que metabolizan los GOS-Lactulosa abre grandes expectativas a la hora de poder diseñar prebióticos de más amplio espectro que contrarreste la variabilidad genética existente entre individuos.

El efecto prebiótico de los GOS-Lactulosa se complementa con una serie de funciones bioactivas añadidas que suponen un beneficio adicional para la salud del consumidor. De este modo, los análisis de expresión génica en las secciones de intestino (íleon y colon) de estos animales también ponen de manifiesto que la administración de los GOS-Lactulosa induce una mayor expresión de genes de interleucinas (IL) anti-inflamatorias o implicadas en la regulación de la inflamación como la IL-6 e IL-10. Los estudios *in vitro* también han demostrado una interacción selectiva entre los GOS-Lactulosa y distintas especies bacterianas del género *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B bifidum* y *B. animalis*), hecho que puede favorecer la actividad de éstas en el intestino. Sin embargo, la interacción con otras bacterias con mayor potencial patogénico, incluyendo *Bacteroides* spp. y *Escherichia coli* y patógenos intestinales típicos (*Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*) es menor. Además, los GOS-Lactulosa actúan inhibiendo directamente la respuesta inflamatoria en las células intestinales causada por el patógeno *L. monocytogenes* por ejemplo mediante la reducción de la producción

de TNF-α por las células intestinales, lo que favorecería el restablecimiento de la homeostasis en la mucosa intestinal.

Por tanto, los GOS-Lactulosa presentan características que le aportan un valor añadido único, ya que su efecto prebiótico está incrementado respecto al de otros productos comerciales y ejerce efectos fisiológicos beneficiosos adicionales regulando la síntesis y expresión de marcadores de la función inmunológica que puede mejorar las defensas del hospedador y reducir los procesos de inflamación crónica, así como reducir la interacción y posible supervivencia de bacterias patógenas. Por otra parte, indicar que no se han encontrado antecedentes en los escasos trabajos que existen sobre los GOS derivados de lactulosa de estos efectos beneficiosos adicionales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la utilización de galacto-oligosacáridos derivados de la lactulosa (GOS-Lactulosa) con propiedades prebióticas mejoradas y adicionales a las de los prebióticos comerciales utilizados habitualmente. Este producto se obtiene bien mediante la transgalactosilación directa de la lactulosa empleando una β-galactosidasa procedente de *Aspergillus oryzae*, o bien mediante la transgalactosilación de la lactosa y posterior isomerización química. Una vez obtenido el producto libre de carbohidratos digeribles tras el tratamiento con carbón activo, se ha estudiado su efecto prebiótico y bioactividad en procesos fisiológicos.

Los GOS-Lactulosa están compuestos por una mezcla o combinación compleja de oligosacáridos de grado de polimerización ≥ 2. Concretamente, y atendiendo a la identificación realizada por ESI-MS (Figura 1), los oligosacáridos mayoritarios fueron los tri- y disacáridos, seguidas por tetra- y pentasacáridos, respectivamente. De este modo, se procedió a la identificación y caracterización por GC-MS de las fracciones mayoritarias, di- y trisacáridos, las cuales se caracterizan por la presencia de galactobiosas y galactosil-glucosas, así como por disacáridos galactosil-fructosa con enlaces 1-1, 1-3, 1-5 y trisacáridos como el 6'-galactosil-lactulosa, tal y como muestra la Tabla 1. Aunque previamente se había estudiado la estructura química de dos trisacáridos procedentes de GOS-Lactulosa obtenidos mediante otras enzimas, no se había realizado una

caracterización exhaustiva de la composición de estos oligosacáridos que será influyente en la digestibilidad y actividad de los mismos.

1.- Evaluación *in vivo* de la digestibilidad.

En los estudios in vivo se utilizaron ratas Wistar macho en crecimiento divididas en cuatro grupos a las que se suministró respectivamente i) la dieta control, ii) la dieta control + 1 % GOS-Lactulosa + 0.2 % Cr_2O_3 (marcador no digestible), iii) la dieta control + 1 % carbohidratos prebióticos comerciales (GOS-Lactosa)+ 0.2 % Cr_2O_3, iv) la dieta control + 1 % Lactulosa + 0.2 % Cr_2O_3 durante un período de 14 días con una ingesta diaria de 14 gramos. Tras su sacrificio, se diseccionaron el íleon, ciego y colon, y se lavaron con agua destilada estéril para recoger el contenido intestinal de cada sección. Los GOS derivados de lactulosa no afectaron al crecimiento de las ratas, ingesta, eficiencia relativa ni al peso relativo de órganos tales como estómago, hígado o bazo.

La supervivencia digestiva de GOS-Lactulosa en el íleon terminal se evaluó por GC-MS mediante la identificación y cuantificación de los oligosacáridos y el contenido en Cr_2O_3 presentes en las dietas, en el íleon y en muestras fecales. Como puede observarse en las Figuras 2 y 3, todos y cada uno de los carbohidratos que componen el producto objeto de la patente alcanzó el íleon terminal y no estuvieron presentes en las heces de los animales. Estos resultados indican la elevada supervivencia digestiva de GOS-Lactulosa, así como su completa fermentación en el intestino grueso, características esenciales de los compuestos prebióticos. La digestibilidad ileal aparente de los GOS-Lactulosa fue nula, mientras que es de destacar los valores de digestibilidad ileal elevados (~42%) obtenidos por los prebióticos comercialmente disponibles (GOS derivados de lactosa). Para confirmar el considerable grado de digestibilidad de los prebióticos comerciales, la Figura 4 muestra la desaparición de un número importante de trisacáridos (aquellos picos cromatográficos marcados con un asterisco) en el contenido ileal de los animales de experimentación tras su ingesta. Como prueba adicional de la digestibilidad de los GOS-Lactosa, la Figura 5 muestra la aparición de algunos disacáridos en la muestra de íleon que son consecuencia directa de la digestibilidad de los GOS-Lactosa de mayor peso molecular ya que, como se comentó anteriormente, los GOS-Lactosa no contienen originalmente ni mono- ni disacáridos al ser eliminados por

cromatografía de exclusión molecular antes de que se incorporaran a la dieta suministrada.

2.- Evaluación *in vivo* de la actividad prebiótica.

En los estudios de actividad prebiótica *in vivo* se utilizaron ratas Wistar macho en crecimiento divididas en cuatro grupos en las condiciones indicadas en el apartado anterior. El estudio del efecto de GOS-Lactulosa en la modulación de las poblaciones bacterianas intestinales (bacterias totales, *Bacteroides* sp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., grupo de *Clostridium coccoides/Eubacterium rectale* y grupo de *Clostridium leptum*) se realizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) en diferentes tramos del intestino (íleon, ciego y colon). Como ilustra la Tabla 2 se encontró un efecto bifidogénico significativo en el ciego del grupo de animales que ingirió GOS-Lactulosa respecto al control, mientras que no se observó incremento alguno en bifidobacterias en el grupo que consumió GOS comerciales derivados de lactosa. Por otra parte, también pudo observarse un aumento significativo en el porcentaje de bifidobacterias respecto a bacterias totales en ciego y colon del grupo de animales que consumió GOS-Lactulosa (Tabla 3). Además, cabe destacar un aumento significativo de bacterias beneficiosas correspondientes al grupo *Clostridium coccoides/Eubacterium rectale*, con relevancia en salud gastrointestinal.

Es de destacar los estudios realizados relativos al efecto de los GOS-Lactulosa sobre la biodiversidad intestinal del grupo de bifidobacterias comparándolos con la obtenida tras ingesta de lactulosa y los GOS-Lactosa. Tal y como muestra la Figura 6, un número significativamente superior de especies correspondiente al grupo de bifidobacterias respondieron a la fermentación con GOS-Lactulosa, frente a prebióticos convencionales como la Lactulosa y GOS-Lactosa. Como resultado, se observó un mayor enriquecimiento (número de bandas electroforéticas) en bifidobacterias presentes en ciego de ratas tratadas con GOS-Lactulosa respecto a las tratadas con lactulosa, GOS-Lactosa y dieta control (Tabla 4). Los índices de diversidad poblacional de Shannon y Evenness mostraron valores superiores en el caso de muestras cecales provenientes de ratas alimentadas con GOS-Lactulosa. Además, los estudios de similitud demostraron que la población de bifidobacterias de ciego en ratas alimentadas con GOS-Lactulosa son muy diferentes respecto a aquellas alimentadas con

lactulosa, GOS-Lactosa y dieta control (Figura 7).

Tomados en su conjunto, estos resultados muestran claramente el poder prebiótico superior de los carbohidratos objeto de la patente (GOS-Lactulosa) frente a prebióticos comercialmente disponibles (GOS-Lactosa) bajo las mismas condiciones de experimentación. Por tanto, los GOS-Lactulosa podrían ejercer un efecto prebiótico en un número mayor de individuos y a dosis más bajas que las empleadas para prebióticos ya comerciales.

3.- Estudio in vitro de la interacción con bacterias intestinales.

3.1. Reconocimiento molecular por receptores de membrana en microorganismos probióticos, comensales y patógenos intestinales.

En los estudios se han utilizado distintas bacterias probióticas (*B. animalis subsp lactis Bb12* y *Lactobacillus rhamnosus GG* ATCC 53103), *bifidobacterias* (*Bifidobacterium longum* CECT 7347, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis,* IATA-A2, *Bifidobacterium bifidum* CECT 7365) y comensales (*Bacteroides fragilis* [IATA-SAE2, -CAQ2, -CBS1, -CAR1] y *Escherichia coli* [IATA-CBL2, -CBM1, -CBD10, -CCD2]) aisladas de individuos sanos, así como patógenos intestinales (*Listeria monocytogenes* CECT 935 *y Salmonella entérica* CECT 443).

La interacción de los GOS-Lactulosa con las bacterias intestinales se evaluó mediante ensayos de inhibición competitiva de los sitios microbianos de reconocimiento de residuos α- y β-N-acetilgalactosamina y galactopiranosil presentes en mucinas y glicosaminoglicanos de la membrana extracelular de las células intestinales. El grado de interacción se estimó como reducción del porcentaje de fluorescencia detectada en pocillos recubiertos con mucina (Tipo II) con respecto a la fluorescencia total adicionada en cada pocillo, que equivale a las bacterias adheridas a la capa de mucina respecto al total adicionadas. Los resultados obtenidos (Figura 8) ponen de manifiesto el elevado grado de reconocimiento molecular de los GOS-Lactulosa por probióticos y bifidobacterias, hecho que avala y explicaría el efecto prebiótico de los GOS-Lactulosa observado en los estudios *in vivo*, mientras que la ausencia de efecto en la adhesión de bacterias comensales y patógenos intestinales sugieren la no utilización de los GOS-Lactulosa por estos microorganismos.

3.2. Efecto in vitro en la respuesta inflamatoria intestinal.

El patógeno intestinal invasivo *Listeria monocytogenes* CECT 935 se utilizó para evaluar el efecto de los GOS-Lactulosa en la producción de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF)-α e interleucina (IL)-1β - en cultivos de células humanas de origen intestinal (línea Caco-2) validadas como modelos de epitelio intestinal. En la Figura 9 se muestra la inhibición (p=0,001) de la producción de TNFα y de IL-1β por los GOS-Lactulosa. Estos resultados indican que los GOS-Lactulosa reduce el efecto inflamatorio de *L. monocytogenes* CECT 935 mediante la reducción de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias que contribuyen a aumentar la permeabilidad intestinal.

4.- Estudio in vivo de la actividad inmunomoduladora.

En los estudios se utilizaron ratas Wistar macho en crecimiento divididas en cuatro grupos de tratamiento como se indica en el apartado 1. Una vez finalizado el periodo de tratamiento los animales se anestesiaron (40 mg pentobarbital sódico / kg peso corporal) para llevar a cabo la obtención de sangre mediante punción intracardiaca que se congeló rápidamente en nitrógeno líquido, y la disección de tejido intestinal.

En muestras de secciones de intestino delgado se llevó a cabo, mediante transcripción inversa y PCR a tiempo real, la monitorización de la expresión (mRNA) de marcadores del control homeostático de la inflamación y respuesta inmune. Los biomarcadores analizados incluyeron el factor de transcripción nuclear (NFκB), interleucinas (IL) pleiotrópicas como IL-6, IL-10 e IL-15 y proinflamatorios como el TNFα. Los resultados obtenidos (Figura 10) ponen de manifiesto que la admininistración de los GOS-Lactulosa induce la expresión de IL-6 e IL-10, lo que puede favorecer la regulación de los procesos inflamatorios a nivel intestinal. La inclusión de los GOS-Lactulosa en la dieta de los animales causó una mayor expresión del NFκB, implicado en diversos procesos de señalización intracelular, crecimiento y supervivencia celular. La cuantificación (ELISA) de TNFα en muestras de sangre periférica confirmó que la inclusión de los GOS-Lactulosa en la dieta de los animales no altera los parámetros basales de este marcador de activación de la inflamación con respecto al grupo control.

Los datos aportados demuestran que los compuestos objeto de esta solicitud (GOS-Lactulosa) presentan un valor añadido a su efecto prebiótico (mayor

persistencia en el tracto intestinal y efecto estimulador del crecimiento de bifidobacterias, así como una mayor biodiversidad) con un efecto adicional por modular la función inmunológica. Todo ello hace de este producto una atractiva alternativa para ser utilizado como prebióticos de segunda generación en un amplio número de productos comerciales tales como alimentos infantiles, complementos dietéticos, alimentos para animales, etc. También se podrían presentar aplicaciones en el campo de la industria farmacéutica y/o nutracéutica

Por tanto, la presente invención hace referencia a una combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos derivados de lactulosa o GOS-Lactulosa (glicosil-fructosas) para su uso como ingredientes alimentarios multifuncionales, preferentemente con actividad prebiótica e inmunomoduladora.

En una realización preferente de la invención, dicha combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos es obtenible a través de un procedimiento que comprende realizar una reacción de transgalactosilación de lactulosa catalizada preferentemente por β-galactosidasa, y más preferentemente dicha enzima procede de *Aspergillus oryzae*.

En otra realización de la invención, dicha combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos es obtenible a través de un procedimiento que comprende realizar una reacción de transgalactosilación de lactosa catalizada preferentemente por β-galactosidasa, y más preferentemente dicha enzima procede de *Aspergillus oryzae*. Una realización más preferente añade posteriormente una isomerización química del derivado de lactosa obtenido.

La presente invención también tiene como objetivo la combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos anteriormente referenciada caracterizada porque la citada actividad inmunomoduladora se produce preferentemente al aumentar la población de bifidobacterias y/o inducir la expresión de biomarcadores implicados en el control homeostático de la inflamación y/o activación del sistema inmunológico.

En una realización preferente de la invención, dicha combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos se caracteriza porque la citada actividad prebiótica se produce preferentemente en el intestino grueso de un sujeto tras la ingesta de una dosis de la citada combinación. En una realización aún más preferente, dicha ingesta es de al menos un 1% p/p, y más preferentemente durante un periodo de al menos 14 días.

En otra realización preferente de la invención, dicha combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos se caracteriza porque presentan una supervivencia digestiva de hasta un 100% en el intestino grueso de un sujeto tras la ingesta de la citada combinación.

Más preferentemente, la combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos se caracteriza porque tras la ingesta de la citada combinación se produce también en el intestino grueso del sujeto la fermentación, preferentemente completa, de la misma.

Aún más preferentemente, la combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos se caracteriza porque tras la ingesta de la citada combinación se produce también un efecto prebiótico aumentando la concentración de las bifidobacterias en el intestino grueso del sujeto respecto a dicha concentración de las bifidobacterias antes de la ingesta.

En otra realización aún más preferente, la combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos se caracteriza porque el efecto prebiótico también conduce a un aumento de la biodiversidad de bifidobacterias del intestino grueso del sujeto respecto a dicha biodiversidad de bifidobacterias antes de la ingesta.

Una última realización preferente de la invención hace referencia a la combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos anteriormente descrita caracterizada porque también puede producir un efecto inhibidor en la colonización de las bacterias patógenas del intestino del sujeto.

En la presente invención, el término "galacto oligosacáridos bioactivos" o "mezcla

de galacto oligosacáridos bioactivos" se refiere a los galacto oligosacáridos derivados de la lactulosa (GOS-Lactulosa), concretamente glicosil-fructosas y derivados, con propiedades mejoradas y adicionales a las de los prebióticos comerciales utilizados habitualmente.

En la presente invención el término "Ingrediente alimentario" se refiere a uno de los componentes o el constituyente principal de cualquier mezcla o combinación que constituye un alimento comercial.

En la presente invención el término "Carbohidratos con actividad inmunomoduladora" se refiere a carbohidratos con capacidad de interaccionar y/o regular la activación del sistema inmunitario, con un potencial efecto favorable en las defensas del hospedador y el control de los procesos de inflamación crónica.

En la presente invención el término "Carbohidratos con actividad prebiótica" se refiere a oligosacáridos resistentes a la digestión gastrointestinal que estimulan selectivamente el crecimiento y/o actividad de especies bacterianas del tracto intestinal, consideradas beneficiosas que pueden ejercer efectos beneficiosos en la salud del hospedador.

Cuando en la presente invención se habla de "Inducir la expresión de biomarcadores implicados en el control de la inflamación y respuesta inmunológica", se está refiriendo al efecto positivo de los oligosacáridos en el aumento de ARN (mensajero) de moléculas reguladoras de los procesos de inflamación y activación de la respuesta inmune.

En la presente invención el término "Sujeto" se refiere a cualquier animal, preferentemente mamífero, más preferentemente se refiere a ratas Wistar empleadas como modelo animal de experimentación.

En la presente invención el término "Supervivencia digestiva" hace referencia a la propiedad de los carbohidratos de ser resistentes a las condiciones ácidas y actividades hidrolíticas presentes en el tracto gastrointestinal, siendo capaces de

alcanzar el intestino grueso en forma activa y en cantidades fisiológicamente significativas.

En la presente invención el término "Fermentación completa" se refiere al metabolismo en forma completa de los carbohidratos objeto de la patente por la microbiota intestinal.

En la presente invención el término "Efecto bifidogénico" se refiere a compuestos con capacidad de estimular selectivamente el crecimiento de bifidobacterias (especie bacteriana beneficiosa en el colon).

En la presente invención el término "Biodiversidad de bifidobacterias del intestino grueso del sujeto" se refiere a la variabilidad del grupo bacteriano citado, siendo ésta consecuencia directa del metabolismo de compuestos prebióticos. Por tanto, hace referencia a la mayor variedad de especies del género *Bifidobacterium* identificadas (principalmente, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium pseudo-longum*).

En la presente invención el término "Interacción positiva sobre el crecimiento y actividad de las bacterias prebióticas" hace referencia a la estimulación selectiva del metabolismo y crecimiento de bacterias consideradas beneficiosas (preferentemente *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillum* spp.) por los carbohidratos prebióticos.

En la presente invención el término "Interacción negativa sobre el crecimiento, actividad y supervivencia de las bacterias patógenas" hace referencia al efecto inhibidor de los carbohidratos prebióticos en la actividad metabólica, crecimiento y colonización intestinal de patógenos intestinales.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el espectro obtenido tras análisis por ESI-MS de los oligosacáridos que componen los GOS-Lactulosa.

La Figura 2 muestra los cromatogramas obtenidos tras análisis por GC-MS del contenido en disacáridos: A) de GOS-Lactulosa en el íleon terminal del grupo de ratas que consumieron este producto, B) de GOS-Lactulosa en la dieta suministrada, y C) de GOS-Lactulosa en las heces del grupo de ratas que consumieron este producto.

La Figura 3 muestra los cromatogramas obtenidos tras análisis por GC-MS del contenido en trisacáridos: A) de GOS-Lactulosa en el íleon terminal del grupo de ratas que consumieron este producto, B) de GOS-Lactulosa en la dieta suministrada, y C) de GOS-Lactulosa en las heces del grupo de ratas que consumieron este producto.

La Figura 4 muestra los cromatogramas obtenidos tras análisis por GC-MS del contenido en trisacáridos: A) de GOS-Lactosa (prebióticos comerciales) en el íleon terminal del grupo de ratas que consumieron este producto, B) de GOS-Lactosa (prebióticos comerciales) en la dieta suministrada, y C) de GOS-Lactosa (prebióticos comerciales) en las heces del grupo de ratas que consumieron este producto. Los picos marcados con asteriscos corresponden a los trisacáridos que han sido digeridos tras la ingesta.

La Figura 5 muestra los cromatogramas obtenidos tras análisis por GC-MS del contenido en disacáridos obtenidos tras la digestión de la fracción de trisacáridos: A) de GOS-Lactosa (prebióticos comerciales) en el íleon terminal del grupo de ratas que consumieron este producto, y C) de GOS-Lactosa (prebióticos comerciales) en las heces del grupo de ratas que consumieron este producto.

La Figura 6 muestra un gel de electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE) de bifidobacterias aisladas de las muestras de ciego de los grupos de ratas que consumieron GOS-Lactulosa, Lactulosa y GOS-Lactosa, respectivamente.

La Figura 7 muestra el dendograma de similitud de bifidobacterias obtenido tras análisis de DGGE de muestras procedentes de ciego de ratas tratadas con una dieta control, lactulosa, GOS-Lactosa o GOS-Lactulosa tras 14 días de

tratamiento. En la parte superior de la figura queda representada la escala de similitud entre muestras.

La Figura 8 muestra el grado de interacción de GOS-Lactulosa con distintas bacterias probióticas (*Lactobacillus rhamnosus GG* ATCC 53103 y *Bifidobacterium animalis subsp lactis Bb12*), bifidobacterias (*Bifidobacterium longum* CECT 7347, *Bifidobacterium bifidum* CECT 7365) y comensales (distintas cepas de *Bacteroides fragilis,* y *Escherichia coli*) aisladas de individuos sanos, así como patógenos intestinales - *Listeria monocytogenes* CECT 935 y *Salmonella enterica* CECT 443 - obtenidos de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Los resultados se muestran como el intervalo de variación de las medidas y valor medio (n=4).

La Figura 9 muestra el efecto de los GOS-Lactulosa en la producción de factor de necrosis tumoral-α e interleucina-1β, ambas con actividad proinflamatoria, desencadenada por el patógeno invasivo intestinal *Listeria monocytogenes* (CECT 935) en cultivos de células humana de origen intestinal (línea Caco-2). Los resultados se muestran como el intervalo de variación de las medidas y valor medio.

La Figura 10 muestra el efecto de los GOS-Lactulosa en la expresión (mRNA) de marcadores inmunológicos en secciones de íleon de los animales de experimentación (ratas Wistar). Los resultados se muestran como expresión relativa respecto a β-actina.

La Tabla 1 muestra la identificación por GC-MS de la fracción de disacáridos y trisacáridos de los GOS-Lactulosa.

La Tabla 2 muestra el efecto que ejerce la dieta control o suplementada con 1% de GOS-Lactulosa, Lactulosa o GOS-Lactosa (prebióticos comerciales) tras su ingesta durante un periodo de 14 días sobre las diferentes poblaciones bacterianas en los diferentes tramos intestinales estudiados (íleon, ciego y colon).

La Tabla 3 muestra el efecto que ejerce la dieta control o suplementada con 1% de GOS-Lactulosa, Lactulosa o GOS-Lactosa (prebióticos comerciales) tras su ingesta durante un periodo de 14 días en el porcentaje relativo de bifidobacterias respecto a bacterias totales en los diferentes tramos intestinales estudiados (íleon, ciego y colon).

La Tabla 4 muestra el grado de enriquecimiento (definido como número de bandas electroforéticas correspondientes al género *Bifidobacterium* tras análisis de DGGE), así como los índices de Shannon y Evenness (relativos a la diversidad poblacional) de muestras procedentes de ciego de ratas tratadas con una dieta control, lactulosa, GOS-Lactosa o GOS-Lactulosa tras 14 días de tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Cardelle-Cobas, A., Martínez-Villaluenga, C., Villamiel, M., Olano, A., Corzo, N. (2008a). Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and Pectinex Ultra SP-L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 3328–3333.
- Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Villamiel, M., Olano, A. (2008b). Isomerization of lactose-derived oligosaccharides: A case study using sodium aluminate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 10954-10959.
- Cardelle-Cobas, A., Fernández, M., Salazar, N., Martínez-Villaluenga, C., Villamiel, M., Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C. G. (2009). Bifidogenic effect and stimulation of short chain fatty acid production in human faecal slurry cultures by oligosaccharides derived from lactose and lactulose. *Journal of Dairy Research* 76, 317-325.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota - introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401-1412.
- Gibson, G. R., McCartney, A. L., Rastall, R. A. (2005). Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *British Journal of Nutrition* 93, S31-S34.
- Macfarlane, G. T., Steed, H., Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology* 104, 305-344.
- Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Olano, A., Corzo, N., Villamiel, M., Jimeno, M. L. (2008). Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides produced from lactulose by transgalactosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 557–563.
- McBain, A. J., Macfarlane, G. T. (2001). Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in in-vitro human gut bacterial ecosystems. *Journal of Medical Microbiology* 50, 833-842.
- Méndez, A., Olano, A. (1979). Lactulose: A review on some chemical properties and applications in infant nutrition and medicine. *Dairy Science Abstract* 41, 531–535.

- Ouwehand, A. C., Derrien, M., de Vos, W., Tiihonen, K., Rautonen, N. (2005). Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 212-217.
- Rastall, R. A., Gibson, G. R., Fuller, R., Gaskins, H. R. (2000). Colonic functional foods. En *Functional foods - Concept to product.* pp. 71-93. Edited by Glenn R Gibson and Christine M Williams. Woodhead Publishing Ltd. (Cambridge, United Kingdom).
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition* 137, 830S–837S.
- Shoaf, K., Mulvey, G. L., Armstrong, G. D., Hutkins, R. W. (2006). Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infection and Immunity* 74, 6920-6928.
- Tzortzis, G., Goulas, A. K., Gee, J. M., Gibson, G. R. (2005). A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *Journal of Nutrition* 135, 1726-1731.
- Patente WO 2010081126. Compositions comprising probiotic and prebiotic components and mineral salts, with lactoferrin. Inventores: Longoni, V., Penci, M.
- Patente WO 2009071578. Composition based on probiotic bacteria in association with a prebiotic and use thereof in the prevention and/or treatment of respiratory pathologies and/or infections and in the improvement of intestinal functionality. Inventores: Mogna, G., Strozzi, G. P., Mogna, L.
- Patente EP 2014181. Compositions based on prebiotic and immunogenic ingredients for the prevention and treatment of gastroenteric disorders caused by dysbiosis and/or alterations of the normal intestinal flora. Inventor: DI Pierro, F.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1.

1.- Obtención de GOS-Lactulosa por transgalactosilación enzimática de la lactulosa y posterior tratamiento con carbón activo.

Se prepara una solución de 450 g/L de lactulosa en tampón fosfato sódico 50 mM y cloruro de magnesio 1 mM a pH 4,5, se añade 8 U/mL de β-galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y se incuba a 60ºC durante 8h con agitación orbital de 300 r.p.m. Transcurrido el tiempo de reacción se inactiva la enzima manteniendo la muestra a 100ºC durante 5 min.

Esta mezcla de azúcares derivados de lactulosa se purifica para obtener fracciones enriquecidas en oligosacáridos con propiedades prebióticas. Para ello la muestra se diluye con agua hasta una concentración de azúcares de 50 g/L, se añade carbón activo a una concentración de 75 g/L y se mantiene en agitación durante 30 min, se filtra la mezcla y se lava con 500 mL de agua, de esta forma se elimina prácticamente la totalidad de los monosacáridos (97%) y gran parte de los disacáridos (65%). Los oligosacáridos adsorbidos en el carbón activo se liberan con 250 mL de una mezcla etanol agua al 50%, manteniéndola en agitación durante 30 min y filtrándola. Posteriormente la solución alcohólica con los azúcares se evapora o liofiliza, obteniéndose el producto como un líquido concentrado (sirope) o en polvo. El producto final presenta un alto porcentaje en oligosacáridos (con un grado de polimerización ≥ 3), siendo éste en torno al 70%. El carbón activo se puede reutilizar para realizar nuevas purificaciones.

2.- Estudio de la actividad prebiótica *in vivo* de GOS-Lactulosa.

2.1. Diseño experimental. Se utilizan ratas Wistar macho en crecimiento (peso inicial aproximado de 40-45 gr), mantenidas en jaulas metabólicas bajo condiciones controladas de temperatura (25 ºC), humedad (50 %) y luz (ciclos de 12 horas). Los animales son preadaptados a las condiciones experimentales con una dieta control (AIN-93G, Testdiet) durante un periodo de 6 días previo al comienzo de la fase experimental. A continuación, se establecen cuatro grupos de ratas (n=10 por grupo) a los que se les suministra respectivamente i) la dieta control, ii) la dieta control + 1 % GOS-Lactulosa + 0.2 % Cr_2O_3 (como marcador no digestible), iii) la dieta control + 1 % GOS derivados de lactosa comerciales (GOS-lactosa)+ 0.2 % Cr_2O_3, iv) la dieta control + 1 % lactulosa + 0.2 % Cr_2O_3 durante un período de 14 días siendo la ingesta diaria de 14 gramos. Al final del período de experimentación, se les retira la alimentación a los animales durante 14 h, se les alimenta con 4 gramos de la dieta correspondiente y son sacrificados bajo anestesia general (40 mg pentobarbital sódico / kg peso corporal). Finalmente, el íleon, ciego y colon se diseccionan y lavan con agua destilada estéril para recoger el contenido intestinal de cada sección, los cuales se congelan, liofilizan y almacenan a -80 °C para posteriores análisis.

2.2. Determinación cuantitativa y evaluación de la supervivencia digestiva in vivo de los carbohidratos prebióticos en el íleon terminal. La identificación y cuantificación de oligosacáridos presentes en las dietas, en el íleon y en muestras fecales se lleva a cabo mediante GC-MS tras su derivatización a trimetilsilil oximas. La digestibilidad ileal aparente (%) de los distintos oligosacáridos utilizados en esta invención se calcula de acuerdo a la expresión: $[(Pf/Cr_2O_3f) - (Pi/Cr_2O_3i)]/(Pf/Cr_2O_3f)$, donde Pf y Pi representan la cantidad de oligosacárido (mg por 100 mg de muestra) en la dieta y muestras ileales, respectivamente, mientras que Cr_2O_3f y Cr_2O_3i representa las concentraciones de marcador indigestible (mg por 100 mg) en la dieta y en el contenido ileal.

2.3. Efecto de los carbohidratos prebióticos en la modulación de las poblaciones bacterianas intestinales. La extracción de ADN total se lleva a cabo a partir de muestras liofilizadas de contenido intestinal (íleon, ciego y colon) usando QIAamp DNA stool kit (Quiagen, West Sussex, UK). El DNA eluído se trata con RNasa y

analiza mediante un espectrofotómetro NanoDrop. El DNA purificado se almacena a -20°C hasta su uso. Los diferentes grupos bacterianos objeto de estudio, que incluyeron bacterias totales, *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., grupo *Clostridium coccoides/Eubacterium rectale,* grupo *Clostridium leptum* y enterobacterias se analizan en muestras de contenido intestinal mediante PCR cuantitativa (qPCR). Para ello, se utilizan cebadores específicos del grupo bacteriano basados en secuencias específicas del gen 16S rRNA. Los ensayos qPCR se llevan a cabo en placas multipocillos utilizando un sistema de detección iQ5 Cycler Multicolor. La concentración bacteriana de cada muestra se expresa como $\log_{10}$ del número de copias mediante la interpolación de los valores Ct de las muestras intestinales en las curvas de calibración standard obtenidas para cada grupo bacteriano. Los datos obtenidos son analizados estadísticamente (análisis multivariante) con el objeto de determinar el potencial prebiótico de los distintos oligosacáridos.

La diversidad poblacional del género *Bifidobacterium* es analizada mediante DGEE, utilizando cebadores específicos (Bif164-f y Bif662-GC-r). Dicha técnica proporciona un patrón o perfil de diversidad genética, pudiéndose aplicar a estudios de estructura y dinámica de poblaciones en ecosistemas digestivos. Los resultados obtenidos evidencian que cada tratamiento ocasiona un patrón de bandas estable y repetible del género *Bifidobacterium*. A partir de DGGE se obtienen dendogramas utilizando como fundamento el índice de similitud Dice y el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). Además, se analizan los índices de diversidad (enriquecimiento, Shannon y Evenness) derivados del perfil de bandas de DGGE en función de las dietas experimentales o de la sección intestinal muestreada en ratas.

3.- Estudio *in vitro* de la interacción con las bacterias intestinales.

3.1 Reconocimiento molecular por receptores de membrana en microorganismos probióticos, comensales y patógenos intestinales.

Los estudios se han llevado a cabo con bacterias probióticas (*B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 y *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103), comensales (*Bifidobacterium longum* CECT 7347, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* IATA-A2, *Bifidobacterium bifidum* CECT 7365, *Bacteroides fragilis* [IATA-SAE2, -CAQ2, -CBS1, -CAR1] y *Escherichia coli* [IATA-CBL2, -CBM1, -CBD10, -CCD2])

obtenidas de individuos sanos y patógenos intestinales (*Salmonella entérica* CECT 443 y *Listeria monocytogenes* CECT 935) de colección. Los microorganismos, crecidos en medios de cultivos específicos durante 20 h, se aislaron por centrifugación (1.500 x *g* / 5 min) y se lavaron (x3) con una disolución tampón de fosfato (PBS) (pH 7). Las células se incubaron (37ºC/30 min) con una disolución de fluoresceína (75 μM) y se lavaron con PBS. Posteriormente, las células se resuspendieron a una concentración de aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml (densidad óptica $0.5_{\lambda 600}$ nm) en PBS.

Las suspensiones bacterianas se mezclaron con los GOS-Lactulosa (0.3% p/v), descritos en apartados anteriores de la presente solicitud, y se incubaron (37ºC/1h) en placas de 96 pocillos con mucina (Tipo II) inmovilizada. La inmovilización de mucina se llevó a cabo incubando (4ºC/24h) las placas con una disolución (0.5 mg/mL) de mucina (Tipo II) en PBS.

El grado de reconocimiento molecular e interacción de los GOS-Lactulosa con las bacterias intestinales se evaluó conforme a los criterios detallados en la descripción de la invención.

3.2 Efecto in vitro en la respuesta inflamatoria intestinal.

El efecto de los GOS-Lactulosa en la producción de biomarcadores pro-inflamatorios se evaluó en cultivos de células intestinales de origen humano (Caco-2) ampliamente aceptadas como modelo de epitelio intestinal al presentar las características de los enterocitos humanos maduros.

En los experimentos las células Caco-2 se sembraron a una densidad inicial de 5 $x10^4$ células/cm^2 y se crecieron durante 5 días, con cambios de medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium) cada 2 días.

En los estudios se utilizaron cultivos de 20h del patógeno invasivo intestinal de colección - *Listeria monocytogenes* CECT 935 - crecido en caldo Brain-Heart. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se lavaron con una disolución tampón de fosfato (PBS) (pH 7). Se prepararon suspensiones bacterianas, por duplicado, equivalentes a 10^8 ufc/mL y sólo una de ellas se mezcló con los GOS-Lactulosa (0.3% p/v). Las mezclas se incubaron (37ºC/95%CO_2/3h) con el cultivo celular y posteriormente se obtuvo (9300 x *g*/10 min) el sobrenadante.

La respuesta inflamatoria en las células intestinales se monitorizó mediante la cuantificación de la concentración de factor de necrosis tumoral (TNFα) e interleucina (IL)- 1β. La cuantificación de TNFα e IL-1β se llevó a cabo en alícuotas (100 µL) del sobrenadante mediante técnicas ELISA (eBiosciences, sensitividad 4 pg/mL) según las indicaciones del fabricante.

4.- Estudio *in vivo* de la actividad inmunomoduladora.

El estudio se llevó a cabo en ratas (Wistar) macho en crecimiento que se distribuyeron aleatoriamente en distintos grupos (n=15) a las que se administró: i) dieta control, ii) la dieta control + 1 % GOS-Lactulosa + 0.2 % Cr_2O_3 (marcador no digestible), y iii) la dieta control + 1 % carbohidratos prebióticos comerciales + 0.2 % Cr_2O_3, durante un período de 14 días. Tras el periodo de tratamiento los animales se sacrificaron previa anestesia (40 mg pentobarbital sódico / kg peso corporal) y se diseccionó el intestino, cuyas secciones se recogieron en un medio crioprotector para el RNA y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido.

En las muestras homogeneizadas (Tissue lyser, Qiagen) se extrajo el contenido total de RNA utilizando un kit comercial (RNA mini kit, Qiagen) para este fin, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A partir de alícuotas (1 µg) de RNA se obtuvo el cDNA mediante reacción de la transcriptasa reversa (AMV Reverse Transcriptase, Promega). Posteriormente, con técnicas de PCR en tiempo real se monitorizó los cambios en la expresión (mRNA) de biomarcadores del control homeostático de la inflamación y respuesta inmune. Los biomarcadores monitorizados incluyeron interleucinas (IL) pleiotrópicas (IL-6, -10 y -15), el factor de transcripción nuclear kappa B -NFκB y de necrosis tumoral alfa (TNFα), para los cuales se diseñaron secuencias cebadoras (primer) utilizando las bases de datos del GenBank (NCBI).

Ejemplo 2.

1.- Obtención de GOS-Lactulosa por transgalactosilación enzimática de la lactosa y posterior isomerización y tratamiento con carbón activo.

Se prepara una solución de 300 g/L de lactosa en tampón fosfato sódico 50 mM y cloruro de magnesio 1 mM a pH 4,5, se añade 8 U/mL de β-galactosidasa de

Aspergillus oryzae y se incuba a 60ºC durante 3h con agitación orbital a 300 r.p.m. Transcurrido el tiempo de reacción, se inactiva el enzima manteniendo la muestra a 100ºC durante 5 min. Esta mezcla de azúcares derivados de la lactosa se isomeriza con aluminato sódico en las siguientes condiciones: se diluye la mezcla con agua hasta una concentración de 100 g/L de azúcares, se añade aluminato sódico en una relación 1/1 (p/p) y se mantiene a 40ºC en agitación durante 12 h. La reacción se para por inmersión en agua helada y posterior neutralización con ácido sulfúrico y se centrifuga a 9000*g* durante 10 min. Esta mezcla isomerizada se trata con carbón activo según se describe en el ejemplo 1.

2.- Estudio de la actividad prebiótica *in vivo* de GOS-Lactulosa.

2.1. Diseño experimental. Se utilizan ratas Wistar macho en crecimiento (peso inicial aproximado de 40-45 gr), mantenidas en jaulas metabólicas bajo condiciones controladas de temperatura (25 ºC), humedad (50 %) y luz (ciclos de 12 horas). Los animales son preadaptados a las condiciones experimentales con una dieta control (AIN-93G, Testdiet) durante un periodo de 6 días previo al comienzo de la fase experimental. A continuación, se establecen cuatro grupos de ratas (n=10 por grupo) a los que se les suministra respectivamente i) la dieta control, ii) la dieta control + 1 % GOS-Lactulosa + 0.2 % Cr_2O_3 (como marcador no digestible), iii) la dieta control + 1 % GOS derivados de lactosa comerciales (GOS-lactosa)+ 0.2 % Cr_2O_3, iv) la dieta control + 1 % lactulosa + 0.2 % Cr_2O_3 durante un período de 14 días siendo la ingesta diaria de 14 gramos. Al final del período de experimentación, se les retira la alimentación a los animales durante 14 h, se les alimenta con 4 gramos de la dieta correspondiente y son sacrificados bajo anestesia general (40 mg pentobarbital sódico / kg peso corporal). Finalmente, el íleon, ciego y colon se diseccionan y lavan con agua destilada estéril para recoger el contenido intestinal de cada sección, los cuales se congelan, liofilizan y almacenan a -80 °C para posteriores análisis.

2.2. Determinación cuantitativa y evaluación de la supervivencia digestiva in vivo de los carbohidratos prebióticos en el íleon terminal. La identificación y cuantificación de oligosacáridos presentes en las dietas, en el íleon y en muestras fecales se lleva a cabo mediante GC-MS tras su derivatización a trimetilsilil oximas. La digestibilidad ileal aparente (%) de los distintos oligosacáridos

utilizados en esta invención se calcula de acuerdo a la expresión: [(Pf/Cr_2O_3f) – (Pi/Cr_2O_3i)]/(Pf/Cr_2O_3f), donde Pf y Pi representan la cantidad de oligosacárido (mg por 100 mg de muestra) en la dieta y muestras ileales, respectivamente, mientras que Cr_2O_3f y Cr_2O_3i representa las concentraciones de marcador indigestible (mg por 100 mg) en la dieta y en el contenido ileal.

2.3. Efecto de los carbohidratos prebióticos en la modulación de las poblaciones bacterianas intestinales. La extracción de ADN total se lleva a cabo a partir de muestras liofilizadas de contenido intestinal (íleon, ciego y colon) usando QIAamp DNA stool kit (Quiagen, West Sussex, UK). El DNA eluído se trata con RNasa y analiza mediante un espectrofotómetro NanoDrop. El DNA purificado se almacena a -20°C hasta su uso. Los diferentes grupos bacterianos objeto de estudio, que incluyeron bacterias totales, *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* sp., grupo *Clostridium coccoides/Eubacterium rectale,* grupo *Clostridium leptum* y enterobacterias se analizan en muestras de contenido intestinal mediante PCR cuantitativa (qPCR). Para ello, se utilizan cebadores específicos del grupo bacteriano basados en secuencias específicas del gen 16S rRNA. Los ensayos qPCR se llevan a cabo en placas multipocillos utilizando un sistema de detección iQ5 Cycler Multicolor. La concentración bacteriana de cada muestra se expresa como log_{10} del número de copias mediante la interpolación de los valores Ct de las muestras intestinales en las curvas de calibración standard obtenidas para cada grupo bacteriano. Los datos obtenidos son analizados estadísticamente (análisis multivariante) con el objeto de determinar el potencial prebiótico de los distintos oligosacáridos.

La diversidad poblacional del género *Bifidobacterium* es analizada mediante DGEE, utilizando cebadores específicos (Bif164-f y Bif662-GC-r). Dicha técnica proporciona un patrón o perfil de diversidad genética, pudiéndose aplicar a estudios de estructura y dinámica de poblaciones en ecosistemas digestivos. Los resultados obtenidos evidencian que cada tratamiento ocasiona un patrón de bandas estable y repetible del grupo de Bifidobacterias. A partir de DGGE se obtienen dendogramas utilizando como fundamento el índice de similitud Dice y el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). Además, se analizan los índices de diversidad (enriquecimiento, Shannon y

Evenness) derivados del perfil de bandas de DGGE en función de las dietas experimentales o de la sección intestinal muestreada en ratas.

3.- Estudio *in vitro* de la interacción con las bacterias intestinales.

3.1 Reconocimiento molecular por receptores de membrana en microorganismos probióticos, comensales y patógenos intestinales.

Los estudios se han llevado a cabo con bacterias probióticas (*B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 y *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103), comensales (*Bifidobacterium longum* CECT 7347, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* IATA-A2, *Bifidobacterium bifidum* CECT 7365, *Bacteroides fragilis* [IATA-SAE2, -CAQ2, -CBS1, -CAR1] y *Escherichia coli* [IATA-CBL2, -CBM1, -CBD10, -CCD2]) obtenidas de individuos sanos y patógenos intestinales (*Salmonella entérica* CECT 443 y *Listeria monocytogenes* CECT 935) de colección. Los microorganismos, crecidos en medios de cultivos específicos durante 20 h, se aislaron por centrifugación (1.500 x *g* / 5 min) y se lavaron (x3) con una disolución tampón de fosfato (PBS) (pH 7). Las células se incubaron (37ºC/30 min) con una disolución de fluoresceína (75 μM) y se lavaron con PBS. Posteriormente, las células se resuspendieron a una concentración de aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml (densidad óptica $0.5_{\lambda 600}$ nm) en PBS. Las suspensiones bacterianas se mezclaron con los GOS-Lactulosa (0.3% p/v), descritos en apartados anteriores de la presente solicitud, y se incubaron (37ºC/1h) en placas de 96 pocillos con mucina (Tipo II) inmovilizada. La inmovilización de mucina se llevó a cabo incubando (4ºC/24h) las placas con una disolución (0.5 mg/mL) de mucina (Tipo II) en PBS. El grado de reconocimiento molecular e interacción de los GOS-Lactulosa con las bacterias intestinales se evaluó conforme a los criterios detallados en la descripción de la invención.

3.2 Efecto in vitro en la respuesta inflamatoria intestinal.

El efecto de los GOS-Lactulosa en la producción de biomarcadores pro-inflamatorios se evaluó en cultivos de células intestinales de origen humano (Caco-2) ampliamente aceptadas como modelo de epitelio intestinal al presentar las características de los enterocitos humanos maduros.

En los experimentos las células Caco-2 se sembraron a una densidad inicial de 5 $x10^4$ células/cm^2 y se crecieron durante 5 días, con cambios de medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium) cada 2 días.

En los estudios se utilizaron cultivos de 20h del patógeno invasivo intestinal de colección - *Listeria monocytogenes* CECT 935 - crecido en caldo Brain-Heart. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se lavaron con una disolución tampón de fosfato (PBS) (pH 7). Se prepararon suspensiones bacterianas, por duplicado, equivalentes a 10^8 ufc/mL y sólo una de ellas se mezcló con los GOS-Lactulosa (0.3% p/v). Las mezclas se incubaron (37ºC/95%CO_2/3h) con el cultivo celular y posteriormente se obtuvo (9300 x *g*/10 min) el sobrenadante.

La respuesta inflamatoria en las células intestinales se monitorizó mediante la cuantificación de la concentración de factor de necrosis tumoral (TNFα) e interleucina (IL)- 1β. La cuantificación de TNFα e IL-1β se llevó a cabo en alícuotas (100 µL) del sobrenadante mediante técnicas ELISA (eBiosciences, sensitividad 4 pg/mL) según las indicaciones del fabricante.

4.- Estudio *in vivo* de la actividad inmunomoduladora.

El estudio se llevó a cabo en ratas (Wistar) macho en crecimiento que se distribuyeron aleatoriamente en distintos grupos (n=15) a las que se administró: i) dieta control, ii) la dieta control + 1 % GOS-Lactulosa + 0.2 % Cr_2O_3 (marcador no digestible), y iii) la dieta control + 1 % carbohidratos prebióticos comerciales + 0.2 % Cr_2O_3, durante un período de 14 días. Tras el periodo de tratamiento los animales se sacrificaron previa anestesia (40 mg pentobarbital sódico / kg peso corporal) y se diseccionó el intestino, cuyas secciones se recogieron en un medio crioprotector para el RNA y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido.

En las muestras homogeneizadas (Tissue lyser, Qiagen) se extrajo el contenido total de RNA utilizando un kit comercial (RNA mini kit, Qiagen) para este fin, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A partir de alícuotas (1 µg) de RNA se obtuvo el cDNA mediante reacción de la transcriptasa reversa (AMV Reverse Transcriptase, Promega). Posteriormente, con técnicas de PCR en tiempo real se monitorizó los cambios en la expresión (mRNA) de biomarcadores del control homeostático de la inflamación y respuesta inmune. Los biomarcadores monitorizados incluyeron interleucinas (IL) pleiotrópicas (IL-6, -10 y -15), el factor

de transcripción nuclear kappa B -NFκB y de necrosis tumoral alfa (TNFα), para los cuales se diseñaron secuencias cebadoras (primer) utilizando las bases de datos del GenBank (NCBI).

5

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos derivados de lactulosa (glicosil-fructosas) para su uso como ingredientes alimentarios con actividad prebiótica e inmunomoduladora.

2. La combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos según la reivindicación 1 caracterizada porque es obtenible a través de un procedimiento que comprende realizar una reacción de transgalactosilación de lactulosa catalizada por β-galactosidasa procedente de *Aspergillus oryzae*.

3. La combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos según la reivindicación 1 caracterizada porque es obtenible a través de un procedimiento que comprende realizar una reacción de transgalactosilación de lactosa catalizada por β-galactosidasa procedente de *Aspergillus oryzae* y posterior isomerización química del derivado de lactosa obtenido.

4. La combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos según las reivindicaciones 1-3 caracterizada porque la citada actividad inmunomoduladora se produce al aumentar la población de bifidobacterias y/o inducir la expresión de biomarcadores implicados en el control homeostático de la inflamación y activación del sistema inmunológico.

5. La combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos según las reivindicaciones 1-3 caracterizada porque la citada actividad prebiótica se produce en el intestino grueso de un sujeto tras la ingesta de una dosis de la citada combinación en al menos un 1% p/p durante al menos 14 días.

6. La combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos según las reivindicaciones 1-3 caracterizada porque presentan una supervivencia digestiva de hasta un 100% en el intestino grueso de un sujeto tras la ingesta de la citada combinación.

7. La combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos según las reivindicaciones 1-3 caracterizada porque tras la ingesta de la citada combinación se produce en el intestino grueso del sujeto la fermentación completa de la misma.

8. La combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos según las reivindicaciones 1-3 caracterizada porque tras la ingesta de la citada combinación se produce un efecto prebiótico aumentando la concentración de las bifidobacterias en el intestino grueso del sujeto respecto a dicha concentración de las bifidobacterias antes de la ingesta.

9. La combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos según la reivindicación 8 caracterizada porque el efecto prebiótico también conduce a un aumento de la biodiversidad de bifidobacterias del intestino grueso del sujeto respecto a dicha biodiversidad de bifidobacterias antes de la ingesta.

10. La combinación de galacto-oligosacáridos bioactivos según las reivindicaciones 1-3 caracterizada porque produce un efecto inhibidor en la colonización de las bacterias patógenas del intestino del sujeto.

FIG. 1

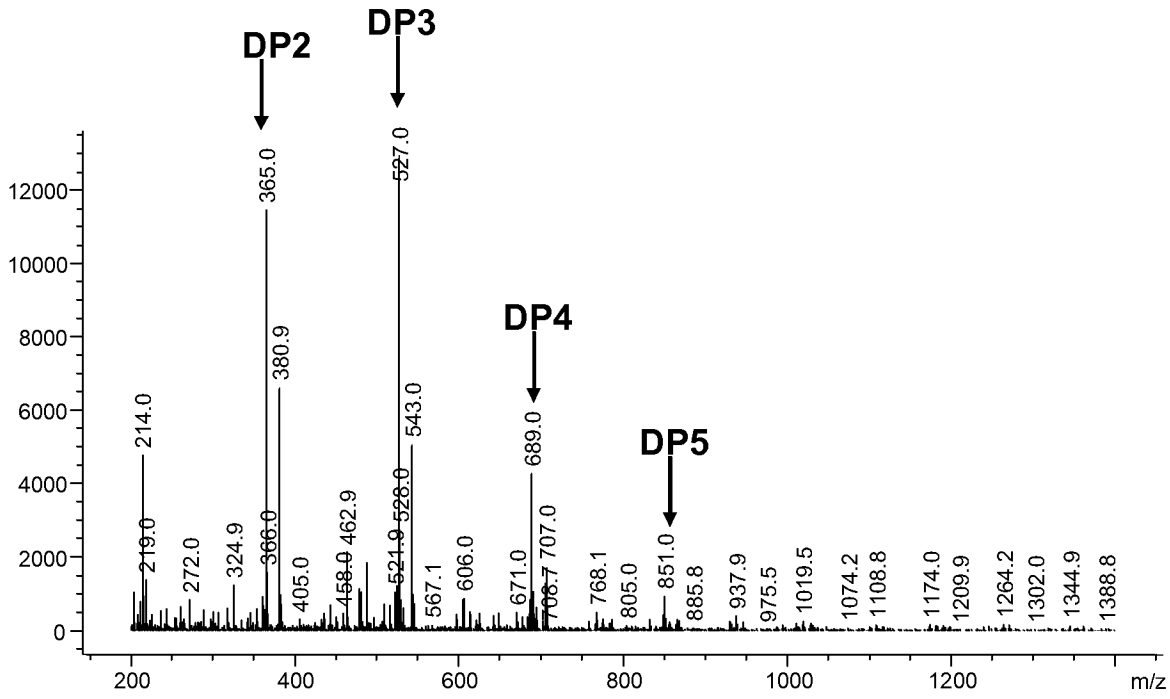

DP2
DP3
DP4
DP5
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
200
400
600
800
1000
1200
m/z
214.0
219.0
272.0
324.9
365.0
366.0
380.9
405.0
458.0
462.9
521.9
526.0
527.0
543.0
567.1
606.0
671.0
689.0
706.7
707.0
768.1
805.0
851.0
885.8
937.9
975.5
1019.5
1074.2
1108.8
1174.0
1209.9
1264.2
1302.0
1344.9
1388.8

FIG. 2

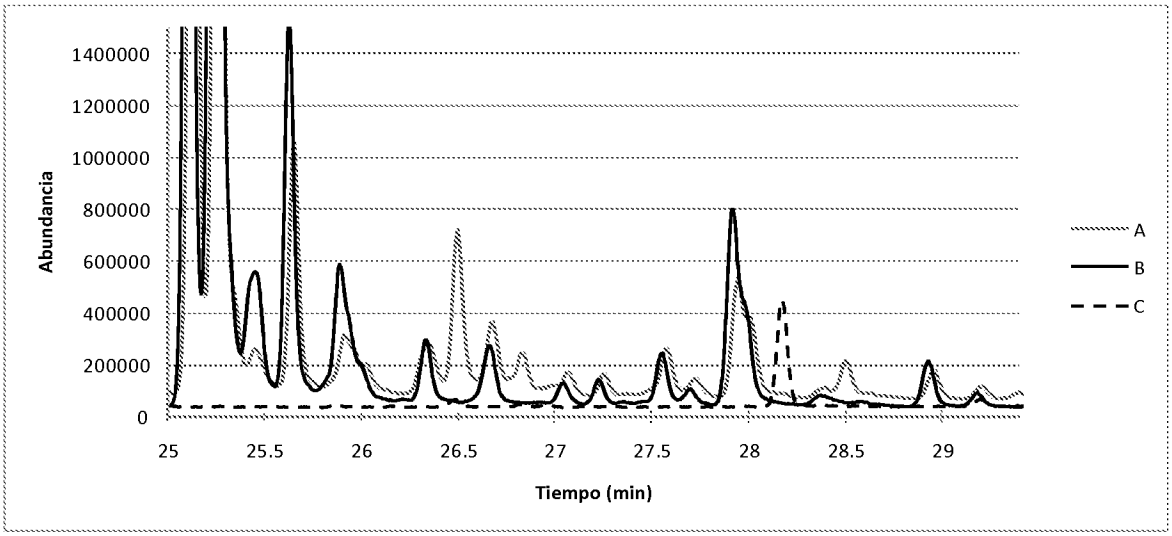

1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
Abundancia
25
25.5
26
26.5
27
27.5
28
28.5
29
Tiempo (min)
A
B
C

FIG. 3

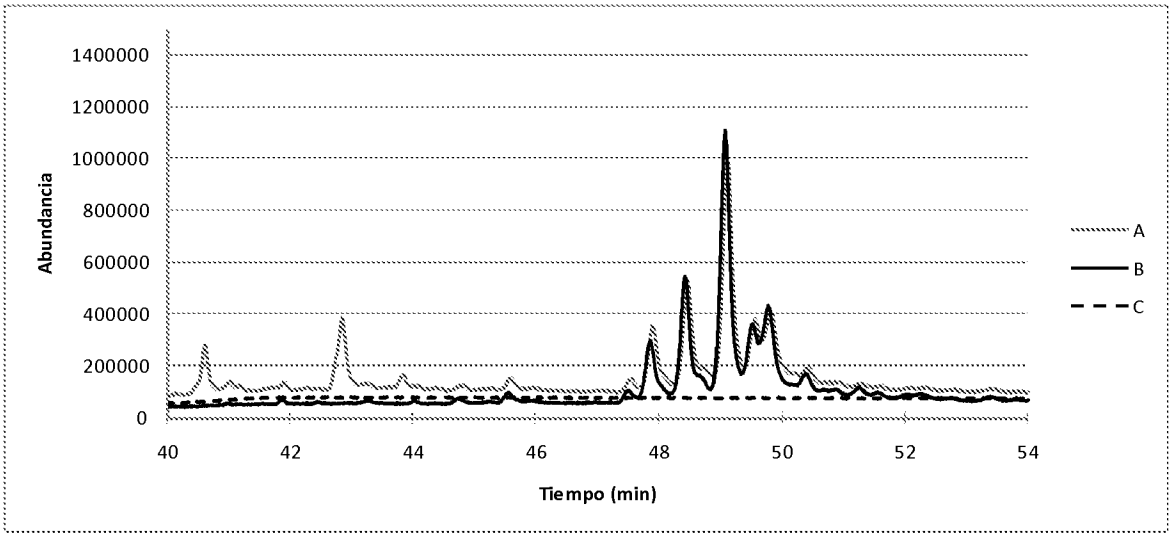

1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
Abundancia
40
42
44
46
48
50
52
54
Tiempo (min)
A
B
C

FIG. 4

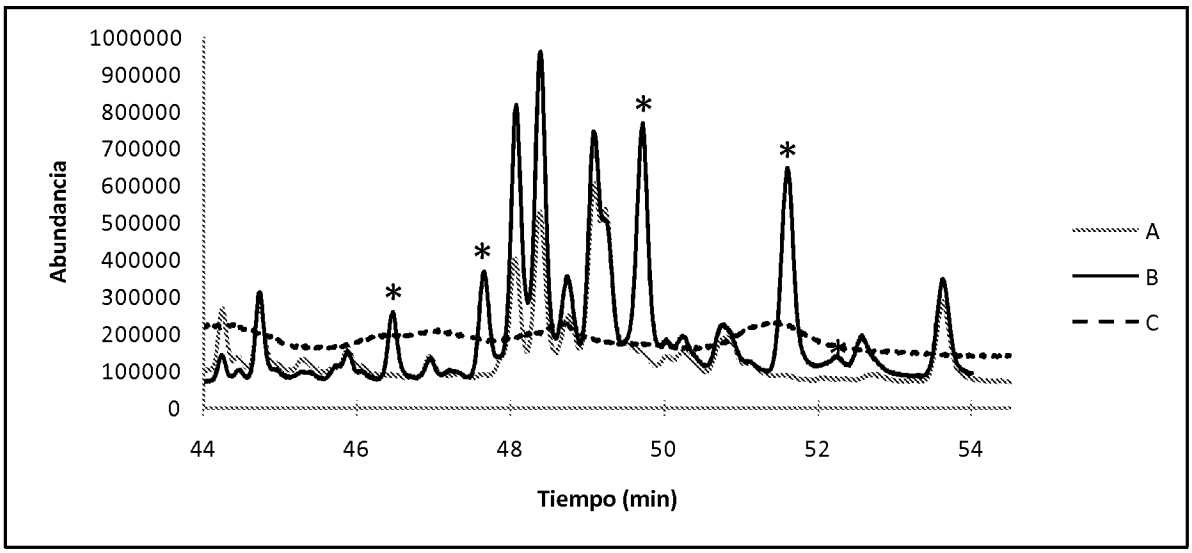

1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Abundancia
44
46
48
50
52
54
Tiempo (min)
A
B
C

FIG. 5

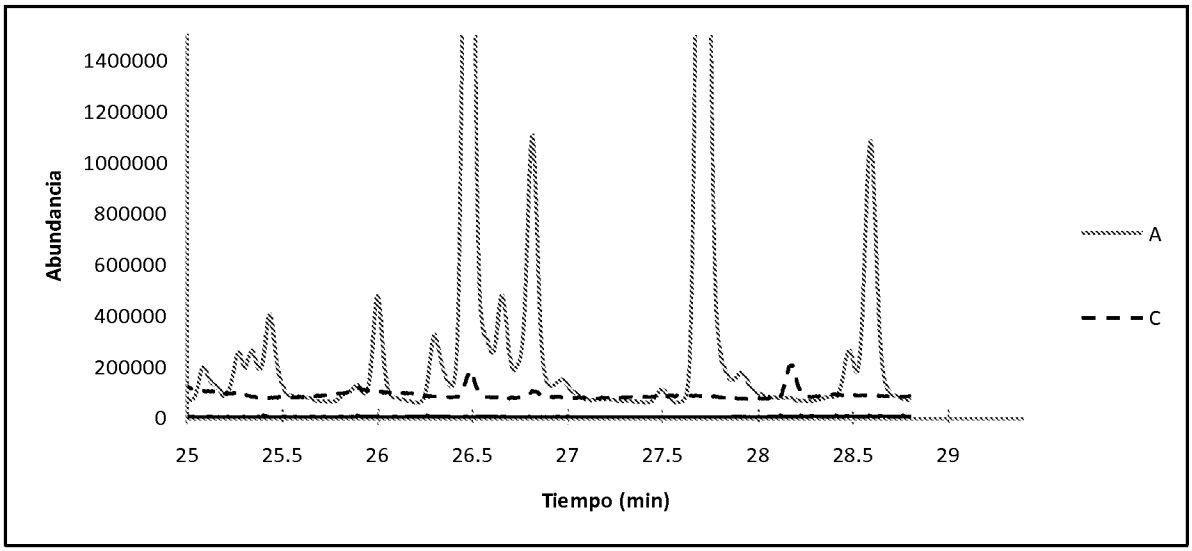

1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
Abundancia
25
25.5
26
26.5
27
27.5
28
28.5
29
Tiempo (min)
A
C

FIG. 6

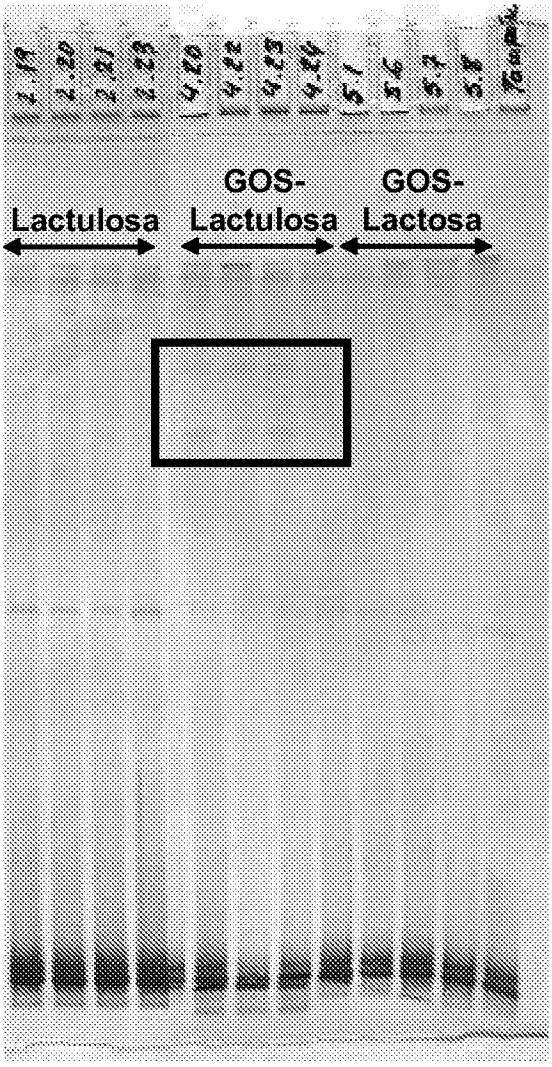

GOS-
Lactulosa
GOS-
Lactosa

FIG. 7

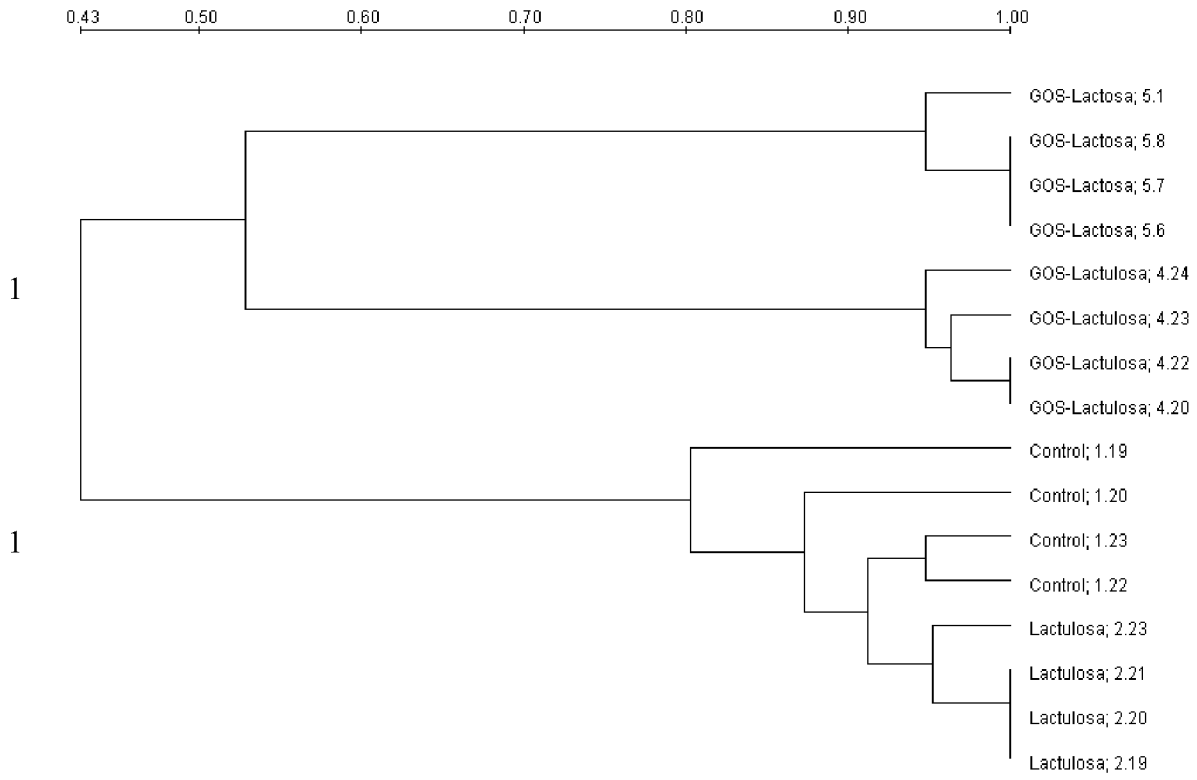

0.43
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
GOS-Lactosa; 5.1
GOS-Lactosa; 5.8
GOS-Lactosa; 5.7
GOS-Lactosa; 5.6
GOS-Lactulosa; 4.24
GOS-Lactulosa; 4.23
GOS-Lactulosa; 4.22
GOS-Lactulosa; 4.20
Control; 1.19
Control; 1.20
Control; 1.23
Control; 1.22
Lactulosa; 2.23
Lactulosa; 2.21
Lactulosa; 2.20
Lactulosa; 2.19

FIG. 8

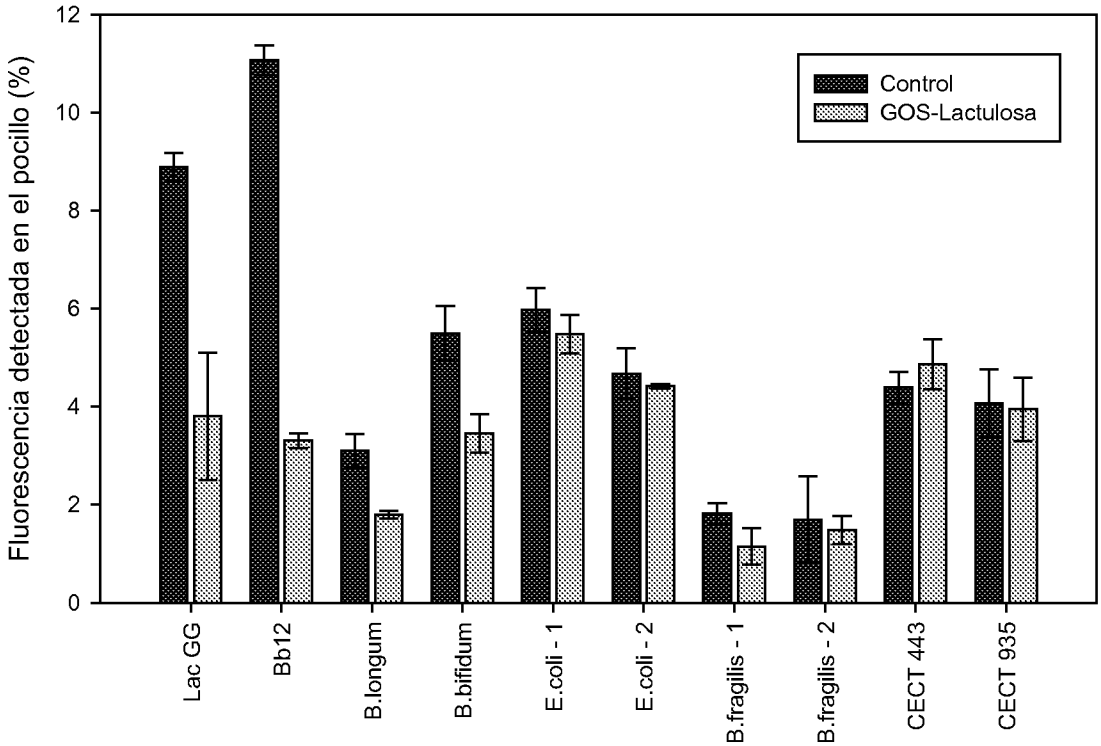

Fluorescencia detectada en el pocillo (%)
0
2
4
6
8
10
12
Control
GOS-Lactulosa
Lac GG
Bb12
B.longum
B.bifidum
E.coli - 1
E.coli - 2
B.fragilis - 1
B.fragilis - 2
CECT 443
CECT 935

FIG. 9 A

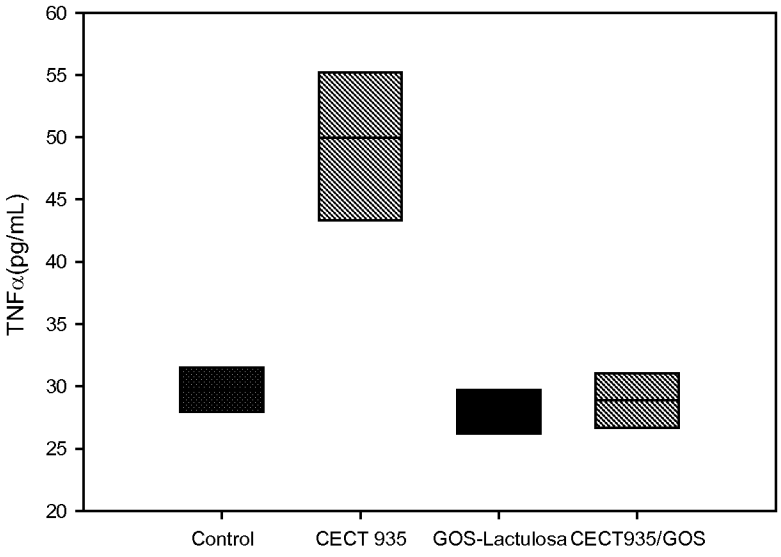

TNFα(pg/mL)
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Control
CECT 935
GOS-Lactulosa
CECT935/GOS

FIG. 9 B

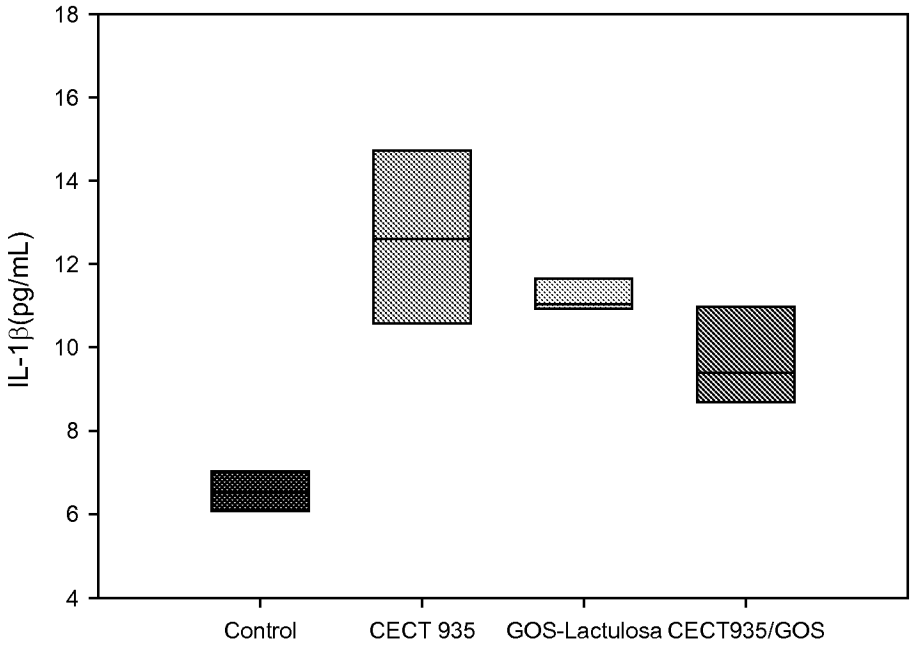

18
16
14
12
10
8
6
4
IL-1β(pg/mL)
Control
CECT 935
GOS-Lactulosa
CECT935/GOS

FIG. 10

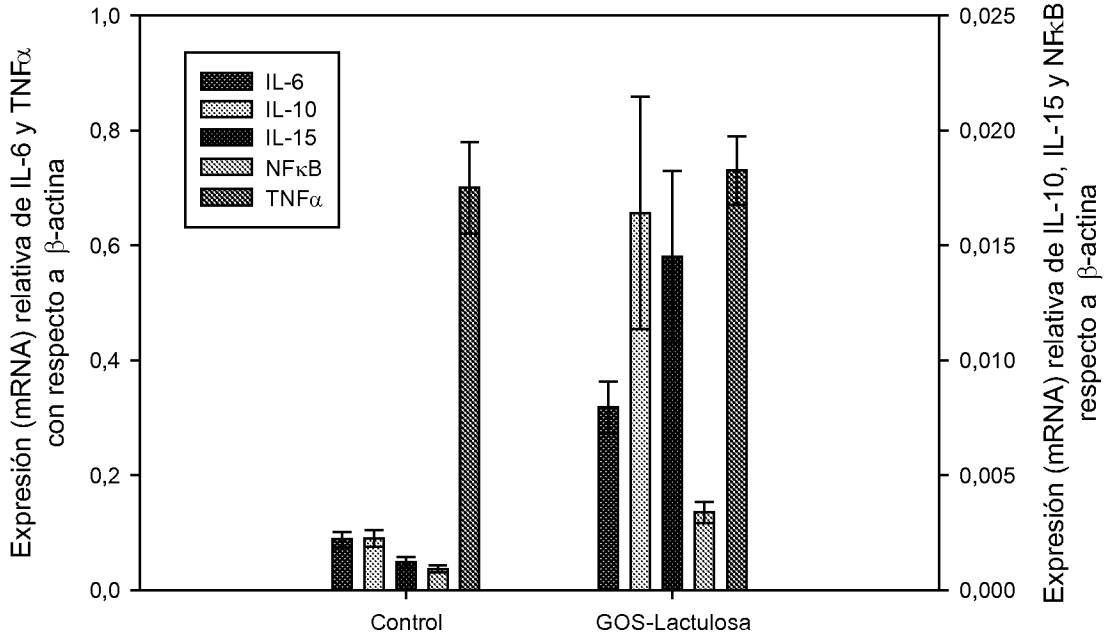

1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0,000
IL-6
IL-10
IL-15
NFκB
TNFα
Expresión (mRNA) relativa de IL-6 y TNFα con respecto a β-actina
Expresión (mRNA) relativa de IL-10, IL-15 y NFκB respecto a β-actina
Control
GOS-Lactulosa

FIG. 11

Tabla 1. Identificación por GC-MS de la fracción de disacáridos y trisacáridos de los GOS-Lactulosa.

Disacáridos
lactulosa
1,1-galactobiosa + 1,4-galactobiosa E
1,5-galactosil-fructosa 1
1,3-galactobiosa E + 1,2-galactobiosa E + 1,5-galactosil-fructosa 2
1,4-galactobiosa Z + desconocido
1,3-galactobiosa Z + 1,2-galactobiosa Z
1,6-glucosil-fructosa 1
1,6-glucosil-fructosa 2
1,3-galactosil-fructosa 1
1,1-galactosil-fructosa 1
1,6-glucobiosa E
1,6-galactobiosa E + 1,1-galactosil-fructosa 2
1,6-glucobiosa Z
1,6-galactobiosa Z
Trisacáridos
6' galactosil-lactulosa 1
6' galactosil-lactulosa 2
1,4-galactosil-[1,1-galactosil]-fructosa

FIG. 12

Tabla 2. Efecto de la dieta control y dietas experimentales (Lactulosa, Gos-Lactulosa y GOS-Lactosa) sobre la composición microbiana en las distintas secciones intestinales (íleon, ciego y colon) de ratas en crecimiento alimentadas durante 14 días

	Dietas				Sección intestinal (SI)			SEM	ANOVA de dos vias*		
Grupos bacterianos (log_{10} número de copias / g de digesta intestinal)	Control	Lactulosa	GOS-Lactulosa	GOS-Lactosa	Íleon	Ciego	Colon		Dietas	SI	Interacción
Bacterias totales	8.511^{a}	8.493^{a}	8.650^{b}	8.609^{ab}	7.055^{A}	9.153^{B}	9.489^{C}	0.022	0.045	<0.001	NS
Bacteroides	7.370	7.404	7.543	7.599	4.881^{A}	8.262^{B}	9.293^{C}	0.049	NS	<0.001	NS
Bifidobacterias	6.207^{a}	7.126^{b}	6.977^{b}	6.499^{ab}	4.760^{A}	7.480^{B}	7.867^{C}	0.116	0.029	<0.001	NS
Lactobacillus	6.520^{ab}	6.297^{a}	6.459^{ab}	6.942^{b}	4.778^{A}	7.341^{B}	7.544^{B}	0.093	NS	<0.001	NS
Grupo Clostridium coccoides / Eubacterium rectale	6.711^{a}	7.018^{b}	7.075^{b}	7.114^{b}	4.562^{A}	8.158^{B}	8.218^{B}	0.044	0.010	<0.001	NS
Subgrupo Clostrodium leptum	6.377	6.308	6.331	6.340	3.740^{A}	7.579^{B}	7.698^{C}	0.043	NS	<0.001	NS
Enterobacterias	6.921^{a}	7.354^{a}	6.971^{a}	6.310^{b}	ND	7.149^{A}	6.629^{B}	0.092	0.003	0.002	NS

^{a,b,A,B} Dentro de cada tratamiento (dieta y sección intestinal) y dentro de cada fila, los valores medios con diferente superíndice difieren significativamente (n=10; test MSD; $P<0.05$).

* Se utilizó una ANOVA de dos vías para evaluar la significancia de los efectos de dieta y sección intestinal, y sus interacciones.

ES 2 392 906 A1

FIG. 13

Tabla 3. Efecto de la inclusión de prebióticos (Lactulosa, GOS-Lactulosa y GOS-lactosa) sobre el porcentaje de Bifidobacterias respecto a bacterias totales en digesta intestinal (íleon, ciego y colon) en ratas en crecimiento tras tratamiento durante 14 días

	Dietas							
	Control		Lactulosa		GOS-Lactulosa		GOS-Lactosa	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Ileon	0.20	0.03	3.96	1.95	3.10	1.84	0.89	0.27
Ciego	3.32[a]	1.51	11.56[b]	2.46	14.64[b]	3.27	3.36[a]	1.10
Colon	4.14[a]	1.89	10.82[b]	2.44	11.86[b]	2.68	3.69[a]	1.49

[ab] Los valores medios dentro de una fila que presenten un superíndice diferente difieren significativamente (n=10; test MSD; P<0.05)

ES 2 392 906 A1

FIG. 14

Tabla 4. Grado de enriquecimiento (definido como número de bandas electroforéticas correspondientes al grupo de Bifidobacterias tras análisis de DGGE), así como los índices de Shannon y Evenness (relativos a la diversidad poblacional) de muestras procedentes de ciego de ratas tratadas con una dieta control, lactulosa, GOS-Lactosa o GOS-Lactulosa tras 14 días de tratamiento.

Muestras		Enriquecimiento (número de bandas electroforéticas)	Índice de biodiversidad Shannon	Índice de biodiversidad Evenness
Control	1.20	10	2.3	0.72
	1.22	9	2.2	0.69
	1.23	10	2.3	0.72
	1.19	8	2.08	0.65
	Media (SD)	9.25 (0.96)	2.22 (0.10)	0.70 (0.03)
Lactulosa	2.19	10	2.3	0.72
	2.20	10	2.3	0.72
	2.21	10	2.3	0.72
	2.23	11	2.4	0.75
	Media (SD)	10.25 (0.5)	2.33 (0.05)	0.73 (0.02)
GOS-Lactulosa	4.20	13	2.56	0.81
	4.22	13	2.56	0.81
	4.23	14	2.64	0.83
	4.24	12	2.48	0.78
	Media (SD)	13 (0.82)	2.56 (0.07)	0.81 (0.02)
GOS-Lactosa	5.1	9	2.2	0.69
	5.6	10	2.3	0.72
	5.7	10	2.3	0.72
	5.8	10	2.3	0.72
	Media (SD)	9.75 (0.5)	2.28 (0.05)	0.71 (0.02)

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201130784

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 16.05.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
X	CARDELLE-COBAS et al. Bifidogenic effect and stimulation of short chain fatty acid production in human faecal slurry cultures by oligosaccharides derived from lactose and lactulose. The Journal of dairy research. Aug 2009. Vol. 76, Nº 3, páginas 317 – 325. ISSN 1469-7629 (Electronic)	1,4-10
X	OLANO A. et al. Lactulose as a food ingredient. Journal of the Science of Food and Agriculture .SEP 2009. Vol. 89, Nº. 12, páginas 1987-1990. ISSN 0022-5142	1-10
X	VERA C . et a l. Determination of t he t ransgalactosylation activity of A spergillus oryzae Carbohydrate research. 01.05.2011. Vol. 346, Nº 6, páginas 745 – 752. ISSN 1873-426X (Electronic)	1-10
A	WO 2010045367 A1 (PEPPER SEVEN UP) 22.04.2010,	1-10
A	EP 2014181 A2 (S I I T S R L SERVIZIO INTERNA) 14.01.2009,	1-10

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
29.10.2012	**J. Manso Tomico**	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/702 (2006.01)
A23L1/29 (2006.01)
A61P1/00 (2006.01)
C07H3/06 (2006.01)

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

A61K, A23L, A61P, C07H

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-10	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-10	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CARDELLE-COBAS et al. Bifidogenic effect and stimulation of short chain fatty acid production in human faecal slurry cultures by oligosaccharides derived from lactose and lactulose. The Journal of dairy research.Aug 2009. Vol. 76, Nº 3, páginas 317 – 325. ISSN 1469-7629 (Electronic)	
D02	OLANO A. et al. Lactulose as a food ingredient. Journal of the Science of Food and Agriculture .SEP 2009. Vol. 89, Nº. 12, páginas 1987-1990. ISSN 0022-5142	
D03	VERA C. et al. Determination of the transgalactosylation activity of Aspergillus oryzae Carbohydrate research. 01.05.2011. Vol. 346, Nº 6, páginas 745 – 752. ISSN 1873-426X (Electronic)	
D04	WO 2010045367 A1 (PEPPER SEVEN UP)	22.04.2010
D05	EP 2014181 A2 (S I I T S R L SERVIZIO INTERNA)	14.01.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un compuesto que comprende galacto-oligosacáridos derivados de lactulosa para su uso como ingrediente alimentario con actividad prebiótica e inmunomoduladora.

La reivindicación 1 define el compuesto por su actividad prebiótica e inmunomoduladora. La reivindicación 2 y 3 define el compuesto por el procedimiento de obtención. Las reivindicaciones 4 y 5 caracterizan la actividad inmunomoduladora y prebiótica respectivamente de la composición. Las reivindicaciones 6-10 caracterizan la combinación por los efectos que produce y por la dosis del mismo que se administra.

D01 divulga la obtención de una mezcla de galacto-oligosacáridos producidos por transgalactosilación y evalúa el efecto bifidogénico de las composiciones obtenidas.

D02 divulga la existencia de procedimientos de obtención de galacto-oligosacáridos a partir de lactosa por el uso de una beta-galactosidasa, así como un procedimiento de obtención de oligosacáridos derivados de lactosa mediante transgalactosidación enzimática y su uso en el desarrollo de nuevas aplicaciones como probióticos.

D03 describe un sistema para la determinación de la actividad de transgactosilación de la beta-galactosidasa procedente de Aspergillus oryzae. Esta actividad se determinó en la síntesis de galacto-oligosacaridos y lactulosa.

Así pues, dado que la combinación de galacto-oligosacáridos derivados de lactulosa ya forma parte del estado de la técnica, aunque no se demuestre explícitamente su actividad inmunomoduladora, la reivindicación 1 relativa al producto carece de novedad. Igualmente las reivindicaciones 2-3 que hacen referencia a la combinación por el proceso de obtención, ya se han divulgado tanto en los documentos D02 como D03, por lo que carecerían de novedad, según se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986. Dado que las reivindicaciones 4-10 caracterizan el producto reivindicado de forma: funcional, o por los efectos que el producto tiene, o por la forma de administración del mismo, no haciendo referencia a características estructurales del mismo, carecerían igualmente de novedad.

Las reivindicaciones 1-10 carecen de actividad inventiva ya que resultan del estado de la técnica de manera evidente para un experto en la materia, según se menciona en el art. 8.1 de la Ley 11/1986.