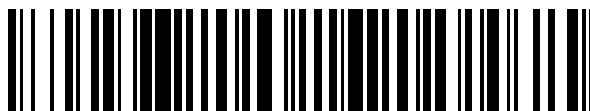


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 022**

51 Int. Cl.:

A23L 1/308 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2002** **E 02799071 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015** **EP 1465505**

54 Título: **Estimulación del sistema inmunitario con polidextrosa**

30 Prioridad:

15.01.2002 FI 20020078

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

02.03.2016

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)

Langebrogade 1, Postboks 17
1001 Copenhagen K., DK

72 Inventor/es:

RAUTONEN, NINA;
APAJALAHTI, JUHA y
TIIHONEN, KIRSTI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 562 022 T3

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

DESCRIPCIÓN

Estimulación del sistema inmunitario con povidexrosa

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de povidexrosa para estimular la respuesta inmune en el tracto gastrointestinal de un mamífero. Además, pero no de forma exclusiva, la invención se refiere a un alimento funcional o composición alimentaria mejorados que comprenden povidexrosa y que tienen un efecto de inmunoestimulación local en el tracto intestinal. En una realización preferente de la invención, la povidexrosa se combina con un poliol, que aumenta el efecto de inmunoestimulación. En un aspecto beneficioso adicional de la invención, la povidexrosa se usa en combinación con un poliol para aumentar la salud intestinal de un mamífero mediante la reducción de los factores que aumentan el riesgo de cáncer de colon.

15 Antecedentes de la invención

La salud y el bienestar de las personas y los animales se pueden ver influenciados de forma positiva o negativa por los microorganismos que pasan y que habitan en el tracto gastrointestinal. Estos microorganismos afectan a la condición fisiológica del hospedador a través de la producción de toxinas, productos secundarios metabólicos, ácidos grasos de cadena corta, y similares.

El lumen intestinal comprende una gran superficie de contacto con el entorno. La función principal del intestino delgado es absorber nutrientes del alimento. Para permitir una absorción máxima de nutrientes, es necesario que la zona de contacto sea grande. La membrana mucosa de todo el intestino humano cubre un área de aproximadamente 200 m². Durante toda la vida pasan a través del intestino aproximadamente 30 toneladas de alimentos y aproximadamente la misma cantidad de bebidas. Sin embargo, además de compuestos dietéticos, la superficie mucosa está expuesta a diversas bacterias, virus, parásitos y hongos. Debido al epitelio de una sola capa que cubre el lumen, este también es una puerta atractiva para patógenos hacia el organismo. El estado del tracto intestinal es un factor significativo en muchas enfermedades (por ejemplo, infecciones, alergias y cáncer).

Muchas bacterias y virus patógenos inicialmente consiguen entrar en el organismo cruzando los revestimientos celulares (epitelios) de los tractos gastrointestinal, respiratorio, o genital. Una clase de anticuerpos especializados, anticuerpos de inmunoglobulina A (IgA), protege estas superficies. Los anticuerpos de IgA son moléculas dimericas o poliméricas producidas por células situadas en los tejidos bajo de las superficies epiteliales. Estas son transportadas por las células epiteliales en secreciones mucosales, en las que entrecruzan o revisten patógenos que todavía no han entrado en el organismo, evitando que los patógenos entren en contacto y se adhieran a las células epiteliales. Por lo tanto, los anticuerpos IgA funcionan en patógenos que están fuera del organismo, y le protegen evitando la entrada en el organismo a través de moléculas de superficies epiteliales. Además, mediante la unión a algunos compuestos dietéticos otros compuestos ambientales, los anticuerpos también pueden evitar reacciones inflamatorias innecesarias en el intestino. Aproximadamente un 80 % de las células que producen anticuerpos en el organismo están situadas en el intestino. Esto refleja tanto la importancia de la función de IgA en la salud intestinal así como la gran superficie que es necesario proteger.

El intestino grueso de mamífero contiene una población sustancial y diversa de bacterias que es importante para la salud de los mamíferos. La microflora beneficiosa en el intestino es capaz de rescatar energía para el hospedador a través de fermentación bacteriana de carbohidratos sin digerir y proteínas para proporcionar ácidos grasos de cadena corta, que a continuación se absorben. Se cree que los géneros beneficiosos, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, las cuales son sacarolíticas, crean condiciones desfavorables para el crecimiento de especies potencialmente patógenas. Por lo tanto, bifidobacterias y lactobacilos son ingredientes en diversos productos probióticos, que se usan para aumentar el número de dichos microbios en el intestino. Por otro lado, se han desarrollado diversos tipos de composiciones de alimento y bebida, que incluyen carbohidratos no absorbibles (oligosacáridos y polisacáridos). Estos se denominan prebióticos y se cree que estabilizan el equilibrio microbiano intestinal a favor de los microbios beneficiosos. Además, se han usado productos de fibra dietética para tratar el estreñimiento y para estimular el movimiento intestinal.

La interacción de microbios intestinales residentes y el sistema inmune aún se desconoce en gran medida. Se sabe que después del nacimiento, el sistema inmunitario intestinal se desarrolla solamente de forma escasa sin microbios. Por lo tanto, se ha mostrado que los índices de células inmunes CD4⁺ y CD8⁺ y células que producen IgA, así como la actividad citotoxicidad disminuyen, o son casi ausentes, en animales sin gérmenes (Rothkötter *et al.*, *Pediatr. Res.* 1991 Mar, 29 (3): 237-42).

Algunos estudios epidemiológicos han mostrado que la ingesta de cereales o fibra de polisacárido que no es almidón reduce el riesgo de desarrollar cáncer de colon. Pero recientemente también se ha informado de resultados controvertidos sobre el papel de las fibras dietéticas en la carcinogénesis de colon. Las fibras podían tener tipos de efectos muy diferentes sobre los factores que aumentan la carcinogénesis. Todas las fibras no necesariamente reducen el riesgo de cáncer de colon. Un estudio comparativo con dietas de cereales (trigo, avena, centeno) e

inulina ha mostrado que una dieta de inulina aumenta la actividad de proteína quinasa C (PKC) y el nivel de proteína PKC $\beta 2$ en el colon distal. Dado que PKC $\beta 2$ media la proliferación de células del colon, y se ha encontrado sobreexpresión de PKC $\beta 2$ en líneas de células de cáncer de colon, se cree que la expresión y la actividad de PKC $\beta 2$ aumentan la carcinogénesis de colon. (A-M. Pajari *et al.*, British J. Nutrition, 8, pp. 635-643, 2000). Además, un estudio comparativo con ratones Min (modelo de cáncer de neoplasia intestinal múltiple) alimentados con diversas dietas, no mostraba efectos de prevención tumoral cuando dos ratones se alimentaban con inulina o carne de res, pero en los ratones alimentados con salvado de centeno o salvado de trigo, se detectaba una reducción significativa de la tumorigénesis (M. Mutanen *et al.* Carcinogenesis, Vol. 21, N° 6, pp. 1167-1173, 2000). Otro estudio comparativo con una dieta baja en colesterol, una dieta con colesterol elevado, y una dieta con colesterol elevado complementada con polidextrosa mostraba que la dieta con polidextrosa disminuía de forma significativa el pH fecal, y reducía la producción de algunos agentes carcinógenos, como indol y p-cresol. (Endo, K. *et al.* Bifidobacteria Microflora, Vol. 10 (1), 53-64, 1991).

La polidextrosa es un polisacárido sintetizado mediante polimerización aleatoria de glucosa, sorbitol y un catalizador ácido adecuado a temperatura elevada y vacío parcial. El término "polidextrosa" se define con mayor detalle en este texto. La polidextrosa se usa ampliamente en diversos tipos de productos alimentarios como un agente de aumento del volumen y como un ingrediente de baja energía, incluyendo el azúcar y parcialmente la grasa. La polidextrosa no se digiere ni se absorbe en el intestino delgado y una gran parte se excreta en las heces. La polidextrosa se ha incorporado en una amplia gama de alimentos que incluyen productos horneados, bebidas, pastelería y postres lácteos congelados. Los efectos beneficiosos de la polidextrosa en el tracto intestinal se han descrito en Am. J. Clin. Nutr. 72, pp.1503-1509, 2000 y en *Bifidobacteria* Microflora, Vol. 10 (1), pp. 53-64, 1991. El documento patente de Estados Unidos N° 5.437.880 (Otsuka Pharma) describe una bebida saludable que contiene polidextrosa; el documento de patente JP 2072842 (Showa Sangyo) describe una bebida y un alimento que contienen polidextrosa como una fibra dietética, y el documento de patente EP 821885 (Raffinerie Tirlemontoise) describe un polvo lácteo que contiene polidextrosa para estimular la función del intestino.

Los efectos beneficiosos de la polidextrosa en el tracto intestinal se conocen bien, pero los inventores de la presente invención han encontrado ahora de forma sorprendente, que la ingesta diaria de polidextrosa estimula de forma muy eficaz del sistema inmunitario en el intestino de un mamífero. Este efecto se ha demostrado mediante niveles de IgA elevados de forma muy significativa. Al mismo tiempo se encontró que la polidextrosa no provoca aumento de los marcadores proinflamatorios, es decir, no se produce aumento del riesgo de inflamación del intestino.

Además, los inventores han encontrado que el efecto de inmunoestimulación de la polidextrosa en el tracto intestinal aumentaba de forma significativa cuando la dosificación de polidextrosa se reforzaba adicionalmente con poliol. El efecto de investigación de la polidextrosa sola o en combinación con un poliol aumenta de forma significativa cuando estos compuestos se incluyen en la dieta diaria durante un periodo de tiempo largo.

Además de los efectos sinérgicamente beneficiosos de la polidextrosa y el poliol en el sistema inmunitario en el intestino, los inventores también han encontrado que el uso de polidextrosa en combinación con un poliol reducen de forma muy significativa la cantidad de aminas biogénicas en el colon, disminuyendo de este modo las sustancias que son productos finales del metabolismo bacteriano de las proteínas. Algunas aminas biogénicas tienen propiedades tóxicas y se sabe que provocan un riesgo más elevado de cáncer de colon. Además, los inventores han encontrado que cuando la polidextrosa se usa en combinación con un poliol, no se proporciona efecto laxante significativo aún que el poliol por sí mismo pudiera haber causado una reacción laxante.

Los polioles son edulcorantes sin azúcar, también denominados alcoholes de azúcar porque parte de su estructura se parece químicamente a la del azúcar y parte es similar a la de los alcoholes. Otros términos usados son alcoholes polihídricos y polialcoholes. Los usados actualmente en alimentos en Estados Unidos son eritritol, hidrolizados de almidón hidrogenado (incluyendo jarabes de maltitol), isomaltitol, lactitol, maltitol, manitol, sorbitol y xilitol. Se usan como sustitutos del azúcar en una amplia gama de productos, que incluyen gomas de mascar, caramelos, helado, productos horneados y frutas para aumentar. También se usan en pastas de dientes, enjuagues bucales, caramelos de menta para el aliento y productos farmacéuticos tales como jarabes para las tos o gotas y pastillas para chupar para la garganta. Muchos polioles, tales como lactitol, sorbitol, xilitol y manitol en dosis más elevadas tienen efectos laxantes. Un alimento para estimular el crecimiento que contiene lactitol y un alimento que contiene lactitol-lactulosa para estimular el crecimiento y la función intestinal de animales se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.760.055 en el documento de patentes EP 0 464 362, respectivamente (ambos cedidos a Valio Meijeri). Una composición farmacéutica que comprende bacterias vivas, sales y no carbohidratos que se pueden adsorber (por ejemplo, polioles) para regenerar la flora intestinal en diarrea o síndrome diséptico se desvelan en el documento WO 00/54788 A1 (Italmed S.N.C.)

Algunos ejemplos del uso combinado de polidextrosa y un poliol incluyen mejoras en el campo de productos de azúcar para procesamiento de alimentos, como se desvela en el documento WO 95/26644 A1 (Worlee Sweet), y en el documento WO 98/34500 A1 (Purac Biochem B.V.), y productos de chocolate bajos en calorías, que contienen alcoholes de azúcar, y polidextrosa como una fibra se desvelan en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.629.040 (Lotte Co Ltd.). Un producto dietético sin "dulce de leche" de sacarosa y azúcar y que incluye poliol (lactitol y sorbitol) y polidextrosa se desvela en una solicitud de patente de Uruguay con el N° de Serie 26.096

(Gabriel Julio Flangini Morales). Algunos postres congelados con calorías reducidas que contienen povidextrosa y polioles se describen en el documento de Patente de Estados Unidos Nº 5.527.554 (Xyrofin Oy), composición de chocolate con calorías reducidas que contiene povidextrosa, maltitol y lactitol se describe en PCT/US00/0024 (Xyrofin Oy) y un artículo de pastelería cocido sin azúcar que comprende povidextrosa y lactitol se describe en el documento EP 452262, (Xyrofin Oy). Una composición edulcorante sin azúcar con calorías reducidas para un producto de pastelería horneado que comprende xilitol y povidextrosa se desvela en el documento de Patente de Estados Unidos Nº 5.098.730 (Danisco Cultor). Otro artículo de pastelería bajo en calorías que comprende un poliol y povidextrosa se describe en el documento JP 61254148 (Ishiwatari K.). El uso de povidextrosa y xilitol como un agente saciante se desvela en la Solicitud de Patente de Estados Unidos de la técnica anterior con Nº de Serie 60/282866. Tomotari Mitsuoka en Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, vol 5, Nº 1, 1996 páginas 2-9, indica que la povidextrosa tiene un efecto beneficioso en el entorno intestinal a través del cambio del equilibrio de la flora intestinal.

Ninguno de los documentos mencionados anteriormente indican ningún efecto de la povidextrosa en el sistema inmunitario del tracto gastrointestinal.

Hasta el momento, los productos alimentarios más funcionales (como prebióticos y probióticos) dirigidos al tracto gastrointestinal se han centrado en la modulación de la función de la motilidad intestinal y en la capacidad de absorbancia, así como en la modulación del equilibrio de la microflora en el tracto intestinal, que desempeña un papel importante en la lucha frente a agentes patógenos.

Se sabe bien que el estado inmunológico de un paciente se podría ver influenciado por la dieta. Se han realizado muchos intentos para desarrollar y mejorar preparaciones de inmunoestimulación, como diversos tipos de productos alimentarios y bebidas, en los que el principio activo se ha variado en diferentes tipos y cantidades de oligosacáridos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, elementos traza y extractos de hierbas, y composiciones de los mismos. Estos productos se han desarrollado para aumentar el estado inmunológico en un paciente de forma general, en vez de en forma local en el intestino.

Sin embargo, existe una necesidad de desarrollar métodos convenientes y eficaces que apoyen de forma específica al sistema inmunitario local en el tracto intestinal, y que sean útiles para estimular el sistema inmunitario del intestino de una manera profiláctica y que también sean útiles para pacientes que padecen inflamación en el tracto gastrointestinal, y para los pacientes que padecen alteración del sistema inmunitario especialmente en el tracto gastrointestinal. Sería especialmente deseable desarrollar productos de suplemento alimentario o dietético, que permitieran una administración segura de sustancias a largo plazo, que estimulen de forma específica al sistema inmunitario en el intestino y que protejan el tracto intestinal frente a la microflora patógena.

Tales productos seguros, sabrosos, y listos para consumo serían también más practicables en un uso profiláctico mediante el fortalecimiento del sistema inmunitario en el tracto intestinal de sujetos sanos, facilitando de este modo la prevención de inflamación grave en un caso de exposición repentina a agentes patógenos, que a menudo se produce, por ejemplo, cuando se viaja a países con menos higiene en la manipulación de alimentos.

La presente invención satisfacer esa necesidad proporcionando un método para la estimulación del sistema inmunitario intestinal de un mamífero con el uso de povidextrosa. La presente invención supera algunas deficiencias de la técnica anterior, proporcionan un método para la mejora de la gestión y prevención de enfermedades entéricas que combinan los efectos beneficiosos ya conocidos del uso de povidextrosa con mejora de las capacidades inmunológicas de un organismo mamífero.

Los presentes inventores han encontrado que la povidextrosa proporciona desplazamiento de inmunomodulación en la comunidad microbiana. Por lo tanto, la povidextrosa se puede usar para normalizar la comunidad microbiana del intestino y para aumentar microbios con efectos positivos en el sistema inmunitario del intestino.

Además, la presente invención también proporciona un método para potenciar el efecto de inmunoestimulación de la povidextrosa en el tracto intestinal mediante la combinación de povidextrosa con un poliol que proporciona una mejor sinérgica del efecto proporcionado solamente por la povidextrosa.

Además de la inmunoestimulación, los inventores de la presente solicitud encontraron de forma inesperada que la povidextrosa, en combinación con polioles, se podía usar además para proporcionar una reducción significativa de aminos biogénicas en el intestino, específicamente en el ciego. Se sabe que las aminos biogénicas provocan un riesgo de cáncer de colon más elevado. La acumulación excesiva de aminos biogénicas, putrescina, espermidina y espermina favorecen la transformación maligna de las células: el aumento de la actividad de ODC (ornitina descarboxilasa) va acompañado por la expresión de varios oncogenes (Wickström, Acta Oftalmol. 70, pp. 506-514, 1991).

Por lo tanto, la presente invención contribuye a la salud y bienestar generales del tracto intestinal al proporcionar un método que no solamente protege de forma eficaz el intestino frente a agentes patógenos y alérgenos dietéticos, sino que también contribuye a la profilaxis del cáncer de colon.

Sumario de la presente invención

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones para fortalecer y mejorar el estado general del intestino de mamífero. Los objetos de la invención se definen con las reivindicaciones adjuntas.

Un aspecto de la presente invención es el uso de povidexosa como un principio activo en la preparación de una composición para estimular el sistema inmunitario del tracto gastrointestinal de un mamífero, que comprende mezclar al menos un excipiente (o vehículo) farmacológicamente aceptable con povidexosa, siendo dicha povidexosa eficaz para aumentar la concentración de inmunoglobulina A (IgA) en el intestino de dicho mamífero.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de povidexosa como un principio activo en la preparación de una composición para estimular el sistema inmunitario del tracto gastrointestinal de un mamífero, que comprende mezclar al menos un poliol con povidexosa, siendo dicho poliol eficaz para aumentar de forma sinérgica la concentración de inmunoglobulina A (IgA) en el intestino de dicho mamífero.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de povidexosa y un poliol para reducir la cantidad de aminas biogénicas en el intestino de un mamífero. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método y una composición para disminuir el riesgo de un cáncer de colon mediante la reducción eficaz de biogénicas aminas.

Los métodos de la presente invención pueden tomar varias formas de realización. Algunos objetos, ventajas y características adicionales de los diversos aspectos de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción siguiente de sus realizaciones preferentes.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1. representa gráficamente concentraciones de IgA en el íleon y en el ciego en diferentes dietas (media $\pm$ SE, N = 12). Un asterisco por encima de la columna indica una diferencia estadística con respecto al control.

La Figura 2. representa gráficamente la comunidad microbiana del ciego en diferentes grupos de alimentación mediante la ilustración de proporciones relativas de bacterias con diferentes porcentajes de guanina más citosina (% de G + C) en su ADN genómico (media de cuatro combinaciones).

La Figura 3. representa gráficamente la correlación entre la concentración de IgA en el ciego y proporción de microbios con % de G + C entre 60-64.

La Figura 4. representa gráficamente la concentración de aminas biogénicas en el ciego de rata (media $\pm$ SE, N = 12).

La Figura 5. representa gráficamente la producción de tiramina después de 24 h de fermentación.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de povidexosa en la preparación de una composición para estimulación del sistema inmunitario local del tracto gastrointestinal de un mamífero, cuya estimulación se demuestra mediante un aumento de la concentración de inmunoglobulina A en el intestino de un mamífero. La presente invención incluye adicionalmente una potenciación del efecto de inmunoestimulación de la povidexosa mediante el uso de povidexosa en combinación con un poliol.

En una realización de la presente invención, una composición de inmunoestimulación se prepara por mezcla de una dosis de povidexosa que es eficaz para aumentar la concentración de inmunoglobulina A en el intestino de un mamífero, con al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.

En otra realización preferente de la presente invención, una composición de inmunoestimulación se prepara por mezcla de al menos un poliol con povidexosa, siendo dicho poliol eficaz para aumentar de forma sinérgica la inmunoglobulina A en el intestino de un mamífero.

En otra realización preferente, algunas cantidades eficaces de povidexosa y poliol se usan para preparar una composición que reduce las cantidades de aminas biogénicas en el intestino de un mamífero.

La povidexosa se puede usar para estimulación del sistema inmunitario local del tracto gastrointestinal de un mamífero, que se demuestra con un aumento de la concentración de inmunoglobulina A en el intestino de un mamífero.

Una dosis eficaz de povidexrosa opcionalmente en combinación con un poliol se puede administrar por vía oral a un paciente con el fin de estimular el sistema inmunitario en el intestino.

En una realización de la invención, la povidexrosa se añade a una comida o alimentos de mamífero.

En otra realización preferente, una dosis eficaz de povidexrosa se usa en la preparación de una composición para estimular la respuesta inmune en el tracto intestinal.

En otra realización preferente, la povidexrosa se añade en combinación con un poliol a una comida o alimentos de mamífero.

En otra realización preferente, algunas dosis eficaces de povidexrosa y poliol en combinación se usan en la preparación de una composición para la estimulación de la respuesta inmune en el tracto intestinal

En otra realización preferente, povidexrosa y poliol se usa en cantidades eficaces para provocar una reducción significativa de aminos biogénicas en el intestino.

En otra realización preferente, algunas dosis eficaces de povidexrosa y poliol en combinación se usan para preparar una composición que provoca una reducción significativa de aminos biogénicas en el intestino.

En la presente invención, el uso de povidexrosa aumenta de forma inesperada la concentración de IgA en el tracto gastrointestinal del mamífero sin inducir al mismo tiempo ningún aumento de los marcadores inflamatorios. Por lo tanto, parece que el efecto de la povidexrosa es del tipo deseado de inmunoestimulación.

El aumento de la concentración de IgA en el proceso de digestión de animales de ensayo es una indicación de aumento de la resistencia frente a agentes patógenos a través de la neutralización de anticuerpos que previenen la adhesión en el epitelio intestinal.

El uso de polioles en combinación con povidexrosa aumenta de forma sinérgica el efecto de inmunoestimulación de la povidexrosa aunque los polioles solos no tienen efecto notable sobre la concentración de IgA. Por lo tanto, se ha encontrado que por ejemplo, el efecto sinérgico para lactitol es aproximadamente diez veces cuando se compara con una dieta de control.

De acuerdo con la presente invención, se indicó que algunos polioles aumentan de forma significativa la producción relativa de butirato en comparación con una dieta de control. El butirato, como tal, se considera beneficioso para el intestino ya que es una importante fuente de energía para colonocitos que regulan el crecimiento y la diferenciación celular. El butirato también es un ácido graso volátil interesante en términos de riesgo de cáncer de colon.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores creen que el efecto sinérgico de la povidexrosa y el poliol pueden estar causados por una combinación de dos efectos diferentes que aumentan la función de las células inmunes intestinales. Por lo tanto, la povidexrosa activa células que producen anticuerpo intestinal, mientras que la fermentación del poliol ofrece energía en forma de aumento de niveles de butirato para las células inmunes del intestino.

Una gran diversidad de polioles se ha sometido a ensayo para su patrón de fermentación en una cementación simulada en el intestino. Todos los polioles sometidos a ensayo aumentaban de forma significativa la producción de ácido butírico en comparación con un poliol que carecía de control.

El uso de povidexrosa y poliol también disminuye las aminos biogénicas totales en el proceso de digestión. Las aminos biogénicas son productos finales del metabolismo bacteriano de proteínas y algunas de ellas tienen propiedades tóxicas. Una reducción de las aminos biogénicas totales reduce el riesgo de cáncer de colon y suprime la fermentación putrefacta en el intestino. La povidexrosa y el poliol aumentan de este modo la función del intestino y reducen los riesgos para la salud que aumentan el bienestar del mamífero en cuestión.

Algunos polioles se conocen porque tienen un efecto laxante más o menos notable que limita comercialmente el uso de polioles en productos comestibles. Por lo tanto, un producto que contiene más de un 10 % de polioles se debería proporcionar con una advertencia de que el producto puede tener un efecto laxante. De acuerdo con la presente invención, se encontró que la povidexrosa suprime de forma significativa el efecto laxante de los polioles y que una combinación de povidexrosa y poliol carece de forma inesperada de un efecto laxante. Esto permitirá el uso de cantidades más elevadas de poliol en alimentos y comidas sin el riesgo de efectos secundarios laxante.

Como se ha mencionado anteriormente, una combinación de povidexrosa y poliol disminuye las aminos biogénicas totales. Sin embargo, de forma sorprendente los niveles de una amina, la tiramina, aumenta al contrario con dicha composición. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores creen que el efecto anti-laxante de la povidexrosa puede estar causado por el aumento de la producción de tiramina en el intestino. Se sabe que la

tiramina es una hormona local que inhibe la motilidad del intestino. Una disminución de la motilidad permite una absorción apropiada de solutos y agua del intestino. Esto aumenta la tolerancia hacia polioles del intestino.

El término "polidextrosa" como se usa en el presente documento es un polímero de glucosa bajo en calorías que es resistente a la digestión con las enzimas del estómago. Este incluye productos poliméricos de glucosa que se preparan a partir de glucosa, maltosa, oligómeros de glucosa o hidrolizados de almidón, o almidón que se polimeriza mediante tratamiento térmico en una reacción de policondensación en presencia de un ácido, por ejemplo, ácido de Lewis, ácido inorgánico u orgánico, incluyendo ácido monocarboxílico, ácido dicarboxílico y ácido policarboxílico, tales como, pero no limitados a los productos preparados con los procesos que se describen en los siguientes documentos de Patente de Estados Unidos N°: 2.436.967, 2.719.179, 4.965.354, 3.766.165, 5.051.500, 5.424.418, 5.378.491, 5.645.647 o 5.773.604, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia.

El término polidextrosa también incluye los productos poliméricos de glucosa preparados mediante la policondensación de glucosa, maltosa, oligómeros de glucosa o hidrolizados de almidón que se han descrito anteriormente en el presente lo que en presencia de un alcohol de azúcar, por ejemplo, poliol, tal como en las reacciones que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N° 3.766.165. Además, el término polidextrosa incluye los polímeros de glucosa que se han purificado con técnicas que se describen en la técnica, incluyendo todas y cada uno de los siguientes, pero no limitados a (a) neutralización de cualquier ácido asociado con los mismos mediante la adición de base a los mismos, o pasando una solución acuosa concentrada de la polidextrosa a través de una resina adsorbente, una resina de intercambio iónico débilmente básica, una resina de intercambio iónico fuertemente básica de tipo II, resina de lecho mixto que comprende una resina de intercambio iónico básica, o una resina de intercambio catiónico, como se describe en los documentos de Patente de Estados Unidos N°s: 5.667.593 y 5.645.647, cuyos contenidos se incorporan por referencia; o (b) decoloración por contacto de la polidextrosa sobre carbono activado o carbón vegetal, mediante suspensión o pasando la solución a través de un lecho de sólido adsorbente o mediante lixiviación con clorito sódico, peróxido de hidrógeno y similares; (c) métodos de tamizado molecular, tales como UF, RO (ósmosis inversa), exclusión por tamaño, y similares; (d) o polidextrosa tratada de forma enzimática o (e) cualquier otras técnicas reconocidas en la técnica que se conocen en la técnica.

Además, el término polidextrosa incluye polidextrosa hidrogenada que, como se usa en el presente documento, incluye productos de poliglucosa hidrogenada o reducida preparados mediante técnicas conocidas por un experto habitual en la materia. Algunas de las técnicas se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N°s: 5.601.863, 5.620.871 y 5.424.418, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia.

Es preferente que la polidextrosa usadas ya básicamente pura. Esta se puede hacer básicamente pura usando técnicas convencionales conocidas por un experto en la materia, tales como cromatografía, incluyendo cromatografía en columna, HPLC, y similares.

Es más preferente que la polidextrosa usada sea pura en al menos un 80 %, es decir, se retira al menos un 80 % de las impurezas. Más preferentemente, es pura en al menos un 85 % o incluso más preferentemente es pura en al menos un 90 %.

El vehículo preferente a mezclar con polidextrosa para proporcionar una composición de inmunoestimulación es un poliol.

El término "poliol" se refiere a hexitales tales como sorbitol y manitol, y pentitales tales como xilitol. El término también incluye alcoholes polihídricos en C4 tales como eritritol o alcoholes polihídricos en C12 tales como lactitol o *maltitol*. La expresión composición de poliol se refiere a una composición de dos o más polioles. Tales composiciones se diferencian preferentemente de forma notable de las composiciones que surgen en la preparación industrial de polioles tales como sorbitol. Son preferentes las composiciones que comprenden al menos dos polioles que tienen un número diferente de átomos de C, en particular la expresión que se refiere a una composición que comprende al menos un hexitol y al menos un pentitol. Especialmente para los piensos, es ventajoso usar mezclas de poliol que se derivan de la producción industrial de polioles puros individuales. Tales mezclas incluyen vertidos o líquidos madre de la cristalización de lactitol, maltitol, xilitol, etc.

Otros excipientes y vehículos útiles en la preparación de la presente composición de inmunoestimulación son comestibles y/o ingredientes nutricionales tales como lactosa, calcio y otros minerales, vitaminas, azúcares y otros componentes incluidos generalmente en composiciones administrarles por vía oral.

La polidextrosa es un ingrediente diseñado para dar los atributos de volumen, textura, sensación en boca y funcionales de los edulcorantes calóricos. Un punto fundamental para la realización de la técnica anterior de la polidextrosa es su valor calórico de 1 caloría por gramo. Por lo tanto, se usa ampliamente como un agente para aumento del volumen con calorías reducidas en los productos alimentarios dietéticos. Varios estudios con fibras dietéticas han mostrado que aumentan la función intestinal y la salud de los mamíferos, porque aumentan el volumen fecal, aumentan la producción de ácidos grasos de cadena corta, disminuye el pH fecal y aumentan el

crecimiento de la microflora favorable (principalmente bifidobacterias) en el intestino. Sin embargo, recientemente también se han informado algunos resultados controvertidos con respecto al efecto de la agencia de las bifidobacterias totales en el intestino. Recientemente se ha encontrado que la inulina, que estimula de forma selectiva las bifidobacterias en el colon, aumenta algunos factores que están asociados con el desarrollo de cáncer de colon (A-M. Pajari *et al.*, British J. Nutrition, 8, pp. 635-643, 2000, M. Mutanen *et al.* Carcinogenesis, Vol. 21, Nº 6, pp. 1167-1173, 2000). De acuerdo con la presente invención se ha indicado que una abundancia de bifidobacterias también puede causar efectos fisiológicos menos deseables tales como enfermedades bacterianas entéricas e inmunosupresión.

Los presentes inventores han encontrado de forma sorprendente que la administración de polidextrosa, especialmente cuando se administra en combinación con un poliol, aumenta de forma muy significativa la respuesta inmune en el intestino. La polidextrosa (y poliol) causaba un desplazamiento de la comunidad microbiana en el intestino y aumentaba el crecimiento de microbios con un efecto positivo en el sistema inmunitario del intestino. Por lo tanto, la polidextrosa se puede usar por ejemplo para equilibrar la comunidad microbiana en el intestino después de tratamientos antibióticos u otras alteraciones. Además, los estudios revelaban que la administración de la polidextrosa y un poliol también reducían las aminas biogénicas en el ciego, que se sabe que aumentan el riesgo de cáncer de colon.

Además de los efectos sinérgicos beneficiosos de la polidextrosa y el poliol en el tracto intestinal, los presentes inventores encontraron que la administración combinada de la polidextrosa antagonizar los efectos laxantes de un poliol. Como se sabe bien, el uso de los polioles a menudo está limitado por los efectos secundarios laxantes indeseables.

Además, otro efecto beneficioso del aumento de la producción de IgA es la prevención de alergias causadas por componentes dietéticos. Aunque la secreción de IgA al lumen intestinal modula la presentación de antígenos dietéticos para limpiar las células inmunes, el aumento de la producción de anticuerpos puede prevenir el contacto entre alérgenos dietéticos potenciales y células inflamatorias, y por lo tanto aliviar la inflamación alérgica.

Sin desear limitarse a sí mismos a teoría específica alguna, los presentes inventores concluyen que esta reducción del efecto laxante del poliol cuando se combina con polidextrosa puede estar causado por el nivel elevado de tiramina en el intestino, que se encontró en los experimentos. Dado que el uso de los polioles a menudo está limitado por sus efectos laxantes no deseados, la presente invención también proporciona un método para uso de polioles seguro a largo plazo sin los efectos secundarios laxantes no deseados.

Los datos de la presente invención revelan de forma inesperada de las bacterias con un % de G + C entre 50-69, por lo tanto más probablemente bifidobacterias, se correlacionan de forma negativa con las respuestas de IgA (Figura 3.). Esta zona es característica de bifidobacterias. Parece que la abundancia relativa de las bifidobacterias disminuía con una dieta combinada de polidextrosa-lactitol, y también con una dieta de polidextrosa. Se reivindica que las bifidobacterias como grupo son beneficiosas. Sin embargo, recientemente se informado también de los lados controvertidos relacionados con el efecto de la abundancia de las bifidobacterias totales en el intestino. En conexión con la presente invención, se ha indicado que una abundancia de bifidobacterias puede causar también efectos fisiológicos menos deseables tales como enfermedades bacterianas entéricas e inmunosupresión. El procedimiento de formación de perfiles de % de G + C microbiano siguió las etapas que se describen en Apajalahti *et al.* (Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, Nº 10, pp. 4084-4088, 1998). En resumen, las bacterias se separaron de muestras de proceso de digestión con centrifugación diferencial. A continuación el ADN se recuperó de las células bacterianas mediante combinación de lisis física, química y enzimática. A continuación, se formaron perfiles del ADN recuperado basándose en el contenido de guanina + citosina en el ADN de los miembros de bacterias individuales de la comunidad. Los ADN con diferente contenido de G + C se separaron con centrifugación en gradiente de densidad de CSCI y se controlaron mediante bombeo de la solución a través de celda de flujo de UV.

El momento de la administración de la polidextrosa, como un agente de estimulación del sistema inmunitario, ya sea sola o en cantidades eficaces sinérgicas con un poliol no es crítico y se puede tomar basándose en las necesidades individuales. La cantidad eficaz de la polidextrosa para seres humanos es aproximadamente 1 g-100 g/día, preferentemente 5-50 g/día. Considerando las diferencias individuales

Sin embargo, se recomienda un uso diario regular en relación a la ingesta de comida y alimentos y digestión, la polidextrosa debería cubrir un 0,1-10 % de la dieta diaria, preferentemente un 1-5 %, lo más preferentemente un 2-3 %.

En una realización preferente de la presente invención, la polidextrosa con un poliol opcional se proporciona en una composición útil para animales jóvenes o crías de mamífero que se van a destetar. En el momento del destete, el tracto intestinal de la cría tiene una respuesta inmune muy baja y la estimulación de la función del intestino ayuda a estimular la defensa inmune local.

La polidextrosa, ya sea sola o en cantidades eficaces sinérgicas con un poliol, se administra al sujeto en una cantidad eficaz para estimular la respuesta inmune en el tracto intestinal del sujeto. Como se usa aquí, el término

sujeto se refiere a animales, especialmente mamíferos. Algunos mamíferos preferentes incluyen, pero no se limitan al ser humano, animales de compañía mamíferos (como perros, gatos, roedores), animales de granja mamíferos (tales como caballos, cerdos, ganado, ovejas), animales de laboratorio mamíferos y otros animales que tengan un tracto intestinal similar al de los que se han mencionado anteriormente. El mamífero preferente es el ser humano.

La povidextrosa se administra preferentemente a un mamífero en una composición que incluye povidextrosa y un excipiente o vehículo comestible. El vehículo preferente es un poliol que tiene un efecto sinérgico en la povidextrosa, como se ha descrito anteriormente.

La composición se puede preparar de acuerdo con procedimientos convencionales para preparar composiciones farmacéutica, terapéutica o nutricionalmente aceptables. Por lo tanto, la povidextrosa se puede mezclar con el vehículo, por ejemplo con un poliol, y procesar adicionalmente en un producto seco, semiseco o líquido. La povidextrosa y el poliol también se pueden granular para proporcionar un granulado al que se le puede dar forma de comprimido por compresión como tal o con otros excipientes y adyuvantes comunes, o se puede añadir a un alimento o comidas para su administración por vía oral a un mamífero.

La povidextrosa, ya sea sola o en cantidades eficaces sinérgicas con un poliol se puede administrar al sujeto por ejemplo mediante la adición en una comida o alimento, que el sujeto ingiere en el momento de la comida o antes de la comida. El alimento incluye, pero no se limita a, yogur, mantequillas, incluyendo mantequillas de fruta, crema de queso, gelatinas, confitura, conservadas, mermelada, cereales, barras de cereales, pastelería, galletas saladas, postres lácteos, por ejemplo mousse, alimentos congelados tales como helado, sorbete y helados de agua, alimentos infantiles y para bebés, productos horneados, tales como pasteles, galletas, pastas y otros productos alimenticios, en bebidas tales como refrescos, soluciones acuosas, que incluyen agua, leche, bebidas para niños y bebés y similares; jarabes, ingredientes, salsas y postres dulces, en aderezos para ensaladas, mayonesa, mezcla de salsa, salsa barbacoa u otra salsa usada con carne, pescado o aves, salsas usadas para pasta y otros alimentos. La povidextrosa, ya sea sola buen combinación con un poliol se puede formular para una cápsula, comprimido, píldora o similar mediante métodos conocidos en la técnica.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran la invención adicionalmente.

EJEMPLO 1

Ratas Wistar macho de cuatro semanas de edad, divididas en un grupo de control y en un grupo de ensayo, que están formados por 12 ratas en cada grupo, se mantuvieron a una temperatura controlada (27 ± 2 °C) y con un ciclo de luz de 12:12 horas. Los animales tenían acceso libre a comida y agua. Los animales se pesaron una vez a la semana y se calculó su aumento de peso. El grupo de control se alimentó cuatro semanas con una dieta de control (basal) y el grupo de ensayo se alimentó cuatro semanas con la dieta de PDX, que consistía en la dieta de control (basal) complementada con una cantidad de inmunestimulación de povidextrosa, como se describe con más detalle a continuación.

Dieta de control (basal)

Una "fórmula dietética Occidental" de Djouci y Andrieux (1977), se modificó para el ensayo de modo que tuvieron contenido elevado de colesterol, sal y proteína pero bajo en fibra. Por lo tanto, las cantidades de energía que provenían de diferentes fuentes se calcularon como un 32 % de carbohidratos, un 31 % de proteínas y un 36 % de grasas. La dieta de control contenía (% p/p) patatas 38,5, carne picada, 23,3, pan de trigo, 8,1, huevos, 20,4, mantequilla, 1,6, y azúcar, 8,1. Los ingredientes se picaron, se mezclaron y se hornearon en un horno a vapor a 200 °C durante 2-3 horas. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y los siguientes ingredientes se mezclaron (% p/p) en la dieta: mezcla de vitaminas (Altromin International, 1324), 0,87, Colesterol (Sigma) 0,377 y sal (NaCl) 2,0. Las dietas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Los siguientes análisis de los alimentos se realizaron con calorimetría de bomba, espectrometría de emisión de plasma acoplado de forma inductiva y cromatografía de iones: valor calórico de 1550 cal/g, un 34,2 % de materia seca, un 0,91 % de ceniza, 0,64 mg/g de Na, 0,1 mg/g de Ca, 3,2 mg/g de K, 0,2 mg/g de Mg, 1,2 mg/g de Cl y 2,5 mg/g de fosfato. El contenido de grasa dietética en la dieta analizado con un método de AOAC era de un 4,8 %. El perfil de ácidos grasos se analizó mediante cromatografía de gas. La dieta basal tenía un contenido total de ácidos grasos de un 3,5 %, un 1,7 % de ácidos grasos saturados y un 1,8 % de ácidos grasos insaturados. La proporción de los ácidos grasos saturados con respecto a insaturados era de 0,9.

Dieta de PDX

Litesse® (Litesse Ultra, nº de lote V68011 producido por Danisco Cultor America Inc., que es una povidextrosa procesada con acidez y amargura reducidas, se añadió a la dieta basal a una concentración de un 2 % (p/p) que se calculó sobre la base de recomendaciones de ingesta de fibra humana y los requisitos energéticos de ratas. Las recomendaciones de ingesta de fibra para adultos varían entre 25-35 g/día o 3 g/MJ. En rata, las cifras correspondientes son 120 mg/día o 1,47 g/día teniendo en cuenta la diferencia de consumo energético entre rata y

ser humano, 0,49 MJ y 10.47MJ, respectivamente. Basándose en el valor energético de la dieta basal, el consumo de alimentos de una rata era de aproximadamente 40 g/día. A continuación, se diseñó el contenido de la povidexosa complementada en la dieta para que tuviera un nivel moderado de un 2 % (20 g/kg de dieta).

5 Análisis inmunológicos

La IgA se extrajo del producto de digestión del íleon y el ciego y la concentración de IgA se midió en el sobrenadante con un kit de ELISA disponible en el mercado. Los resultados se expresaron como µg de IgA por g de producto de digestión (peso en húmedo).

10 Resultados

Los resultados mostraban que la dieta con povidexosa añadida aumentaba varias veces la concentración de IgA (+345 %, $p = 0,007$), que se puede observar en la Figura 1.

15 EJEMPLO 2

Ratas Wistar macho de cuatro semanas de edad, divididas en un grupo de control y tres grupos de ensayo, que están formados por 12 ratas en cada grupo, se mantuvieron a una temperatura controlada (27 ± 2 °C) y con un ciclo de luz de 12:12 horas. Los animales tenían acceso libre a comida y agua. Los animales se pesaron una vez a la semana y se calculó su aumento de peso. El grupo de control se alimentó cuatro semanas con una dieta de control (basal) y el grupo de ensayo se alimentó cuatro semanas con la dieta de PDX-Poliol, que consistía en la dieta de control (basal) complementada con una cantidad de inmunoestimulación de povidexosa, y polioli como se describe con más detalle a continuación.

25 Dieta de control (basal)

La dieta de control era la misma dieta que la que se ha definido en el Ejemplo 1.

30 Dieta de PDX-Poliol

Litesse® (Litesse Ultra nº de lote V68011, producido por Danisco Cultor Americ Inc.) y lactitol (N125/22459, producido por Danisco Sweeteners) se añadieron a la dieta basal a una concentración de un 2 % (p/p) de cada uno, que se calculó sobre la base de recomendaciones de ingesta de fibra humana y los requisitos energéticos de ratas.

35 Toma de muestras

Se tomaron muestras de producto de digestión de íleon, ciego y colon. Las medidas de materia seca y IgA y los recuentos microbianos y el % de G + C se tomaron de muestras individuales el producto de digestión de íleon y ciego. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso. El pH se midió en el ciego *in situ*. Para análisis histológico e inmunohistológico se tomaron muestras de tejido intestinal del íleon distal y del ciego distal.

Análisis inmunológicos

45 La IgA se extrajo del producto de digestión del íleon y el ciego y la concentración de IgA se midió en el sobrenadante con un kit de ELISA disponible en el mercado. Los resultados se expresaron como µg de IgA por g de producto de digestión (peso en húmedo).

Análisis microbianos

50 Para determinar el número total de microbios presentes en las muestras de producto de digestión del ciego, las células se separaron de los productos de digestión recogidos con un procedimiento de lavado (Apajalahti *et al.* Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64. Nº 10, pp. 4084-4088, 1998). Para hacer el recuento, una muestra de células separadas de cada combinación de producto de digestión del ciego (cuatro por tratamiento, 16 en conjunto) se diluyó de forma apropiada y las células se tiñeron con un colorante de unión de ácidos nucleicos, fluorescente (Molecular Probes) que tenía una absorción a longitud de onda de 490 nm y emisión a 515 nm.

60 Después de la tinción, la cantidad de sucesos por intervalo de tiempo fijo se determinó desarrollando la muestra en citómetro de flujo FACSCalibur (Becton, Dickinson y Company) con parámetros ajustados adecuados para el recuento de microbios. Las células se cuantificaron usando Tubos TrueCount™ de BD incluyendo una cierta cantidad de perlas fluorescentes de tamaño fijo. Durante el análisis, el número absoluto de células en la muestra se pudo determinar por comparación de sucesos celulares con respecto a sucesos de perlas. Los resultados se informaron como células/g del producto de digestión del ciego en húmedo.

65 El procedimiento de formación de perfiles de % de G + C microbiano siguió las etapas que se describen en Apajalahti *et al.* (Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64. Nº 10, pp. 4084-4088, 1998).

Resultados

Quando la povidexosa era un único suplemento añadido en la dieta (véase el Ejemplo 1), la concentración de IgA aumentaba varias veces, +345 % ($p = 0,007$), cuando se comparaba con el grupo de control. Un efecto sinérgico significativo se conseguía cuando en la dieta se añadía una combinación de povidexosa y lactitol, el aumento del nivel de IgA era tan elevado como +996 % ($p = 0,0001$), cuando se comparaba con el grupo de control. Los resultados se muestran en la Figura 1.

La estructura de la comunidad microbiana total se analizó con una técnica conocida como formación de perfiles de un % de G + C. éste mide la composición del ADN de la comunidad microbiana total aislado de muestras de producto de digestión. En este estudio se encontró que la abundancia relativa de diferentes grupos bacterianos cambiaba cuando la povidexosa, o la povidexosa en combinación con lactitol se añadía a la dieta. El cambio más pronunciado se observaba en la abundancia relativa de bacterias con un % de G + C entre 35 y 45. El otro intervalo de % de G + C, en el que se producen los cambios evidentes, era de aproximadamente un 60 % de G + C (Figura 2).

EJEMPLO 3

Ratas Wistar macho de cuatro semanas de edad, divididas en un grupo de control y tres grupos de ensayo, que están formados por 12 ratas en cada grupo, se mantuvieron a una temperatura controlada (27 ± 2 °C) y con un ciclo de luz de 12:12 horas. Los animales tenían acceso libre a comida y agua. Los animales se pesaron una vez a la semana y se calculó su aumento de peso. El grupo de control se alimentó cuatro semanas con una dieta de control (basal) y el grupo de ensayo se alimentó cuatro semanas con la dieta de PDX-Poliol, que consistía en la dieta de control (basal) complementada con una cantidad de inmunoestimulación de povidexosa, y polioli como se describe con más detalle a continuación.

Dieta de control (basal) y dieta de PDX-Poliol

La dieta de control era la misma dieta que la que se ha definido en el Ejemplo 1. y la dieta de PDX-Poliol era la misma tela que se ha definido en el Ejemplo 2.

Toma de muestras

Las muestras de producto de digestión de ciego y colon se dividieron en grupos (3 animales por grupo) para el análisis de aminos biogénicas. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron. El pH se midió en el ciego *in situ*.

Análisis de aminos biogénicas a partir de productos de digestión

Las aminos biogénicas se determinaron a partir de muestras de producto de digestión de ciego. Se añadió heptilamina a las muestras como un patrón interno y las aminos biogénicas se extrajeron con ácido perclórico 0,4 M. Después de centrifugación, las aminos biogénicas en el sobrenadante se derivatizaron con cloruro de dansilo. Los derivados se separaron en una columna C18 de fase inversa usando una mezcla de acetato amónico y acetonitrilo como eluyente, y se detectaron con detector de fluorescencia.

Resultados

El uso combinado de povidexosa y lactitol provocaban una reducción de un 11 % ($p 00,03$) en la suma de todas las aminos biogénicas (Figura 4). Esto indica una reducción de la putrefacción de las proteínas dietéticas y también indica que la abundancia relativa de bacterias de putrefacción (por ejemplo, Clostridia), que por lo general consideran nocivas, disminuye.

Es significativo indicar que el nivel de tiramina se ve básicamente influido por la povidexosa y polioles. Por lo tanto, la povidexosa aumentaba la cantidad de tiramina en comparación con una dieta de control. Por otro lado, el lactitol reducía la cantidad de tiramina. Cuando la povidexosa se usaba en combinación con lactitol, el resultado era de forma sorprendente un aumento de tiramina de un 188 % en comparación con la dieta de control.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los inventores tienen la opinión que el nivel de tiramina más elevado podría explicar la supresión del efecto laxante del lactitol cuando se administra en combinación con povidexosa, ya que se sabe que la tiramina presenta inhibición de la motilidad del colon.

EJEMPLO 4

Se realizó un ensayo de fermentación en lote *in vitro* para confirmar los ensayos realizados *in vivo* en los Ejemplos 1 a 3.

El ensayo se basó en un experimento de fermentación de 24 h realizado con muestras fecales humanas. Las muestras fecales se incubaron en cultivos en lotes de 24 horas a 37 °C a pH 6,9 en condiciones anaerobias que contenían un medio de tampón (sal mineral, elementos traza, vitaminas). El medio se complementó con extracto al 10 % de producto de digestión de ciego de cerdo. La povidex, polioles combinaciones se añadieron al nivel de un 1 % cada uno en los cultivos de ensayo.

Resultados

Todos los polioles aumentaban la producción relativa y absoluta de ácido butírico. El patrón de fermentación es similar para todos los polioles y para las combinaciones de polioles y povidex. La producción de ácido butírico aumentaba de forma significativa en todas las muestras de ensayo en comparación con el control (Tabla 1).

La fermentación de polioles aumenta la producción de butirato, que es una fuente de energía para las células inmunes del intestino. La potenciación muy significativa del efecto de inmunoestimulación de la povidex cuando la povidex se administraba en combinación con un poliol (Ejemplo 2) puede estar causada por el aumento de energía en forma de butirato, que, por otro lado, conduce al aumento de la producción de inmunoglobulina A por las células inmunes del intestino.

EJEMPLO 5

El ensayo *in vivo* del Ejemplo 2 y la fermentación *in vitro* del Ejemplo 3 se repitieron y se midió el nivel de tiramina.

Tabla 1

Producción de SCFA (%) después de 24 h de fermentación.														
	Control		Litesse		Litesse + lactitol		Litesse + sorbitol		Litesse + xilitol		Litesse + maltitol		Litesse + Isomalt	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Ácido acético	66,1	67,1	65,2	52,0	29,9	57,2	61,9	66,2	55,2	45,8	57,9	64,0		
Ácido propiónico	12,8	12,8	9,0	12,4	12,7	10,9	10,6	9,3	11,4	12,6	12,1	12,8		
Ácido isobutírico	1,3	0,6	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	0,6	0,4	0,4		
Ácido butírico	15,1	16,9	23,3	33,8	55,0	29,4	22,9	22,8	31,1	38,6	27,9	21,3		
Ácido 2-met.butírico	0,7	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2		
Ácido isovalérico	0,8	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2		
Ácido láctico			1,1			0,8	2,8							
Ácido valérico	3,1	1,9	0,8	1,1	1,5	1,0	1,0	0,9	1,4	1,9	1,2	1,2		
SCFA Total (mmol/l)	82,4	120,0	160,2	141,3	138,8	172,6	162,1	153,6	122,4	191,6	157,0	158,6		

El ensayo *in vivo* mostraba un aumento significativo del nivel de tiramina con el alimento de polidextrosa y lactitol. Al mismo tiempo, en los animales de ensayo se observó una supresión significativa del efecto laxante que estaba causado solamente por el lactitol.

- 5 La fermentación *in vitro* con varios polioles confirmaba que aparece un aumento de la producción de tiramina similar con una combinación de polidextrosa y lactitol, sorbitol, maltitol e isomaltitol. Por lo tanto, estos polioles producían tiramina en la misma manera que lactitol en combinación con polidextrosa.

10 Parece que la combinación de polidextrosa y poliol aumenta el nivel de tiramina y que este efecto puede representar la influencia laxantes suprimida observada en el ensayo *in vivo*.

EJEMPLO 6 Producto de yogur

15 Se mezcló en seco un 0,7 % de pectina (Grindsted Pectin YF 310) y un 1,0 % de lactitol cristalino y se disolvieron en un 11,0 % de agua, que se había calentado a 80-85 °C. Un 50 % de frambuesas (congeladas), un 18,80 % de polidextrosa (Litesse® Ultra™, producida por Danisco Cultor America Inc.) y un 17,80 % de lactitol cristalino se calentaron a ebullición y después de esto, la mezcla de pectina y lactitol se añadió a la vez que se agitaba bien. Una suspensión de calcio se preparó por disolución de un 0,296 % de una sal cálcica (Lactato cálcico 5 H₂O) en un 5,0 % de agua caliente y a continuación se añadió a la masa de fruta, árabe que se agitaba bien. A continuación, la mezcla se evaporó hasta que se alcanzó el contenido deseado. El pH se ajustó a 3,9 usando solución de citrato sódico, y se añadieron conservantes (sorbato de K al 20 % en p/v, 0,25 %). Para su relleno, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente de 40 °C. La mezcla se dosificó en un yogur hasta una clasificación final de un 15-20 %. La ingesta de uno a dos yogures al día aumentaba la concentración de IgA en el intestino. Los porcentajes se calculan en una base de peso fresco.

25 EJEMPLO 7 Centro de caramelo duro de polidextrosa relleno con xilitol y polidextrosa.

Los ingredientes para un relleno de caramelo duro, un 30,1 % de xilitol cristalino, un 45,1 % de polidextrosa (Litesse® Ultra, producida por Danisco Cultor America Inc.) un 24,8 % de agua se mezclaron en conjunto y a continuación se calentaron hasta un 90,0 % de Sustancia Seca (Aprox. 119 °C). El jarabe resultante se transfirió a una tolva de bomba dosificadora. Los ingredientes para una cubierta de caramelo duro, un 97,0 % de polidextrosa y un 3,0 % de xilitol cristalino se mezclaron en conjunto, se añadió agua al 25,0 % y a continuación la mezcla se calentó a 135 °C. Se añadió aceite de menta c.s., un 0,10 % de aspartamo y un 0,05 % de O acesulfamo K a la masa de caramelo cuando esta se había enfriado a < 100 °C y a continuación la masa se atemperó hasta obtener una textura adecuada para darle forma. El centro de la masa de caramelo se rellenó con el relleno de xilitol/polidextrosa a través de una bomba de dosificación unida a un tubo central a través de la masa de caramelo. Se dejó que los caramelos se enfriaran antes de envolverlos. Los caramelos eran productos sin azúcar adecuados para dietética y para aumentar el nivel de IgA en el intestino. Los porcentajes se calculan en una base de peso fresco.

40 EJEMPLO 8 Ingrediente de dulce de leche

Un 13,9 % de polidextrosa (Litesse® II, producida por Danisco Cultor America Inc.) y un 14,4 % de lactitol cristalino se mezclaron en seco. La mezcla de polidextrosa y lactitol, un 11,8 % de leche evaporada, un 49,8 % de jarabe de maltitol, un 0,5 % de sal, un 0,4 % de GMS, un 0,2 % de lecitina y un 8,8 % de materia grasa se mezcló previamente a 65 °C durante 20 minutos. A continuación la mezcla se horneó a 124 °C. Se añadió un 0,1 % de vainillina, un 0,1 % de aspartamo y aroma. La mezcla se usó para la parte superior de barras de base de chocolate proporcionando un aumento del nivel de IgA en el tracto gastrointestinal. Los porcentajes se calculan en una base de peso fresco.

50 EJEMPLO 9 Chocolate negro

Se fundió un 42,0 % de licor de cacao y un 11,4 % de manteca de cacao. Se mezcló un 32,0 % de lactitol cristalino anhidro (o cristalino anhidro molido) y un 13,8 % de polidextrosa (Litesse® Ultra, producida por Danisco Cultor America Inc.) con licor de cacao, parte de manteca de cacao y vainillina. La mezcla se refinó hasta el tamaño de partícula requerido, se dio textura a 60 °C hasta 24 horas y se añadió el resto de la manteca de cacao. Se añadieron lecitina y aspartamo una hora antes del final del proceso de texturización. El chocolate era sin azúcar y era adecuado para diabéticos y para aumentar la IgA en el intestino. Los porcentajes se calculan sobre una base de peso fresco.

60 EJEMPLO 10 Pastel de Madeira

Un 18,03 % de huevos frescos enteros y un 15,72 % de agua se colocaron en el cuenco de una mezcladora planetaria. A continuación se añadió un 20,73 % de lactitol cristalino, un 5,21 % de polidextrosa (Litesse® II, producida por Danisco Cultor America Inc.), un 22,53 % de harina de repostería tratada con calor, un 1,60 % de leche desnatada en polvo, un 1,10 % de albúmina de huevo secada por pulverización, un 0,90 % de levadura en polvo, un 0,60 % de sal, un 0,06 % de acesulfamo K y una proporción de grasa elevada de un 13,52 %, se mezcló a velocidad 1 durante 30 segundos, y se raspó hacia abajo. Después de esto, la mezcla se mezcló a velocidad 2

durante 1,5 minutos y se rasgó hacia abajo. Otra vez más, se mezcló a velocidad 2 durante un periodo adicional de 1,5 minutos hasta que se consiguió una densidad relativa de 0,7-0,75. La masa se depositó en moldes de papel en bandejas para hornear 11b y se horneó durante 30 minutos a 200 °C. La torta era útil para aumentar la IgA en el intestino sin ningún efecto laxante. Los porcentajes se calculan en una base de peso fresco.

5 Especialmente, el efecto sinérgico muy significativo de las dos sustancias se mostraba claramente con los experimentos.

10 Las proporciones preferentes que se han descrito anteriormente en el presente documento con respecto a polidextrosa y lactitol también se pueden aplicar a la mezclas de la polidextrosa con otros polioles.

A menos que se indique lo contrario, los porcentajes son porcentajes de peso. Además, los pesos proporcionados son pesos en seco, es decir, excluyendo el peso del vehículo, que puede estar presente.

15 Las realizaciones y ejemplos precedentes mencionados anteriormente se proporcionan para ilustrar el alcance y el espíritu de la presente invención. Estas realizaciones y ejemplos serán evidentes para los expertos en la materia de otras realizaciones y ejemplos. Estos otras realizaciones y ejemplos están dentro de la consideración de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. El uso de povidexrosa en la preparaci3n de una composici3n para estimular el sistema inmunitario del tracto gastrointestinal de un mamífero, que comprende mezclar al menos un excipiente o vehículo farmacológicamente aceptable con povidexrosa, siendo dicha povidexrosa eficaz para el aumento de la concentraci3n de inmunoglobulina A (IgA) en el intestino de dicho mamífero.
2. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 1, en la que dicho excipiente comprende un poliol.
3. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 2, que comprende mezclar povidexrosa con un poliol, siendo dicho poliol eficaz para aumentar de forma sinérgica la concentraci3n de inmunoglobulina A (IgA) en el intestino de dicho mamífero.
4. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 3, que comprende mezclar povidexrosa con lactitol, siendo dicho lactitol eficaz para aumentar de forma sinérgica la concentraci3n de inmunoglobulina A (IgA), aumentando el efecto de dicha povidexrosa.
5. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 2, en la que dichos povidexrosa y poliol son además eficaces para reducir las cantidades de aminas biogénicas en el intestino.
6. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 2, en la que dicha povidexrosa además es eficaz para suprimir el efecto laxante de dicho poliol.
7. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 1 o 2 en las que dicha povidexrosa además es eficaz para equilibrar o normalizar la comunidad microbiana del intestino.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en las que dicho mamífero se selecciona entre el grupo que comprende seres humanos, animales de compaía mamíferos, animales de granja mamíferos, animales de laboratorio mamíferos, animales de zoológico mamíferos.
9. El uso de la reivindicaci3n 8, en la que dicho mamífero es un mamífero joven en edad de destete.
10. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 1 o 2, en las que dicha composici3n se prepara en forma de una preparaci3n que se puede administrar por vía oral seleccionada entre el grupo que comprende producto alimentario seco, semiseco o líquido, un comprimido, una píldora, un chicle o comprimido masticable, un polvo, una pulverizaci3n, un jarabe, un sustituto del azúcar, un caramelo o golosina, un producto lácteo, un producto lácteo congelado, un alimento para animales de compaía, un pienso, y similares.
11. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 1 o 2, en las que dicha povidexrosa es povidexrosa hidrogenada.
12. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 1 o 2, en las que dicha povidexrosa está purificada.
13. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 2, en la que dicho poliol se selecciona entre el grupo que comprende lactitol, xilitol, maltitol, sorbitol, isomaltitol.
14. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 2, en la que dicho poliol es lactitol o xilitol.
15. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 14, en la que dicho poliol es lactitol.
16. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 1, en la que se incorpora povidexrosa en una composici3n para administrar por vía oral.
17. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 2, en la que se incorpora povidexrosa en combinaci3n con poliol en una composici3n para administrar por vía oral.
18. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 17, en la que se incorpora povidexrosa en combinaci3n con lactitol en una composici3n para administrar por vía oral.
19. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 2, en la que la proporci3n de peso de poliol con respecto a povidexrosa varía de aproximadamente 1:10 a 10:1.
20. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 19, en la que la proporci3n de peso varía de 1:5 a aproximadamente 5:1.
21. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 20, en la que la proporci3n de peso es aproximadamente 1:1.

22. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que la povidexrosa se añade a un producto alimentario en cantidades eficaces para estimular el sistema inmunitario del tracto gastrointestinal de un mamífero, cuando el alimento que contiene la misma se administra al mamífero.
- 5 23. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el poliol y la povidexrosa se añaden a un producto alimentario en cantidades eficaces sinérgicas para estimular el sistema inmunitario del tracto gastrointestinal de un mamífero, cuando el alimento que contiene los mismos se administra al mamífero.
- 10 24. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el poliol y la povidexrosa se añaden a un producto alimentario en cantidades eficaces sinérgicas para reducir las aminos biogénicas en el ciego de un mamífero, cuando el alimento que contiene a los mismos se administra al mamífero.
- 15 25. El uso de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en las que se añade povidexrosa a dicha composición en una cantidad eficaz para equilibrar o normalizar la comunidad microbiana de un mamífero después de un tratamiento con antibiótico u otra alteración del intestino.
- 20 26. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la povidexrosa es povidexrosa no hidrogenada, povidexrosa hidrogenada, o povidexrosa no hidrogenada o povidexrosa hidrogenada, que se ha sometido a purificación o una mezcla de las mismas.
- 25 27. Una composición administrable por vía oral que comprende al menos un excipiente o vehículo farmacológicamente aceptable y povidexrosa en una cantidad suficiente para aumentar la concentración de inmunoglobulina A (IgA) en el intestino de un mamífero, para uso en la estimulación del sistema inmunitario del tracto gastrointestinal de dicho mamífero.
- 30 28. La composición de la reivindicación 27, que comprende povidexrosa y poliol, proporcionando dicho poliol una potenciación sinérgica de la inmunoestimulación de povidexrosa.
- 30 29. La composición de la reivindicación 27 o 28, en las que dicha povidexrosa es povidexrosa purificada y dicho poliol se selecciona entre el grupo que consiste en lactitol, sorbitol, maltitol, xilitol e isomaltitol.
- 30 30. La composición de la reivindicación 27 o 28, que es un alimento nutricional o un pienso.
- 35 31. La composición de la reivindicación 27 o 28, que está en forma de un producto seco, semiseco o líquido para mamíferos jóvenes en destete.

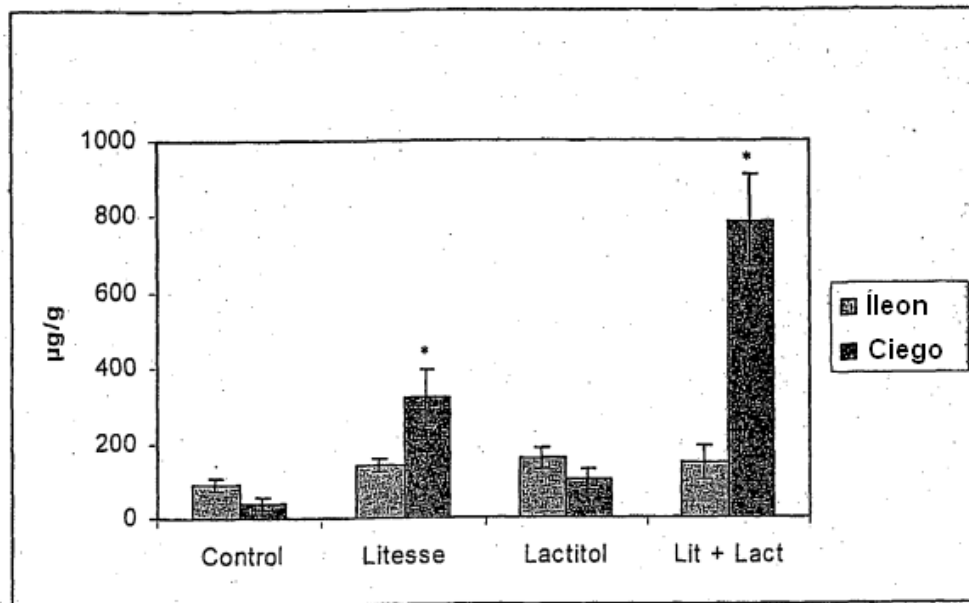


Figura 1.

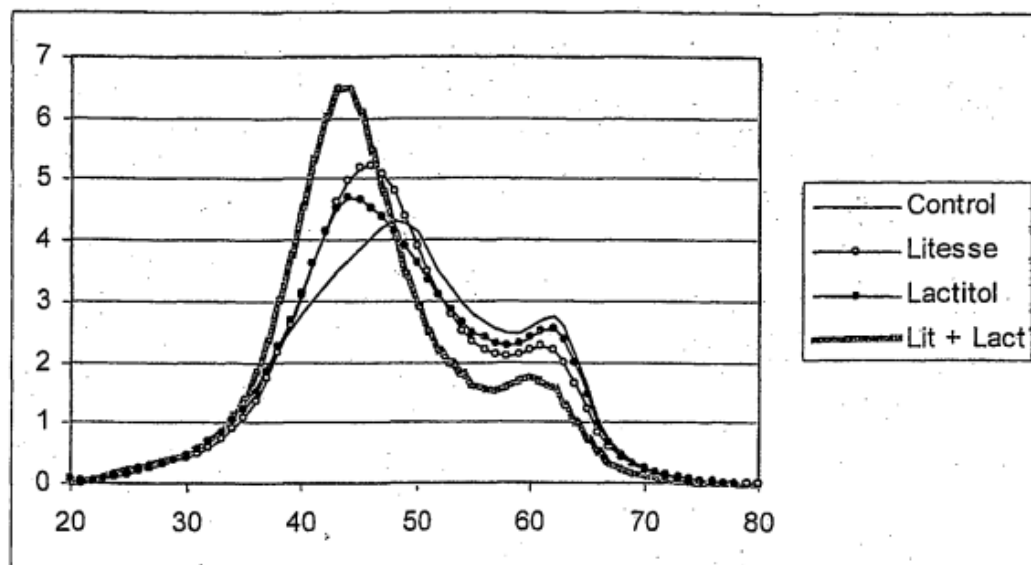


Figura 2.

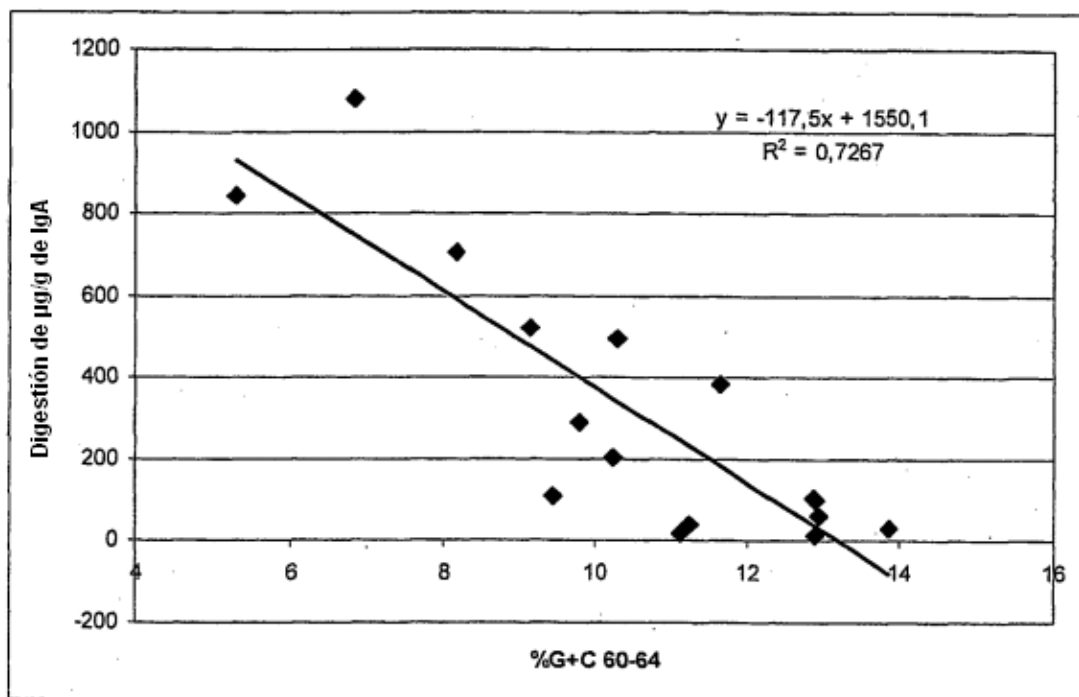


Figura 3.

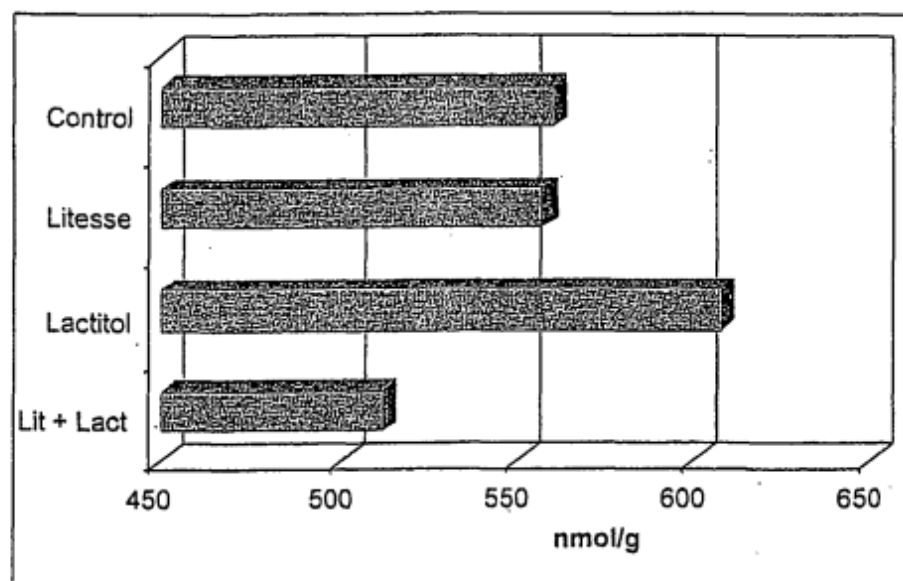


Figura 4.

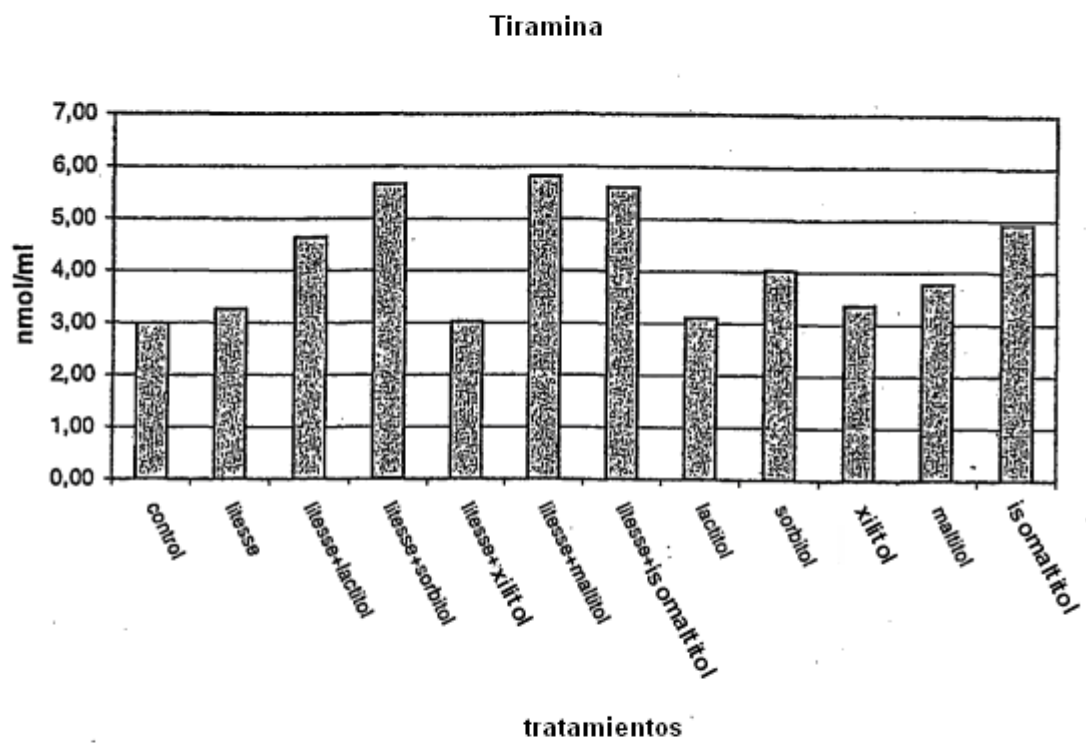


Figura 5.