

(11) Número de Publicação: **PT 2076271 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/702 (2011.01) **A61K 31/715** (2011.01)
C07H 3/06 (2011.01) **C08B 37/00** (2011.01)
A61P 1/12 (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2007.10.01**

(30) Prioridade(s): **2006.10.02 EP 06076810**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.07.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.09.14**
230/2011

(73) Titular(es):

FRIESLAND BRANDS B.V.
STATIONSPLEIN 4 3818 LE AMERSFOORT NL

(72) Inventor(es):

JAAP DE SLEGETE NL
GIJSBERTUS KLARENBEEK NL
HAYDN ROBERT SINCLAIR GB

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS PT
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

(54) Epígrafe: **INIBIÇÃO DE TOXINAS DA CÓLERA POR GALACTO-OLIGOSSACÁRIDOS (GOS)**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO DIZ RESPEITO A COMPOSIÇÕES NUTRICIONAIS E FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO GALACTO-OLIGOSSACÁRIDOS (GOS) NÃO DIGERÍVEIS E SEUS USOS. EM PARTICULAR, A INVENÇÃO REFERE-SE AO USO DE ESPÉCIES DE GOS NA PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE DOENÇA CAUSADA POR TOXINAS BACTERIANAS. É PROPORCIONADO O USO DE GOS TENDO UM GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DE 5 OU SUPERIOR, PREFERIVELMENTE 6 OU SUPERIOR, PARA O FÁBRICO DE UMA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL OU FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE UMA DOENÇA AGUDA OU CRÔNICA ASSOCIADA COM OU CAUSADA PELA ADESÃO E/OU CAPTAÇÃO DE UM MEMBRO DA FAMÍLIA DA TOXINA DA CÓLERA. É TAMBÉM PROPORCIONADO UM MÉTODO PARA PROPORCIONAR UMA FRAÇÃO DE GOS CAPAZ DE INIBIR A LIGAÇÃO DA TOXINA DA CÓLERA (CTX) AO GM1 E FRAÇÕES OBTENÍVEIS POR ESSE MEIO.

RESUMO**"INIBIÇÃO DE TOXINAS DA CÓLERA POR GALACTO-OLIGOSSACÁRIDOS (GOS)"**

A invenção diz respeito a composições nutricionais e farmacêuticas compreendendo galacto-oligossacáridos (GOS) não digeríveis e seus usos. Em particular, a invenção refere-se ao uso de espécies de GOS na prevenção ou tratamento de doença causada por toxinas bacterianas. É proporcionado o uso de GOS tendo um grau de polimerização de 5 ou superior, preferivelmente 6 ou superior, para o fabrico de uma composição nutricional ou farmacêutica para o tratamento ou prevenção de uma doença aguda ou crônica associada com ou causada pela adesão e/ou captação de um membro da família da toxina da cólera. É também proporcionado um método para proporcionar uma fração de GOS capaz de inibir a ligação da toxina da cólera (Ctx) ao GM1 e frações obteníveis por esse meio.

DESCRIÇÃO

"INIBIÇÃO DE TOXINAS DA CÓLERA POR GALACTO-OLIGOSSACÁRIDOS (GOS)"

A invenção diz respeito a composições nutricionais e farmacêuticas compreendendo galacto-oligossacáridos (GOS) não digeríveis e seus usos. Em particular, a invenção refere-se ao uso de espécies de GOS na prevenção, redução ou por outro lado tratamento de doença causada por toxinas bacterianas.

A infecção intestinal com toxina de *Vibrio cholerae* tem afligido o mundo em desenvolvimento desde à quase 200 anos. *Vibrio cholerae* é transmitido através da via fecal-oral, mais comumente pelo consumo de água e numa menor extensão por alimentos contaminados (*W. H. O. Cholera*, 2004. *Wkly Epidemiol Rec*, **80(31)** (2005) 261-8). Em indivíduos imunocomprometidos e malnutridos, os vibriões sobrevivem através da barreira gástrica e por último colonizam o intestino delgado (Tamplin *et al.*, *Appl Environ Microbiol*, **56(6)** (1990) 1977-80). As recentes eclosões de cólera como consequência do tsunami asiático e do furacão Katrina nos EUA ilustram adicionalmente a importância da gestão da doença.

Não existe contudo nenhum profilático contra a

toxina da cólera e sem tratamento as taxas de casos fatais aumentam 30-50%. O sucesso limitado tem sido alcançado usando dois tipos de Vacinas Orais da Cólera (VOC) ainda que sejam ineficazes contra a estirpe patogénica *Vibrio cholerae* 0139. Além disso, a descoberta de que as estirpes *Vibrio cholerae* que produzem toxina possuem resistência múltipla a fármacos tem implicações significativas sobre o uso de antibióticos como tratamento e estratégia de controlo. Claramente, existe uma urgência para desenvolver tecnologias alternativas para combater a cólera e doenças relacionadas.

Existem muitas toxinas bacterianas que se ligam a gangliósido, um ácido glicosfingolípido, como recetor sobre a superfície celular de células alvos e invadem células alvos por subsequente internalização do complexo toxina-recetor. A mais conhecida destas é a toxina da cólera (Ctx), uma enterotoxina produzida pelo *Vibrio cholerae*, e o seu recetor da superfície celular específico foi identificado como monossialogangliósido gal(beta1-3)galNAc(beta1-4)[ácido siálico (alfa2-3)]gal(beta1-4)glc(beta)1-ceramida (GM1).

A toxina da cólera é uma assembleia hexamérica AB5 consistindo de uma estrutura em anel de cinco subunidades B idênticas (Ctx-B) e uma subunidade A (Ctx-A). Como com muitas outras toxinas bacterianas a atividade catalítica reside em Ctx-A, ainda que a ligação ao recetor e a entrega da toxina à célula alvo sejam mediadas pelo

pentâmero Ctx-B. Pensa-se que a ligação de subunidades B a GM1 da membrana induz uma mudança conformacional na toxina, resultando na entrada da assembleia hexamérica compreendendo a subunidade A tóxica na célula alvo.

Uma subunidade A mostra atividade ADP-ribosil-transferase contra G_{αs}, que é um membro do grupo de proteínas de hidrolisação de GTP, responsável pela regulação de muitos aspectos da função celular (Shah BH., *Exp Mol Med*, **31(2)** (1999) 89-94). G_{αs} regula a atividade de adenilato-ciclase e determina a concentração de cGMP na célula hospedeira. A subunidade A em seguida ADP-ribosila a subunidade alfa de G_{αs}, destruindo a atividade inata de GTPase. Consequentemente o estímulo não pode ser desligado e por isso a adenilato-ciclase continua a produção de cAMP, mantendo a cascata a funcionar.

Normalmente, na ausência de Ctx, um mecanismo de ligar-desligar assegura que G_{αs} seja ativado conforme requerido pela célula em resposta à estimulação de adenilato-ciclase intestinal. Este sistema por conseguinte mantém normalmente a concentração de cGMP suficientemente alta para realizar a sua função (Faruque et al., *Mol Biol Rev*, **62(4)** (1998) 1301-14). A ADP-ribosilação não controlada de G_{αs} resulta num aumento contínuo da atividade de adenilato-ciclase que por último causa a acumulação de altos níveis de cGMP. No intestino os níveis de cGMP afetam os transportadores de sódio e cloreto, causando o desequilíbrio e interrupção iônica no potencial osmótico da

membrana. O efluxo massivo resultante de íões cloreto e bicarbonato no lume do intestino delgado puxa grandes quantidades de água com ele por osmose passiva.

A classe de toxinas AB5 pode ser subdividida em famílias com base na homologia de sequência e tropismo do recetor. Ambas as enterotoxinas toxina da cólera e *E. coli* termolábeis LT e LT-II são estruturalmente relacionadas. A subunidade B de ambas as toxinas tem alta afinidade pela porção oligossacárida de numerosos glicolípidos incluindo GM1. A aderência quer da toxina da cólera quer da enterotoxina lábil por calor de *Escherichia coli* a GM1 presente na superfície de células epiteliais que revestem o intestino é o primeiro passo de uma série que resulta na indução de diarreia aquosa. Ainda que a cólera seja mais severa, ambas podem conduzir à morte como resultado de desidratação severa.

É um objetivo da presente invenção proporcionar composições que são eficazes no tratamento profilático e/ou terapêutico de doenças associadas com toxinas bacterianas patogénicas de *Vibrio cholerae* e *E. coli* enterotoxigénica. Em particular, os inventores presentes dão conta da identificação de compostos que têm utilização como inibidores da adesão de toxina da cólera ao seu recetor GM1 com ideia subjacente de que tendo por alvo a toxina bacteriana podem tornear a resistência a fármaco da estirpe bacteriana.

Surpreendentemente, foi encontrado que certas frações de uma preparação de oligossacárido de grau alimentar não digerível são inibidores altamente eficientes da Ctx-B que se liga ao seu recetor natural. Mais especificamente, as frações enriquecidas em galacto-oligossacáridos (GOS) com um grau de polimerização de cinco ou superior, compreendendo pentassacáridos de GOS (aqui também referidos como DP5) e hexassacáridos de GOS (DP6), foram encontradas como sendo antiadesivos de Ctx-B eficazes prevenindo a ligação de Ctx a GM1 numa célula alvo.

A invenção por conseguinte diz respeito a uma composição compreendendo galacto-oligossacáridos (GOS), em que as espécies de GOS tendo um grau de polimerização de 5 ou superior, preferivelmente 6 ou superior, estão presentes numa quantidade de pelo menos 35% numa base ponderal (% *m/m*), com base na massa seca total de todas as espécies de GOS presentes na composição e em que o conteúdo em penta e/ou hexassacárido de GOS é 2-100% numa base ponderal com base no massa total da composição. É também proporcionado o uso da referida composição de GOS para o fabrico de uma composição nutricional ou farmacêutica para o tratamento ou prevenção de uma doença aguda ou crónica associada com ou causada pela adesão e/ou captação de um membro da família da toxina da cólera.

Num outro aspeto, a invenção diz respeito a um método de fracionamento para o isolamento de uma fração de GOS tendo atividade inibidora de Ctx a partir de uma

mistura de GOS. Também revelada é uma fração de GOS obtenível pelo referido método e o uso da referida fração como antiadesiva de Ctx-B.

É também revelada uma composição, por exemplo uma composição farmacêutica ou nutricional ou um seu concentrado, compreendendo uma quantidade alta de espécies DP5 e/ou DP6 de GOS.

GOS pertence ao grupo de hidratos de carbono não digeríveis que podem ser olhados como fibras dietéticas solúveis, porque eles se ajustam à definição geralmente aceite de fibra dietética incluindo critérios não só bioquímicos mas também nutricionais/fisiológicos ("Food Industry ad hoc Working Group on Dietary Fibre" in *Int. Food Ingred.*, 1 (1994) 46-49). Os GOS têm recebido interesse crescente, porque eles podem promover a proliferação de bifidobactérias e ácido lático bacteriano no intestino humano e por conseguinte aumenta a saúde humana. Os GOS não são apenas caracterizados como pré-bióticos que melhoram a saúde intestinal mas foram também revelados como reduzindo o risco de cancro do cólon. A possível atividade antitumoral de GOS pode ser contabilizada pela possível ação antitumor de butirato, uma das substâncias produzidas a partir dos GOS no cólon.

Os GOS podem ser produzidos enzimaticamente usando a fração D-lactose purificada do soro do leite como substrato (Wallenfels *et al.*, *Adv Carbohydr Chem*, 16 (1961)

239.98). A enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* tem uma atividade catalítica de transgalactosilo sobre lactose resultando na formação de di a octassacáridos constituídos por 1-7 unidades de galactose ligadas a uma molécula de glucose no termo da redução, isto é (galactose)_nglucose, onde n é 1-7 (Matsumoto *et al.*, "Galactooligosaccharides", *in* T. Nakakuki (editor), *Oligosaccharides: production, properties and applications*, Gordon and Breach Science Publishers, Shizuoka, Japão, 1995, p 90-106). Contudo, a síntese enzimática produz misturas de GOS que são frequentemente impuras. Por exemplo, o xarope comercial Vivinal GOS[®] contém apenas 59% de GOS *m.m⁻¹*, com lactose, glucose e galactose a contar para os restantes 41%. De entre as espécies de GOS presentes em Vivinal GOS, os dissacáridos (DP2) e trissacáridos (DP3) são os mais abundantes, representando aproximadamente 33% *m/m* e 39% *m/m*, respectivamente, com base na massa seca total de todas as espécies de GOS. DP4 e DP5 representam cerca de 18% *m/m* e 7% *m/m*. As espécies de GOS tendo um grau de polimerização de seis e superior representam apenas cerca de 3% *m/m* das espécies de GOS em Vivinal GOS. Outras misturas de GOS comercialmente disponíveis são de modo semelhante enriquecidas em espécies de GOS de massa molecular inferior, em particular em di e trissacáridos de GOS. Conforme aqui revelado abaixo, os inventores presentes desenvolveram um método para o fracionamento da mistura complexa de espécies de GOS derivadas do soro do leite. A seguir à remoção de glucose e galactose, a mistura foi separada por cromatografia de permuta iônica. Isto resultou em 15 frações com

um perfil de espécies de GOS diferente, isto é diferindo na abundância relativa de tri, tetra, penta e hexassacáridos de GOS, aqui referidos como DP3, DP4, DP5 e DP6, respectivamente. Com o número de fração crescente, a abundância de DP5 e DP6 foi mostrada a decrescer num modo passo a passo com um aumento simultâneo em DP3 e DP4, indicando um desvio de frações contendo predominantemente DP6-DP5 para frações contendo DP4-DP3.

Foram realizados testes ELISA competitivos em que as frações de GOS foram avaliadas à sua capacidade de inibir a ligação da subunidade B da Ctx a GM1. Isto revelou que as frações de GOS relativamente enriquecidas em pentassacáridos (DP5) e hexassacáridos (DP6) de GOS e tendo uma abundância relativa baixa de DP3 e DP4 são inibidores particularmente potentes da adesão de Ctx. O termo "relativamente enriquecidas" tem a intenção de indicar que a abundância é aumentada quando comparada ao material de partida não fracionado.

As frações de GOS ativas incluíram aquelas compreendendo 15% *m/m* ou mais de DP6 com base na massa seca total de espécies de GOS presentes na fração, correspondendo a pelo menos 15 mg/mL no teste ELISA. Além disso, DP6 estava presente nas frações ativas numa quantidade de pelo menos 40% *m/m* com base em todas as espécies de GOS presentes, correspondendo a pelo menos 40 mg/mL no teste. Sem se desejar ficar limitado pela teoria, as correlações estatísticas entre a constante de inibição de cada fração e

a composição de cada fração determinada usando dados de espetrometria de massa sugerem que DP6 é a mais provável componente inibitória de Vivinal GOS fracionado. Contudo, outras espécies de GOS presentes nas frações activas podem contar para alguma ou toda a atividade observada.

Por conseguinte, a invenção proporciona num aspeto o uso de uma composição da reivindicação 1 ou reivindicação 6 para o fabrico de uma composição nutricional ou farmacêutica para o tratamento ou prevenção de uma doença aguda ou crónica associada com ou causada pela adesão e/ou captação de um membro da família da toxina da cólera. A composição nutricional ou farmacêutica é adequada para a prevenção ou tratamento de doença aguda ou crónica causada por um membro da família da toxina da cólera, em particular doenças diarreicas. Numa incorporação, a doença é causada por toxina da cólera de *V. cholera* (Ctx-B) ou enterotoxina termolábil (LT-B) de *E. coli* enterotoxigénico (ETEC).

Um aspeto adicional da invenção diz respeito a uma composição antiadesiva compreendendo galacto-oligosacáridos (GOS), em que as espécies de GOS tendo um grau de polimerização de 5 ou superior, preferivelmente 6 ou superior, estão presentes numa quantidade de pelo menos 35% *m/m*, mais preferivelmente pelo menos 40% *m/m*, com base na massa seca total de todas as espécies de GOS presentes na composição e em que o conteúdo de penta e/ou hexassacárido nos GOS é 2-100% numa base ponderal com base no massa total da composição. Numa incorporação, a composição

compreende GOS tendo um grau de polimerização de 6 numa quantidade de pelo menos 10% numa base ponderal (% *m/m*), preferivelmente pelo menos 15% *m/m*, mais preferivelmente pelo menos 20% *m/m*, com base na massa seca total de todas as espécies de GOS presentes na composição. Alternativamente ou adicionalmente, uma composição compreende GOS tendo um grau de polimerização de 5 numa quantidade de pelo menos 15% numa base ponderal (% *m/m*), preferivelmente pelo menos 20% *m/m*, mais preferivelmente pelo menos 30% *m/m*, com base na massa seca total de todas as espécies de GOS presentes na composição.

Um aspeto específico diz respeito a uma composição compreendendo desde cerca de 10% *m/m* até cerca de 20% *m/m* de DP6 de GOS, desde cerca de 40% *m/m* até cerca de 50% *m/m* de DP5, sendo o restante DP4 de GOS.

Uma composição de acordo com a invenção pode compreender outros componentes em adição às espécies de GOS, por exemplo um diluente, agente de suporte e/ou compostos de valor nutricional e/ou farmacêutico. Uma composição também pode ser uma composição de GOS concentrada, por exemplo em que todas as espécies de GOS presentes na composição fazem até pelo menos 50% *m/m*, preferivelmente pelo menos 60% *m/m*, mais preferivelmente pelo menos 70% *m/m*, tal como 80% *m/m*, 85% *m/m*, 90% *m/m*, 95% *m/m* ou mesmo 99% *m/m*, com base na massa seca da composição. Além disso, as percentagens relativas acima de DP5 e DP6 numa composição podem aumentar até valores altos. As composições consistindo essencialmente apenas de DP5 e/ou DP6 de GOS

são também abrangidas. Por conseguinte, são proporcionadas composições em que as espécies de GOS presentes consistem de apenas DP5 de GOS, apenas de DP6 de GOS ou uma mistura de DP5 e DP6 de GOS.

Os dados acima ilustram que o próprio fracionamento tem eficácia inibitória de ligação a Ctx aumentada pela concentração de espécies de GOS particulares, isto é penta e hexassacáridos de GOS, que são de outra maneira diluídos na formulação comercial de GOS. O processo proporciona assim um meio rápido e eficaz de remover hidratos de carbono de baixa massa molecular que não têm propriedades pré-bióticas, nutracêuticas e/ou biológicas. A concentração de hidratos de carbono ativos, em particular DP5 e/ou DP6 de GOS, permite preparar uma composição que tem uma atividade mais alta (antiadesiva de Ctx-B) por massa unitária (seca). Uma tal composição é vantajosamente usada no fabrico de formulações farmacêuticas ou nutracêuticas para o tratamento ou prevenção de uma doença aguda ou crónica associada com ou causada pela adesão e/ou captação de um membro da família da toxina da cólera.

Estudos de resposta à dose para determinar a CE_{50} de frações de GOS ricas em DP6 revelaram valores EC_{50} para DP6 no intervalo entre 30 e 42 mg/mL. EC_{50} refere-se à concentração de inibidor que compete por metade da ligação específica e é o mesmo que o valor CI_{50} . A correlação de valores CE_{50} com o conteúdo de DP6 relativo sugere um valor EC_{50} de cerca de 5 mg/mL para DP6.

De acordo com isto, numa incorporação a composição antiadesiva compreende pelo menos 0,5% (m/m), preferivelmente pelo menos 0,7%, mais preferivelmente pelo menos 1,0% de hexassacáridos de GOS. Por exemplo, a referida composição é uma composição líquida compreendendo pelo menos 5 mg/mL de hexassacáridos de GOS, preferivelmente pelo menos 7 mg/mL, mais preferivelmente pelo menos 10 mg/mL.

O uso de vários tipos de oligossacáridos como inibidores de adesão de patogénio a células de mamífero tem sido previamente descrito. Por exemplo, Leach *et al.* (*Antimicrob Agents Chemother*, **49**(9) (setembro de 2005) 3842-3846) revelaram a capacidade de uma globotriose solúvel, monovalente, interferir com a ligação e colonização de *Escherichia coli* uropatogénico.

WO 2005/02766 revela o uso de vários oligossacáridos como inibidores de adesão de patogénio a células de mamífero. Os compostos testados incluíram GOS obtidos comercialmente (Vivinal GOS; vGOS) e oligossacáridos pécticos que foram purificados por ultrafiltração para remover nitratos. Nenhum fracionamento de GOS foi realizado. vGOS foi testado como positivo na inibição de adesão duma estirpe de *E. coli* VTEC (0157:H7). Nem *V. cholera*, nem as suas toxinas, são mencionados em WO 2005/02766.

multivalente de oligossacáridos de α -galactose compreendendo a subunidade α Gal(1 \rightarrow 4) β Gal como inibidor de toxinas tipo shiga (SLT) ligando-se a células que expressam GB3 (glicolípido neutro, globotriaosilceramida Gb3 (α -D-Gal(1 \rightarrow 4) β -D-Gal(1 \rightarrow 4) β -D-Glc(1 \rightarrow 0-ceramida) também conhecida como CD77) na sua superfície celular. SLT é produzida por *E.coli* patogénica. STARFISH é o nome dado a um inibidor oligovalente sintético específico desenvolvido para bloquear a ligação de SLT. É uma molécula sintética construída com pseudo-simetria cinco vezes. O núcleo é uma molécula de glucose funcionalizada na qual são enxertados espaçadores e nas pontas dos espaçadores são colocados 2 trissacáridos idênticos que correspondem ao oligossacárido reconhecido por toxina tipo Shiga. As estruturas de oligossacárido de US 6 224 891 não são relacionadas com hexassacáridos de GOS e são ineficazes como antiadesivos de Ctx-B_x. Isto não é surpreendente considerando a diferença estrutural entre o recetor de SLT (gangliósido Gb3) e o recetor de Ctx (gangliósido GM1).

As composições compreendendo a mistura de espécies de GOS, incluindo estruturas de penta e hexassacárido de GOS, são conhecidas na técnica.

WO 2005/00332 revela uma mistura de 20-85% *m/v* de dissacáridos, 20-35% *m/v* de trissacáridos, 15-25% *m/v* de tetrassacáridos e 10-20% *m/v* de pentassacáridos, e o seu uso para a preparação de um medicamento para a prevenção da adesão de patogénios ou toxinas à parede do intestino.

WO 2004/052121 diz respeito a composições nutricionais compreendendo oligossacárido de GOS e FOS para o controlo de doença inflamatória intestinal e desordens relacionadas. Composições exemplares compreendem GOS tendo 2 a 6 unidades de sacárido. Uma preferência é indicada para composições compreendendo 0-30% em massa de pentassacáridos, mais preferivelmente 2-10%, mesmo mais preferivelmente 7% numa base ponderal. Uma preferência semelhante está expressa em WO 2004/089115 e WO 2005/085781.

Tzortzis *et al.* (*The Journal of Nutrition*, **135** (2005) 1726-1731) avaliaram o potencial prebiótico duma mistura de GOS compreendendo 9,9% de dissacáridos, 23,1% de trissacáridos, 11,55% de tetrassacáridos e 10,45% de pentassacáridos, com base na massa seca total da composição em pó. A mistura inibiu fortemente a adesão de algumas bactérias num sistema de modelo de intestino *in vitro*. Este efeito foi atribuído à fração de dissacárido.

Claramente, uma composição de acordo com a invenção em que espécies de GOS tendo um grau de polimerização de 5 ou superior, preferivelmente 6 ou superior, estão presentes numa quantidade de pelo menos 35% numa base ponderal (% *m/m*) não é revelada ou sugerida na técnica. O forte efeito inibitório de DP5 e/ou DP6 sobre a captação ou ligação de um membro da família da toxina da cólera conforme aqui revelado tão-pouco pode ser derivado da técnica anterior.

A única revelação de um oligossacárido tendo efeito sobre a ação da toxina da cólera é feita por Idota *et al.* (*Biotech. Biochem.*, **59(3)** (1995) 417-419, em que 3-sialil-lactose presente em quantidades significativas no leite humano, é identificada como um inibidor de acumulação de fluido induzida por toxina da cólera em intestinos de coelho.

Tomada em conjunto, a presente descoberta de que as espécies de alta massa molecular de GOS são capazes de inibir a toxina da cólera de se ligar não é revelada ou sugerida na técnica anterior.

Como será claro do anterior, uma composição preferível tem uma abundância relativamente alta de penta e/ou hexassacáridos de GOS. Numa incorporação, a invenção diz respeito a uma composição que é enriquecida por hexassacáridos de GOS. A expressão "enriquecida por" tem a intenção de indicar que a composição foi tratada ou processada por qualquer meio com o objetivo específico de aumentar a concentração das espécies de GOS desejadas. Isto por ser através da concentração global duma composição e/ou através da remoção de estruturas que não sejam dos penta e/ou hexassacáridos de GOS desejados. Por exemplo, com base na quantidade total de estruturas de GOS individuais (*e.g.* espécies de GOS com um grau de polimerização distinto) presentes na composição, a composição compreende pelo menos 7, preferivelmente pelo menos 10, mais preferivelmente pelo

menos 15 (*m/m*) % de GOS tendo um grau de polimerização de seis. Numa incorporação, DP5-6 de GOS representam desde cerca de 15 até cerca de 100% numa base ponderal das estruturas de GOS totais, por exemplo 20%-100%, 25%-90%, 35%-96%, 40%-60%, 50%-75%, 25-100%, 36-100%, 40-100%, 50-100%, 60-100%, 75-100%.

Uma composição tem preferivelmente uma abundância relativamente baixa de trissacáridos de GOS. Por exemplo, entre a quantidade total de estruturas de GOS individuais presentes numa composição, a composição compreende menos do que 10, preferivelmente menos do que 7, mais preferivelmente menos do que 5% (*m/m*) de GOS com um grau de polimerização três. Numa incorporação, uma composição de GOS está essencialmente livre de trissacáridos de GOS.

A abundância relativa de tetrassacáridos de GOS numa composição de GOS aqui proporcionada pode ser menos do que 50, preferivelmente menos do que 45, mais preferivelmente menos do que 40% (*m/m*).

Num aspeto adicional, a composição é essencialmente livre de mono e/ou dissacáridos, em particular galactose e/ou lactose. A lactose pode ser hidrolisada para formar glucose e galactose usando β -galactosidase. Estes monossacáridos podem ser removidos usando cromatografia de permuta catiónica.

Numa incorporação preferida, uma composição da

presente invenção compreende resíduos de galactosilo ligados em beta com um grau de polimerização de seis, em particular hexassacáridos de GOS com ligações $\beta(1-4)$ e/ou $\beta(1-6)$. Hexassacáridos de GOS ligados em beta podem por exemplo ser obtidos a partir duma mistura de GOS que é produzida enzimaticamente a partir de lactose do soro do leite como substrato usando β -galactosidase bacteriana. Por exemplo, β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* tem uma atividade catalítica de transgalactosilo sobre a lactose resultando na formação duma mistura de GOS compreendendo di até octassacáridos constituídos por unidades galactosilo ligadas em beta 1-7. Uma tal mistura é também conhecida no campo como "transgalacto-oligossacáridos", abreviado para TGOS ou TOS.

Preparações de GOS comerciais podem ser usadas vantajosamente para produzir uma composição da invenção. Uma fonte particularmente adequada de DP5 e/ou DP6 de GOS para a prática da presente invenção é o ingrediente prebiótico comercialmente disponível contendo galacto-oligosacáridos comercializados sob a marca registada Vivinal GOS® de Friesland Foods Domo®, Holanda.

Estruturas de GOS individuais podem ser separadas e isoladas a partir duma mistura de espécies de GOS por métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, a nanofiltração pode ser usada conforme descrito em A. K. Goulas *et al.*, *Journal of membrane science*, **209(1)** (2002) 321. Numa incorporação preferida, uma mistura de GOS é fracionada usando

cromatografia de permuta catiónica. Mais preferivelmente, o contra-ião da resina de permuta iónica é potássio (K^+). Conforme aqui exemplificado, a resina de permuta iónica de catião comercializada sob a marca registada UniBead UBK-530 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd, Tóquio, Japão) é particularmente adequada para o fracionamento duma mistura de GOS não tendo atividade antiadesiva de Ctx-B em frações tendo atividade antiadesiva de Ctx-B.

O grau de polimerização em cada uma das frações pode ser determinado usando várias técnicas analíticas conhecidas na técnica, tal como cromatografia de permuta aniónica de alta eficiência com deteção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) ou espetrometria de massa dessorção/-ionização com laser assistida por matriz-tempo de voo (MALDI-TOF) ou usadas em combinação.

Num aspeto adicional, a invenção proporciona um método para proporcionar uma fração de GOS tendo atividade antiadesiva de Ctx-B compreendendo os passos de:

- disponibilização duma mistura de galacto-oligossacáridos (GOS) com variados graus de polimerização;
- remoção facultativa de lactose livre pela conversão da lactose livre da mistura de GOS em monossacáridos (glucose e galactose);
- aplicação da referida mistura de GOS (livre de lactose) à resina de permuta catiónica;
- eluição passo a passo de espécies de GOS tendo um grau crescente de polimerização usando uma fase móvel de

água e recolhendo as frações de eluente separadas cada uma compreendendo espécies de GOS com um grau distinto de polimerização;

- análise de cada fração de eluente ao efeito inibitório sobre a ligação de Ctx a GM1; e
- seleção de uma ou mais frações capazes de inibir Ctx de se ligar a GM1.

A resina de permuta catiónica é preferivelmente Unibead UBK-530 ou um seu equivalente funcional, mais preferivelmente na forma potássica.

EP1352967 reporta um método para a preparação de GOS pela mistura de galactose com uma galactosidase, resultando na formação de GOS, usando uma resina de permuta catiónica para separar a mistura em três frações diferentes. Contudo, em contraste com o método da presente invenção, ela não envolve a eluição/fracionamento passo a passo duma mistura de GOS nas frações individuais contendo espécies de GOS tendo um grau de polimerização crescente. Além disso, o método da EP1852967 é planeado para a separação e concentração de GOS da lactose, e todas as espécies de GOS eluem na segunda fração.

De acordo com a invenção, o efeito inibitório sobre a ligação de Ctx é prontamente determinado usando métodos conhecidas na técnica, por exemplo GM1-competitivo-ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (GM1-ELISA) usando Ctx acoplada a peroxidase de rábano silvestre (Ctx-HRP).

Preferivelmente, a ou as frações selecionadas são capazes de inibir pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 70%, ainda mais preferivelmente pelo menos 80%, como 90-99,9%, da ligação de Ctx a GM1 observada na ausência da referida fração ou frações.

É também revelada uma fração antiadesiva de GOS obtenível pelo método acima descrito. Facultativamente, a fração de GOS obtida pode ser ainda concentrada e/ou purificada, por exemplo para aumentar a concentração de estruturas de GOS antiadesivas de Ctx, tal como hexasacáridos de GOS. Por exemplo, fermento de padeiro pode ser usado para este propósito.

O passo de disponibilização de uma mistura de galacto-oligossacáridos (GOS) com grau de polimerização variado por exemplo compreende a sujeição de permeato de soro do leite ou lactose a transgalactosidação enzimática usando β -galactosidase.

Alternativamente, a referida mistura de galacto-oligossacáridos (GOS) com graus de polimerização variados compreende uma mistura comercial de GOS, por exemplo o xarope de GOS comercializado sob a marca registada Vivinal GOS.

Uma composição da invenção pode existir ou compreender a fração de GOS com propriedades antiadesivas de Ctx obteníveis pelo método acima descrito.

Uma composição da invenção pode além do mais compreender outras componentes benéficas, incluindo oligosacáridos não digeríveis diferentes de GOS. Tem sido mostrado que oligossacáridos sialilados (SOS) não digeríveis de grau alimentar são capazes de inibir a ligação da toxina da cólera ao seu recetor. Numa incorporação, a invenção proporciona uma composição compreendendo penta e/ou hexasacáridos de GOS, compreendendo além do mais SOS de grau alimentar. (Oligossacáridos sialilados não digeríveis)-SOS podem ser isolados de fontes naturais, e.g. de gema de ovo ou produto laticínio. A mistura sialil-oligossacárido comercialmente disponível Sunsial E® de gema de ovo de galinha pode ser usada, a qual contém cerca de 17% de SOS e cerca de 68% de proteína.

Numa incorporação, a composição compreende SOS derivado de leite, em particular leite bovino. Cinco sialiloligossacáridos foram identificados no leite bovino, dos quais 6'-sialil-lactosamina e 3'-sialil-lactose foram os mais abundantes (S. Martin-Sosa *et al.*, *J. Dairy Sci.*, **86** (2003) 52-59).

É notado que as estruturas de SOS são significativamente diferentes das espécies de GOS aqui identificadas como sendo anti-adesivos de Ctx ativos.

É também proporcionado o uso de penta e/ou hexasacáridos de GOS, ou de uma fração de GOS obtinível pelo

método aqui descrito acima para o fabrico de uma composição nutricional ou farmacêutica para a prevenção ou tratamento de doença aguda ou crónica causada por toxina da cólera (Ctx) e/ou enterotoxina termolábil, em particular doenças diarreicas.

É também revelado o uso de penta e/ou hexassacáridos de GOS, ou de uma fração de GOS obtenível pelo método aqui descrito acima, para uma inibição *in vitro* da ligação do membro da família da toxina da cólera, em particular a sua subunidade pentamérica B, ao seu recetor GM1.

O medicamento, composição nutricional ou farmacêutica da invenção pode facultativamente compreender agente de suporte farmacêutico aceitável. Além disso, de acordo com a invenção é proporcionada uma preparação farmacêutica combinada para uso simultâneo, separado ou sequencial para a inibição da adesão de patogénio a células de mamífero, e.g. para o controlo, e.g. tratamento, prevenção ou melhoria de desordens entéricas associadas a bactérias agudas ou crónicas num mamífero que são dependentes da captação mediada por GM1 de toxinas bacterianas.

As composições da invenção facultativamente compreendem aditivos alimentares convencionais, tais como qualquer um de entre emulsionantes, estabilizantes, adoçantes, aromatizantes, agentes de coloração, conservantes, agentes quelantes, agentes osmóticos, tampões ou agentes

para ajustamento do pH, acidulantes, espessantes, texturizantes, e assim por diante.

As composições farmacêuticas e suplementos dietéticos podem ser proporcionados na forma de gel mole, saquetas, pós, xaropes, suspensões líquidas, emulsões e soluções em formas de dosagem convenientes. Em cápsulas moles os ingredientes ativos são preferivelmente dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, tais como óleos gordos, óleo de parafina ou polietilenoglicol líquidos. Podem ser facultativamente adicionados estabilizadores.

A quantidade de penta/hexassacárido de GOS ou fração de GOS ativa incorporada nas composições da invenção pode depender da forma das composições da invenção, e.g. um pó ou uma composição pronta para consumo. As quantidades de penta e/ou hexassacárido de GOS compreendidas em composições de acordo com a invenção estão no intervalo de 2-100% numa base ponderal, por exemplo, desde cerca de 5 até cerca de 95% numa base ponderal, e.g. desde cerca de 15 até cerca de 90% numa base ponderal, com base no massa total da composição.

A quantidade e regime de dosagem das composições da invenção a serem administradas é determinada à luz de vários fatores relevantes incluindo o propósito e maneira de administração, idade, sexo, massa corporal e saúde e condição globais do sujeito individual e da severidade dos sintomas do indivíduo. Quando a composição de acordo com a

invenção é fornecida na forma de uma comida ou bebida, o tamanho adequado da quantidade servida de hexassacárido de GOS pode ser desde cerca de 1 mg até cerca de 20 g, preferivelmente desde cerca de 10 mg até cerca de 10 g, mais preferivelmente desde cerca de 10 mg até cerca de 1 g. É proporcionada numa forma farmacêutica e as doses diárias adequadas dos GOS antiadesivos de Ctx da invenção são até cerca de 250 mg, preferivelmente até cerca de 150 mg, mais preferivelmente até cerca de 100 mg, e otimamente no intervalo de cerca de 1 mg até cerca de 100 mg.

As formas de suplemento farmacêuticas ou dietéticas podem ser feitas por procedimentos de composição convencionais conhecidos na técnica farmacêutica, quer dizer, por mistura das substâncias ativas em conjunto com agentes de suporte e/ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis edíveis, e.g. agentes de enchimento tais como celulose, lactose, sacarose, manitol, sorbitol e fosfatos de cálcio, e ligantes, tais como amido, gelatina, tragacanta, metilcelulose e/ou polivinilpirrolidona (PVP). Aditivos facultativos incluem lubrificantes e condicionadores de fluxo, e.g. ácido silícico, dióxido de silício, talco, ácido esteárico, estearatos de magnésio/cálcio, diluentes de polietilenoglicol (PEG), agentes de desintegração, e.g. amido, carboximetilamido, PVP de ligação cruzada, ágar, ácido algínico e alginatos, agentes de coloração, agentes de aromatização e agentes de fusão. Corantes ou pigmentos podem ser adicionados aos revestimentos de comprimidos ou drageias, por exemplo para propósitos de

identificação ou para indicar diferentes doses de ingrediente ativo.

Facultativamente, as composições de acordo com a invenção podem ser nutricionalmente completas, isto é podem incluir vitaminas, minerais, elementos-traço bem como fontes de azoto, hidrato de carbono e ácido gordo de maneira que elas podem ser usados como a única fonte de nutrição fornecendo essencialmente todas as quantidades diariamente requeridas de vitaminas, minerais, hidratos de carbono, ácidos gordos, proteínas e semelhantes. De acordo com isto, as composições da invenção podem ser proporcionadas na forma de uma refeição completa nutricionalmente equilibrada, e.g. adequada para alimentação oral ou por tubo.

Alternativamente, as composições da invenção podem ser proporcionadas como parte duma refeição, isto é um suplemento nutricional, e.g. na forma de uma bebida para a saúde. Pode ser desejável proporcionar uma composição da invenção na forma de um substituto de refeição baixo em calorias ou outro produto nutricional. Neste caso o substituto de refeição ou outro produto nutricional é preferivelmente baixo em gordura, isto é menos do que cerca de 10% de gordura ou substancialmente livre de gordura, isto é menos do que cerca de 2,5% contribuído por gordura, tal como cerca de 2% de gordura, com base no conteúdo calórico total da composição. Adequadamente, uma quantidade servida única de um substituto de refeição baixo em

calorias terá um valor calórico de menos do que cerca de 1000 cal, e preferivelmente entre cerca de 200 cal e cerca de 500 cal.

As composições da invenção, e.g. produto nutricional baixo em calorias adequado, podem incluir bebida sem álcool, tal como sumo, bebida macia ou à base de soja, ou dispersa em alimentos de qualquer tipo, tal como, barras lácteas, sopas, cereais de pequeno almoço, muesli, rebuscados, tabletes, bolinhos, biscoitos, produtos para barrar o pão, fórmulas infantis, fórmulas pré-infantis, alimentos de desmame, confeitos, doces, biscoitos bem torrados, tal como biscoitos de arroz e produtos lácteos, tal como batido de leite, bebida de iogurte, leite fermentado.

As composições da invenção facultativamente compreendem aditivos alimentares convencionais, tais como qualquer um de entre emulsionantes, estabilizantes, adocantes, aromatizantes, agentes de coloração, conservantes, agentes quelantes, agentes osmóticos, tampões ou agentes para ajustamento do pH, acidulantes, espessantes, texturizantes, e assim por diante.

Num aspeto adicional da invenção é revelado o uso duma fração de GOS ou duma composição da invenção como aditivo alimentar.

Os formatos de produto adequados de acordo com a presente invenção incluem solução, composição pronta para

consumo, e.g. composições prontas para beber, bebida instantânea, comestíveis líquidos, como bebidas não alcoólicas, sumo, bebidas desportivas, bebidas de leite, batidos de leite, bebidas de iogurte ou sopa. Numa incorporação adicional da invenção, as composições da presente invenção pode ser fabricadas e vendidas na forma de um concentrado, um pó, ou grânulos, e.g. grânulos efervescentes, os quais são diluídos com água ou outro líquido, tal como leite ou sumo de fruta, para produzir a composição pronta para consumo, e.g. composições prontas para beber ou bebida instantânea.

Uma composição da invenção pode estar em qualquer forma adequada para administração humana, e em particular para administração em qualquer parte do trato gastrointestinal. A administração entérica das composições da invenção, e preferivelmente administração oral, e administração através dum tubo ou cateter, estão cobertas pela presente invenção.

As composições da invenção podem ser administradas sob a supervisão de um especialista médico, ou podem ser autoadministradas.

Uma composição farmacêutica ou nutricional ou uma comida ou bebida incorporando penta/hexassacárido de GOS de acordo com a invenção podem ser seguramente consumidas por qualquer um. Elas são especialmente recomendadas para qualquer um percebido como estando em risco de doenças,

condições e sintomas relacionadas com toxinas da família da toxina da cólera, por exemplo indivíduos imunocomprometidos e/ou malnutridos.

A invenção também pertence a um método de tratamento e/ou prevenção duma doença associada com ou causada pela captação de um membro da família da toxina da cólera, *e.g.* Ctx ou LT, num mamífero, incluindo humano, com necessidade de um tal tratamento, compreendendo a administração ao referido mamífero de uma quantidade eficaz de penta/hexassacárido de GOS ou fração ativa de GOS de acordo com a invenção. Conforme aqui usado, o termo "um quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz para alcançar um efeito terapêutico desejado, tal como o tratamento e/ou prevenção de sintomas agudos associados com ação da toxina, em particular acumulação de fluido nos intestinos.

Num outro aspeto, é proporcionado um método para a inibição adesão da toxina da cólera a células de mamífero, *e.g.* ao intestino ou células de mamífero epiteliais intestinais.

Numa incorporação adicional, a presente invenção diz respeito a um processo para a produção das composições da invenção, em que um tal processo compreende a mistura íntima dos componentes da composição da invenção com excipientes farmaceuticamente ou nutricionalmente aceitáveis. Tais processos são bem conhecidos dum perito na técnica.

A utilidade de toda a composição da presente invenção pode ser observada em testes clínicos padrão em, por exemplo, indicações conforme descrito aqui acima, por exemplo usando um ou mais frações de GOS antiadesivas de Ctx da invenção, num intervalo desde cerca de 1 g a 15 g, e.g. cerca de 10 g, para um mamífero, e em modelos animais padrão. O alívio de sintomas caracterizando desordens entéricas associadas com a toxina da cólera agudas ou crónicas proporcionado pelas composições pode ser observado em testes de animal padrão por exemplo usando o modelo de cólera experimental na ansa intestinal de coelho (Leitch *et al.*, *J Infect Dis.*, **117(3)** (Jun 1967) 197-202).

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Correlação entre o número da fração de GOS purificada por permuta catiónica e a abundância relativa de tri, tetra, penta e hexassacáridos de GOS (indicadas como DP₃, DP₄, DP₅ e DP₆, respetivamente). Para detalhes experimentais ver Exemplo 1.

Figura 2: Inibição da fração 2 de GOS de Ctx-HRP n = 6. P = 0,000 indica que a interação entre fração 2 de GOS e Ctx-HRP ligada a GM1 neste ELISA é altamente significativa. ANOVA calculada a partir de valores transformados (log) de Ctx-HRP ligada. Para detalhes experimentais ver Exemplo 2.

Figura 3: Resposta à dose de fração 2 de GOS. $n = 6$. $r^2 = 0,925$ global indica uma resposta sigmoidal fortemente ajustada. As diferenças entre valores $\log CE_{50}$ e CE_{50} foram verificadas como não sendo significativamente diferentes ($P = 0,9411$) e por conseguinte a hipótese nula não foi rejeitada.

Figura 4: Atividade inibitória das frações 1 - 15 de GOS na ligação de Ctx-HRP a GM1. Ver Figura 1 para conteúdo de espécies de GOS de cada fração. Painel A: $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ versus inibição de Ctx-HRP $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. $n = 6$. O valor grande de r^2 indica que 73,56% da variação é causada por diferenças na composição das espécies entre as frações de GOS. Painel B: Frações de GOS 1 - 15 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ versus inibição de Ctx-HRP $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. $n = 6$. O valor grande de r^2 indica que 74,14% da variação é causada por diferenças na composição das espécies entre as frações de GOS

Figura 5: Correlação entre a dose de DP6 e a inibição de Ctx-HRP. $n = 6$. $P = 0,2748$ indica que não existe diferença estatística entre cada uma das curvas de resposta à dose sigmoidais ajustadas. Além disso as concentrações de Ctx-HRP não afetam a eficácia de DP6. Os valores de DP6 foram transformados à escala log. $R^2 = 0,8516$ e $CE_{50} = 5,10\%$ de DP6

EXEMPLOS**EXEMPLO 1:**

Purificação e caraterização de galacto-oligossacáridos (GOS) de "grau alimentar" usando cromatografia de permuta catiónica e HILIC-ESI-MS

Galacto-oligossacáridos produzidos enzimaticamente derivados de soro do leite, consistem de di até heptasacáridos constituídos por 1-7 unidades de galactose ligadas a uma molécula de glucose no termo da redução. Esta mistura complexa de GOS é um exemplo dum produto comercial contendo oligossacáridos promotores de saúde não digeríveis e açúcares de baixa massa molecular, os quais meramente aumentam o valor calórico do produto. Este exemplo descreve o uso de resina permutadora catiónica na forma de sódio para remover chromatograficamente a glucose e galactose numa escala semipreparativa. As frações de oligossacárido resultantes foram caraterizadas com sucesso e feito o seu perfil usando cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) acoplada a espetrometria de massa por electrospray (ESI-MS).

1. Materiais e métodos**1.1. Químicos**

Todas as soluções foram preparadas usando água MilliQ ultrapura. A mistura galacto-oligossacárida comercial Vivinal GOS® usada tinha uma composição típica de: 73% m/m^{-1} de matéria seca da qual 57% m/m^{-1} era de galacto-oligossacáridos; 23% m/m^{-1} de lactose anidra; 19% m/m^{-1} de

glucose anidra e 0,9% m/m^{-1} de galactose (Friesland Foods Domo, Zwolle, Holanda). Os padrões para a geração da curva padrão de HPLC foram mono-hidrato de D-(+)-glucose e B-lactose de grau analítico, comprados em Sigma-Aldrich Company Ltd. (Gillingham, Dorset, RU). MeOH de grau HPLC e H_2O foram comprados em Rathburns Chemical Co., (Peebleshire, Escócia), NH₄AC em BDH (VWR International, Poole, RU). Malto-heptanose, malto-hexanose, maltopentanose, maltotetraose, rafinose, lactose e glucose foram comprados em Sigma-Aldrich (Gillingham, Dorset, RU). Pós de GOS fractionados foram produzidos com resina permutadora catiônica UBK-530 (Mitsubishi Chemical Corporation, Tóquio, Japão). A escada de Homopolímero de Glucose (GHP) rotulada com 2-AB (2-aminobenzamida) foi comprada em Ludger Ltd (Abingdon, Oxfordshire, RU). Inicialmente todos os oligossacáridos foram dissolvidos em H_2O até 10 mg·mL⁻¹, e em seguida ainda diluídos antes da injeção.

1.2. Hidrólise de lactose de Vivinal GOS® com β -galactosidase;

A remoção de lactose de Vivinal GOS foi realizada para melhorar a separação entre glucose e galactose e trissacáridos-heptassacáridos. Na reação, a lactose é hidrolisada para formar glucose e galactose. Estes monosacáridos são retidos com afinidade mais alta na permuta catiônica. Para este fim, Vivinal GOS® foi pré-tratado com a preparação de β -galactosidase Maxilact® L5000 antes da purificação por permuta catiônica. Inicialmente, solução

30% m/m^{-1} de Vivinal GOS® foi preparada e ajustada até pH 6,5 usando hidróxido de sódio 1 M. Após aquecimento até 40°C, 0,9 g de Maxilact foram adicionados a Vivinal GOS® e incubou-se durante 4 horas. Depois de tratamento, o pH da solução foi ajustado a 4,5 e aqueceu-se para desativar a lactase durante 10 minutos a 100°C. A enzima precipitada foi removida por centrifugação a 19 000 rpm durante 60 minutos. A solução Vivinal GOS resultante livre de lactose foi usada em experimentos de permuta catiónica.

1.3. Purificação por cromatografia de permuta catiónica em escala preparativa de Vivinal GOS®

A técnica é adaptada de Matsumoto *et al.* (*Method for producing galactooligosaccharides*, E. P. Office, Editor, 1987). Brevemente, a resina na forma Na Unibead UBK-530 foi selecionada (Mitsubishi Chemical Industries Ltd, Tóquio, Japão). 2000 mL de resina UBK-530 foram hidratados e os finos removidos de acordo com as instruções dos fabricantes. Depois disso, a resina foi tratada com solução 1 M de KCl durante 12 horas num banho de água em agitação a 20°C de maneira a trocar o ião Na^+ pelo ião K^+ .

A coluna era composta por vidro de borossilicato com um diâmetro interno de 0,05 m e comprimento 1 m. Esta coluna de vidro estava rodeada por uma camisa termostato de plástico acrílico (coluna Pharmacia XK-50/100, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, RU). Tubagem de Teflon adicional foi envolvida à roda da coluna para atuar como

permutador de calor. A coluna foi aquecida com um banho de água de circulação Haake Model FE (Haake, RU). As amostras foram bombadas através da resina usando um módulo de 3 pistões livre de pulsação (Model C-601, Buchi, Flawil, Suíça). Os hidratos de carbono separados das colunas foram detetados usando um refratómetro diferencial, Gilson modelo 132 detetor RI (Anachem, Bedfordshire, RU), o qual foi purgado com eluente no início de cada experimento.

Antes do carregamento da amostra, todo o equipamento incluindo resina de permuta iônica, coluna, Vivinal GOS® e água usada para eluição foi aquecido até 55°C ao longo de um período de 60 minutos para assegurar o equilíbrio. Um total de 1800 mL dos 2000 mL de resina UBK-530 foi carregado na coluna. Água inicialmente desmineralizada foi bombada a $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ aumentando gradualmente até um fluxo final de $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de maneira a evitar o choque de pressão na resina. Todo o eluente foi desgaseado usando hélio antes do uso. A seguir ao pré-tratamento com Maxilact L5000, 150 mL de solução 30% m/m^{-1} de Vivinal GOS® livre de lactose foram injetados na coluna a $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Concentrações mais altas do que esta produziram desordem no padrão de separação. O volume vazio desta coluna foi de 675 mL ou 45 minutos antes do hidrato de carbono começar a eluir. Os hidratos de carbono separados contendo eluente foram recolhidos em cada minuto em frações até nenhum hidrato de carbono ser detetado pelo detetor RI (Model 2128 Fraction Collector, Bio-Rad, Hertfordshire, RU).

1.4. Determinação por cromatografia de permuta aniónica de alta eficiência da pureza de Vivinal GOS usando cromatografia de permuta catiónica em escala preparativa

As frações recolhidas durante a cromatografia de permuta iónica foram analisadas usando cromatografia de permuta aniónica de alta eficiência com deteção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) (Dionex corp., CA, USA) seguindo o protocolo desenvolvido para galacto-oligossacáridos por de Slegte *et al.* ("Determination of trans-Galacto-oligosacharides in Selected Food Products by Ion Exchange Chromatography: Collaborative Study" in *Journal of AOAC International*, **85** Parte 2 (2002) 417-423). Brevemente, foi usada uma coluna de resina de permuta iónica pelicular CarboPac PA-1 250 × 4 mm de diâmetro interno guarda coluna de partículas de etilvinilbenzeno sulfonado-divinilbenzeno. A fase móvel foi um gradiente de (A) NaOH 12,5 mM, (B) NaOH 125 mM e (C) NaOH 125 mM com acetato de sódio 500 mM. O gradiente do eluente para a análise foi realizado conforme previamente reportado por de Slegte *et al.* 20 µL de cada amostra foram injetados e analisados à temperatura ambiente com uma velocidade de fluxo de 1 ml·min⁻¹.

1.5. Cromatografia de interação hidrofílica (HILIC)

ZIC®-HILIC, Coluna PEEK, 150 × 2,1 mm 5 µm foi selecionada por causa da "sangria" da fase estacionária da

coluna se ter mostrado particularmente baixa (SeQuant AB, Umea, Suécia). A fase estacionária de ZIC®-HILIC zwittriónica está ligada a sílica porosa. A separação é conseguida por um mecanismo de partição hidrofílica superimposto sobre interações electrostáticas fracas. Os outros parâmetros de análise foram: volume de injeção de 1 μ L, deteção UV em 214 nm e tempo de jato de 31 min. Uma das frações de GOS foi analisada a 20, 30, 40, 50 e 60°C. Todos os outros jatos cromatográficos foram a 60°C. Foi usado metanol em vez de acetonitrilo porque foi possível dissolver as frações de GOS em concentrações mais altas de MeOH:H₂O do que ACN:H₂O. Os hidratos de carbono de injeção em 100% de H₂O não permitiram ao solvente a repartição na fase estacionária e consequentemente a amostra eluiu como um tampão sem separação. A fase móvel era composta por MeOH 95%-NH₄AC 5 mM em H₂O. Experimentos de gradiente variaram o tempo no qual uma concentração de MeOH:H₂O 50:50 programando as bombas de gradiente. O baixo conteúdo de água de 5% foi usado para manter hidratação adequada e melhorar as interações electrostáticas entre a fase estacionária e móvel. O sistema de HPLC Agilent 1100 consistiu de uma bomba capilar da série Agilent 1100 com um desgaseador online (Agilent, Stockport, RU), um detetor de UV, autoamostrador, e guarda de permuta catiónica Dionex CS 14 (4 mm x 50 mm). As velocidades de fluxo variaram desde 100 até 200 μ L·min⁻¹ e 214 nm foi monitorizado com o detetor de UV.

1.6. Espetrometria de massa de ionização por eletropulverização para analisar açúcares

A descrição da ionização e detecção incluindo parâmetros de operação específicos são descritos de acordo com instruções dos fabricantes modificadas (instrumento Bruker Daltonics microTOF, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

2. Resultados

2.1. GOS fracionado por permuta catiônica

O método de permuta catiônica foi modificado a partir de Matsumoto *et al.* [12] a seguir a comunicações pessoais com J. de Slegte em Royal Friesland Foods. Previamente, os contraiões Na^+ , K^+ e Ca^{2+} foram testados para determinar quais davam a separação de GOS mais limpa de lactose, galactose e glucose. A forma potássio da resina UBK-530 deu os melhores resultados com vista à separação de Vivinal GOS® e foi por conseguinte escolhida para experimentos posteriores (dados não publicados). HPAEC-PAD foi usado em cada fração de 1 minuto para determinar a composição em oligossacáridos. As frações iniciais continham altas concentrações de GOS. Houve um desvio na composição desde galacto-oligossacáridos de alta massa molecular até glucose e galactose com cada fração sucessiva recolhida da coluna IEX. A resina UBK-530 revelou excelente resistência à compressão, os açúcares foram também eluídos sem solvente orgânico e a coluna não requereu equilibração entre injeções, por conseguinte, foi conseguida purificação semicontínua.

2.2. Análise e comparação entre as frações de GOS números 1-15

Usando uma coluna aquecida até $60^{\circ}\text{C}\pm0,5^{\circ}\text{C}$, uma velocidade de fluxo de $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e gradiente de MeOH 95%-NH₄AC 5 mM em água até MeOH 50%-NH₄AC 5 mM em água em 25 minutos resolveram-se parcialmente a composição das frações 1-15 de GOS. Usando as características de integração do software no software de DataAnalysis v3.2, foi possível integrar a área sob cada um dos grupos de açúcares identificados como DP₃ seguido por DP₄, DP₅, DP₆ e DP₇.

Pela integração dos cromatogramas iônicos extraídos de cada açúcar foi possível calcular um valor da abundância para os di, tri, tetra, penta, hexa e heptassacáridos em cada fração. Contudo, foi mostrado que os oligossacáridos não ionizam com a mesma eficiência na fonte (D. J. Harvey, *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, 7(7) (1993) 614) e assim a expressão dos dados na forma de abundância relativa é prática comum em espetrometria de massa (Lamari, et al., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 793(1) (2003) 15-36). Se açúcares individuais falharem em ionizar com igual eficiência ou antes os hexassacáridos (DP₆) ionizarem fracamente, a abundância de ionização relativa em percentagem reduz este efeito quando se fazem comparações entre frações. Por exemplo se a abundância total de todos os adutos de hidrato de carbono na fração X é adicionada e as percentagens

calculadas para cada DP, a abundância de DP individual (todo o DP3 por exemplo) é posta em gráfico relativamente a todos os iões formados. A Figura 1 é uma representação gráfica da abundância relativa de tri, tetra, penta e hexassacáridos contra o número da fração. A regressão linear entre o número da fração e a abundância de DP₆ dá um coeficiente de correlação de 0,958, indicando que existe uma forte relação entre estas 2 variáveis. A probabilidade de obtenção de um valor *r* calculado maior do que 0,9 com replicados maior do que 10 quando 2 variáveis não estão relacionadas é <0,001. A abundância de DP₅ está também inversamente relacionada com o número da fração com um coeficiente de 0,720.

Exemplo 2:**Inibição Por Galacto-oligossacáridos Sobre a Ligação da Toxina da Cólera ao Seu Recetor**

Neste Exemplo a capacidade de frações de galacto-oligossacárido obtidas no Exemplo 1 de inibirem a ligação da toxina da cólera a GM1 é medida usando ELISA competitivo. A bioatividade ou valores CE₅₀ são para serem correlacionados com a informação estrutural dos experimentos de HILIC-ESI-MS do Exemplo 1 para elucidar quais as estruturas de GOS são as mais eficientes na inibição da ligação de Ctx a receptores naturais GM1. O receptor natural GM1 foi usado como um açúcar modelo visto que tem sido mostrado ter a maior eficácia para a toxina da cólera.

1. Materiais e métodos**1.1 Químicos**

De grau analítico, mono-hidrato de D- (+) -Glucose, β -Lactose, monosialogangliósido-GM1 isolado de cérebro de bovino, TWEEN® 20, albumina de soro bovino (BSA), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), dimetilsulfóxido (DMSO) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram todos comprados em Sigma Aldrich (Gillingham, Dorset, RU). Salina tamponada por fosfato (PBS) foi comprada em Oxoid Ltd (Basingstoke, Hamps, RU) em forma de comprimido e correspondia à formulação original de Dulbecco e Vogt (1954) excepto que são omitidos cálcio e magnésio. Cada comprimido foi diluído em água destilada seguindo as instruções do fabricante. A subunidade B da toxina de *Vibrio cholerae* conjugada a peroxidase de rábano silvestre foi importada por e comprada em Quadratech Ltd, Surrey, RU (fabricada por List Biologicals, CA, EUA). Os galacto-oligossacáridos foram um obséquio de Friesland Foods Domo (Zwolle, Holanda) e purificados e fracionados usando cromatografia de permuta cationica antes do uso. Todas as soluções foram preparadas usando água MilliQ ultrapura.

1.2 ELISA de ligação a GM1 Inibitório

Placas de microtitulação (F96 Maxisorp; Fisher Scientific, Loughborough, RU) foram incubadas à temperatura ambiente durante a noite com 100 μ L de gangliósido GM1 500 $ng \cdot mL^{-1}$ dissolvidos por cavidade em salina tamponada por fosfato (pH 7,2) contendo NaCl 160 mM e fosfato de

potássio 9 mM (PBS). O gangliósido não ligado foi removido por lavagem das cavidades três vezes com PBS contendo Tween 20 0,1%. Sítios de ligação adicionais na superfície da placa foram bloqueados por incubação das cavidades com 200 µL de uma solução 2% (m/v) de albumina de soro bovino (BSA)-PBS durante a noite à temperatura ambiente e em seguida lavadas com Tween 20 0,1%-PBS três vezes.

As soluções de teste foram preparadas em BSA 0,1%-PBS; cada uma consistiu de 5, 10 e 15 ng/mL de conjugado Ctx-B5 - peroxidase de rábano silvestre, pré-incubados com inibidores potenciais durante 2 h à temperatura ambiente. Depois da adição de 200 µL de cada solução de teste, as placas foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. A toxina não ligada foi removida lavando três vezes com Tween 20 0,1%-PBS. Os passos seguintes em seguida revelaram a toxina ligada a GM1: (1) incubação com 100 µL de solução de TMB feita recentemente (1 mg de TMB em 500 µL de DMSO, 50 mL de tampão de citrato de potássio 0,1 M e 5 µL de peróxido de hidrogénio 30%) durante 15 min à temperatura ambiente. TMB é um substituto não carcinogénico para benzidina e foi usado como substrato de peroxidase. O substrato produziu um produto final solúvel que era de cor azul pálida e lido espetrofotometricamente (Genios, Tecan UK Ltd, Thatcham, RU) após paragem com H₂SO₄ 2 M (resultando numa cor amarela) em 450 nm.

Todos os experimentos foram realizados em quadruplicado e validados contra uma curva padrão de 0, 0,97,

1,95, 3,90, 7,81, 15,62, 31,25 e 62,5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de conjugado toxina-peroxidase. Uma solução de estoque de Ctx-HRP 30 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi preparada e usada em toda a extensão de cada placa como um controlo para medir a deriva do coeficiente de variação ou absorvância intraensaio e estabilidade de ensaio. Leituras de absorvância não conhecidas e subsequentes valores CE_{50} foram calculados a partir da curva padrão e comparados com software Prism versão 4.0 (GraphPad® Software Inc, CA, EUA). ANOVA foi calculada usando Minitab® versão 14 (Mintab Ltd, Coventry, RU).

A média estatística de cada conjunto de leituras de absorvância foi usada para calcular a concentração de cólera que não foi inibida e consequentemente capaz de se ligar ao GM1 imobilizado à superfície. Leituras de absorvância mais altas foram indicativas de maiores concentrações de cólera não inibida e/ou desempenho de inibidor pobre. As barras de erro refletem o erro padrão da média da Ctx-HRP não inibida atual nos diferentes dias dos experimentos replicados.

2. Resultados

2.1 Inibição por frações de GOS da ligação de Ctx-HRP a GM1-ELISA

A Figura 2 mostra uma representação da interação entre a concentração de Ctx-HRP ligada e a dose de número de fração 2 de GOS em cada uma das diferentes concentrações de Ctx-HRP. A fração de GOS número 2 foi escolhida como um

exemplo, ainda que níveis similares de inibição sejam tipicamente observados para as frações 1-9 com uma redução visual na resposta colorimétrica em todas as 3 concentrações de Ctx-HRP com pelo menos $12,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de açúcar. As barras de erro maiores em baixas concentrações de GOS são causadas por inibição parcial entre replicados e/ou fraca afinidade em baixas concentrações. Além disso, ANOVA de dois fatores entre a concentração de Ctx-HRP ligada e a dose da fração 2 de GOS e a dose de Ctx-HRP confirma que a dose de GOS afeta a inibição ($P < 0,001$). Em aditamento, a estatística descritiva R^2 (η^2 ou eta quadrado) representa a fração da variância global atribuível a diferenças entre 'dose de Ctx-HRP' e 'dose de GOS' médias. R^2 de 98,43% significa que uma fração grande da variação é devida ao tratamento que define um grupo (isto é, concentração crescente) e ainda reforça a relação entre as concentrações de Ctx-HRP ligada e da fração 2 de GOS. Um valor F grande significa que a variação entre valores médios de 'dose de GOS' e 'Ctx-HRP ligada' é mais do que seria observado por acaso, suportando ainda o conceito de que a 'dose de GOS' afeta Ctx-HRP ligada.

As concentrações médias de Ctx-HRP ligada em todos os experimentos da fração 2 de GOS sem qualquer inibidor foram 4,25, 8,31 e 21,90 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ e não 5, 10 e 20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ como calculado. Contudo, estas variações estão dentro dos limites dos coeficientes intra e interensaio (não mostrado). Além disso, houve também diferenças menores nos valores de inibidor zero entre frações, por conseguinte

de maneira a fazer comparações entre frações o valor CE_{50} foi calculado e comparado entre curvas. Foi usado software Prism® v4 (GraphPad Software, Inc, CA, EUA) para transformar a concentração de Ctx-HRP de $ng \cdot mL^{-1}$ para percentagem de inibição e normalizar valores inibidores numa escala log. Prism® ajustou a curva de resposta à dose sigmoidal ou logística de três parâmetros (Figura 3). A normalização por este caminho estende o eixo dos yy verticalmente desde 0 até 100% por definição; por conseguinte a precisão dos valores mínimo e máximo foi essencial. Prism também comparou as curvas de resposta à dose em cada concentração de Ctx-HRP e encontrou que os valores EC_{50} não foram estatisticamente diferentes ($P=0,9411$, $F, 0,061$). Isto indica que a fração 2 de GOS efetivamente inibiu Ctx-HRP com igual eficácia, sem consideração da quantidade de Ctx-HRP conforme mostrado na Figura 3. Esta situação é provavelmente para alterar se a concentração de Ctx-HRP foi aumentada acima de $20 ng \cdot mL^{-1}$. Inversamente, este ensaio está constrangido pela linearidade da curva padrão do substrato de peroxidase e a observação de que metade da ligação máxima é estimada ser $15 ng \cdot mL^{-1}$ ou $0,153 nM$ [34]. A CE_{50} foi calculada como $30,77 mg \cdot mL^{-1}$, com a curva sigmoidal estreitamente ajustada com R^2 de 0,9253.

Entre as frações 1-10, o valor CE_{50} variou minimamente, em particular comparar os valores CE_{50} de $30,77 mg \cdot mL^{-1}$ da fração 2 de GOS e $42,19 mg \cdot mL^{-1}$ da fração 8 de GOS. Os valores CE_{50} de Ctx-HRP não puderam ser obtidos para as frações 9-15 porque ou a inibição total não foi

observada ou a curva de resposta à dose sigmoidal foi fracamente ajustada. Por conseguinte, de maneira a comparar a eficácia entre frações, a inibição máxima com fração de GOS $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi escolhida. De modo interessante, as frações de GOS números 11-15 produziram representações gráficas com maiores barras de erro padrão, contudo, isto é provavelmente causado por ligação não específica ou afinidade mais fraca para Ctx-HRP. Apesar desta observação, a análise ANOVA de um fator entre a inibição de Ctx-HRP $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($0,102 \text{ nM}$) e cada fração de GOS revela existir uma diferença estatística entre frações com $P < 0,0001$ (Figura 4A). As frações 1-8 inibem entre 91,84% e 89,05% da Ctx-HRP, respectivamente. Comparando esta percentagem de inibição com a concentração atual de Ctx-HRP ligada quando incubada com $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de GOS fr. 2, o valor é baixo ($0,621 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) com limites de confiança de 95% de $0,374$ - $0,868 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Além disso, a $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ há 95% de certeza que a fração 2 de IEX inibirá entre 95,67% e 89,95% da Ctx-HRP, 95% do tempo.

A Figura 4B de modo semelhante compara a inibição de Ctx-HRP $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($0,204 \text{ nM}$) e cada fração de GOS a $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os valores inibitórios foram de novo expressos relativamente a Ctx-HRP ligada com inibidor $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. As frações de GOS 1-7 proporcionam um mínimo de 92% de inibição, enquanto as frações 10-15 inibem menos do que 66% de Ctx-HRP com desvio padrão mais alto entre replicados. Como antes, a análise ANOVA de um fator entre inibição de Ctx-HRP $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ e cada fração de GOS revela existir uma

diferença estatística entre frações com $P<0,0001$. A diferença máxima na inibição entre diferentes concentrações de Ctx-HRP é pequena em comparação com o efeito observado entre frações de GOS. Usando cromatografia de permuta cationica, a diferença entre o perfil das espécies de GOS de cada fração foi elucidada. HILIC-ESI-MS mediu diretamente as diferenças entre graus de polimerização em cada fração e mostrou que as concentrações de DP₆ e DP₅ diminuem com o número de fração sucessivo, enquanto as concentrações de DP₃ e DP₄ aumentam. Usando modelos matemáticos e técnicas estatísticas, a correlação entre mudanças na massa e eficácia biológica foi investigada.

2.2 Comparação entre a inibição de Ctx-HRP por frações de GOS e composição de GOS

A Figura 1 mostra a mudança no perfil de GOS entre cada fração separada usando cromatografia de permuta cationica conforme descrito no Exemplo 1. Visto que a abundância de DP₆ pareceu correlacionar-se estreitamente com a atividade antiadesiva da Ctx-B, a média de Ctx-HRP ligada foi representada em gráfico contra a abundância relativa de DP₆ de GOS (hexassacáridos) em cada fração (Figura 5). A correlação seguiu uma relação de decaimento exponencial; além disso, expressando a concentração de DP₆ em escala log (gráfico semi-log) resulta num diagrama de dispersão de pontos sigmoidal. O software Prism foi em seguida usado para normalizar os dados em termos de inibição de Ctx-HRP e ajustar a curva de resposta à dose

sigmoidal para calcular valores CE_{50} para cada concentração de Ctx-HRP. Como antes, CE_{50} refere-se a uma concentração de inibidor que compete por metade da ligação específica e é tem o valor da CI_{50} . O intervalo de confiança de 95% para cada valor EC_{50} das curvas sobrepõe-se e além disso não existe estatisticamente diferença entre valores $\log CE_{50}$. Os valores CE_{50} foram calculados sendo 4,40, 5,11 e 6,25% de abundância relativa de DP₆, com um número calculado global de 5,1%. Esta semelhança confirmou ainda que a eficácia de GOS é semelhante através das concentrações da Ctx-HRP usadas. Mais importante, a atividade biológica de cada fração de GOS foi medida numa concentração de 100 mg·mL⁻¹ e por conseguinte a principal diferença entre cada fração é a abundância relativa de açúcar e por conseguinte da composição.

3. Conclusão

As frações de GOS 1-8 revelam níveis consistentemente altos de inibição contra a toxina da cólera no ensaio ELISA. Os perfis de espécies de GOS de cada fração de GOS provenientes de HILIC-ESI-MS foram correlacionados contra a concentração de Ctx ligada em ELISA e revelaram estruturas de DP₆ como os ligandos mais provavelmente inibitórios com valor R^2 global de 0,925. O Exemplo 1 acima mostra que a abundância de DP₆ diminui de uma maneira passo a passo com cada fração desde 23% na fração 1 de GOS até 9% na fração 10 de GOS e 0% na fração 16 de GOS. Também, a abundância de DP₅ parece correlacionar-se com a atividade

inibitória. Um aumento simultâneo em DP₃ e DP₄ foi observado, indicativo dum desvio das frações contendo predominantemente DP₆-DP₄ para as contendo DP₄-DP₃. As concentrações da fração de GOS global alta pode ser importante de maneira a manter uma concentração de DP₆ suficientemente alta para inibir completamente Ctx-HRP. Isto pode explicar porque é que GOS não fracionado não inibe qualquer Ctx (fração 0 de GOS; Figuras 4A e B). Por conseguinte, o próprio fracionamento tem eficácia aumentada pela concentração de espécies de GOS particulares, isto é penta e hexassacáridos de GOS que são de outra maneira diluídos na formulação comercial de GOS.

Lisboa, 15 de Novembro de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição compreendendo galacto-oligosacáridos (GOS), em que espécies de GOS tendo um grau de polimerização de 5 ou superior, preferivelmente 6 ou superior, estão presentes numa quantidade de pelo menos 35% numa base ponderal (% *m/m*), com base na massa seca total de todas as espécies de GOS presentes na composição, e em que o conteúdo em penta e/ou hexassacáridos de GOS é 2-100% numa base ponderal com base no massa total da composição.

2. A composição de acordo com a reivindicação 1, compreendendo espécies de GOS compreendendo resíduos de galactosilo ligados em β , em particular ligações $\beta(1-4)$ e/ou $\beta(1-6)$.

3. A composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que todas as espécies de GOS presentes na composição fazem até pelo menos 50% *m/m*, preferivelmente pelo menos 60% *m/m*, mais preferivelmente pelo menos 70% *m/m* com base na massa seca da composição.

4. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 3, compreendendo GOS tendo um grau de polimerização de 5 numa quantidade de pelo menos 40% *m/m* com base na massa seca da composição.

5. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, compreendendo GOS tendo um grau

de polimerização de 6 ou superior numa quantidade de pelo menos 10% *m/m*, com base na massa seca da composição.

6. A composição compreendendo galacto-oligossacáridos (GOS), em que as espécies de GOS tendo um grau de polimerização de 5 ou superior estão presentes em excesso relativamente a espécies de GOS tendo um grau de polimerização de menos do que 5, com base na massa seca das referidas espécies de GOS na composição, e em que o conteúdo em penta e/ou hexassacáridos dos GOS é 2-100% numa base ponderal com base no massa total da composição.

7. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a referida composição é essencialmente livre de mono e/ou dissacáridos, em particular de galactose e/ou de glucose e/ou de lactose.

8. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, compreendendo pelo menos 15% *m/m* de espécies de GOS tendo um grau de polimerização de 6 com base na massa seca total de todas as espécies de GOS presentes na composição.

9. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, compreendendo ainda oligossacáridos sialilados (SOS) não digeríveis de grau alimentar, preferivelmente SOS derivados de leite tal como 3'-sialil-lactose.

10. A composição de acordo com qualquer uma das

reivindicações precedentes, sendo uma comida ou uma bebida compreendendo cerca de 1 mg até cerca de 20 g de hexasacárido de GOS por quantidade servida.

11. Um método para a preparação duma fração de GOS capaz de inibir a ligação da toxina da cólera (Ctx) a GM1, compreendendo o referido método os passos de:

- disponibilização duma mistura de galacto-oligossacáridos (GOS) tendo variados graus de polimerização;
- remoção facultativa de lactose livre da referida mistura de GOS;
- aplicação da referida mistura de GOS (livre de lactose) a uma resina de permuta catiónica;
- eluição passo a passo dos GOS com aumento do grau de polimerização usando uma fase móvel de água e recolhendo as frações de eluente separadas;
- análise de cada fração de eluente ao efeito inibitório sobre a ligação de Ctx a GM1; e
- seleção de uma ou mais frações capazes de inibir a ligação de Ctx a GM1.

12. O método de acordo com a reivindicação 11, em que a produção da referida mistura de GOS com graus de polimerização variados compreende a sujeição do permeado soro do leite ou lactose a transgalactosidação enzimática usando β -galactosidase.

13. Método de acordo com a reivindicação 11 ou

12, em que a referida mistura de GOS tendo graus de polimerização variados compreende uma mistura comercial de GOS, preferivelmente a mistura de GOS comercializada sob a marca registada Vivinal GOS®.

14. Uso dumha composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 para o fabrico de uma composição nutricional ou farmacêutica para o tratamento ou prevenção de uma doença aguda ou crónica associada com ou causada pela adesão e/ou captação de um membro da família da toxina da cólera.

15. Uso de acordo com a reivindicação 14 para o fabrico de uma composição nutricional ou farmacêutica para a prevenção ou tratamento de doença aguda ou crónica causada por um membro da família da toxina da cólera, em particular doenças diarreicas.

16. Uso de acordo com a reivindicação 14 ou 15, em que o referido membro da família da toxina da cólera é a toxina da cólera de *V. cholerae* (Ctx-B) ou enterotoxina termolábil (LT-B) de *E. coli* enterotoxigénico (ETEC).

17. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, em que a dose diária de penta e/ou hexassacárido de GOS é até cerca de 250 mg.

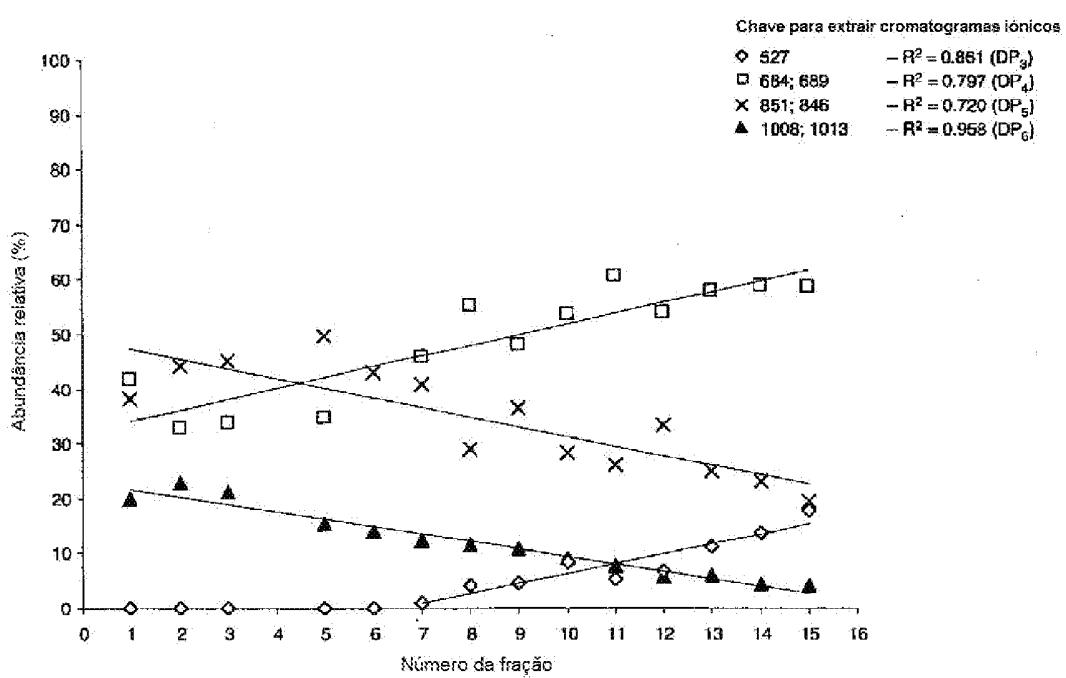
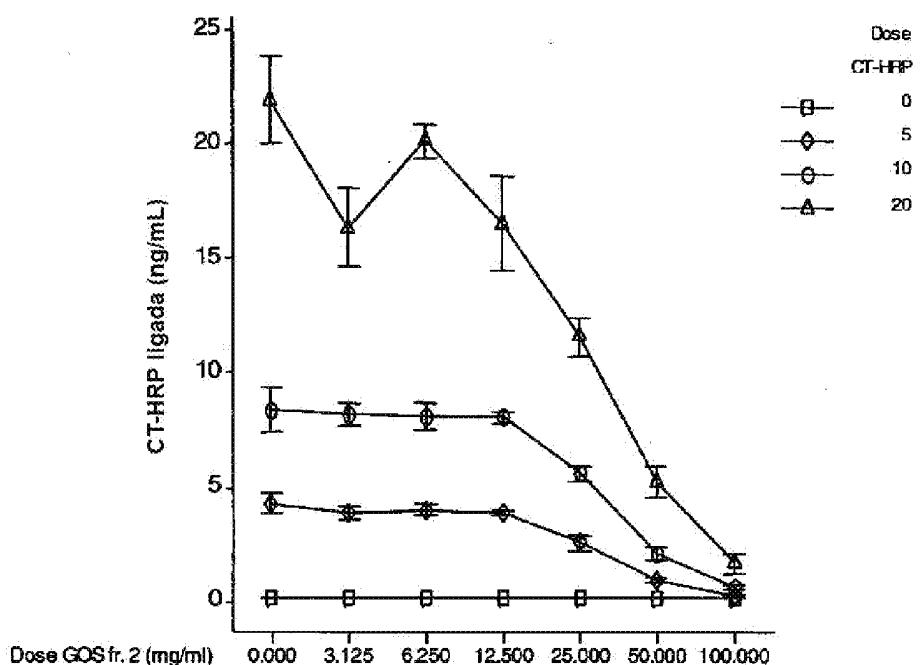


Figura 1

Gráfico de Intervalos de CT ligada vs Dose GOS Fr.2, Dose CT

As Barras representam Um Erro Padrão a partir da Média

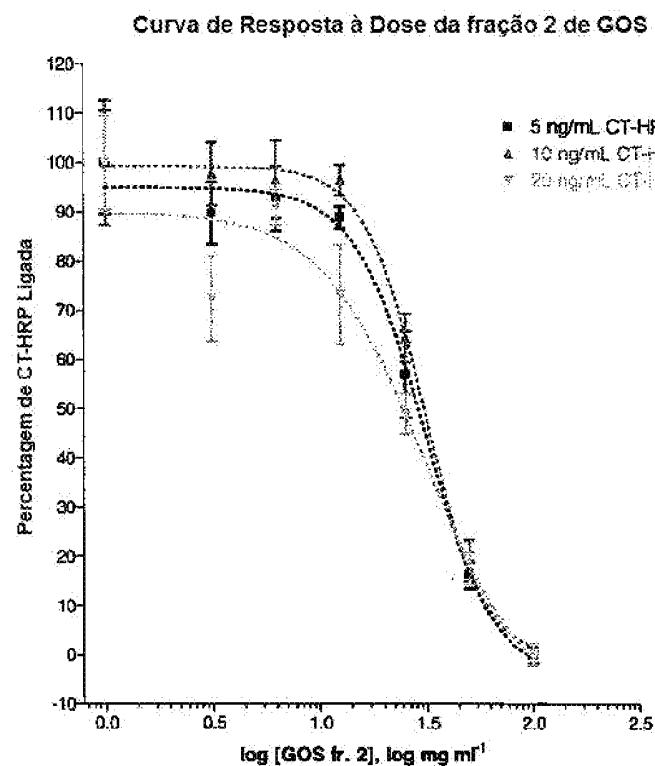


ANOVA dois fatores: log CT Bound versus Dose CT, Dose GOS fr. 2

| Fonte | DF | SS | MS | F | P |
|----------------|----|---------|---------|---------|-------|
| Dose CT | 3 | 51.1363 | 17.0454 | 1439.14 | 0.000 |
| Dose GOS fr. 2 | 6 | 8.0822 | 1.3470 | 113.73 | 0.000 |
| Interação | 18 | 2.7981 | 0.1555 | 13.12 | 0.000 |
| Erro | 56 | 0.6633 | 0.0118 | | |
| Total | 83 | 62.6799 | | | |

S = 0.1088 R-Sq = 98.94% R-Sq(adj) = 98.43%

Figura 2:



| LOGCE50 diferente para cada conj. dados | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|
| Valores melhor ajustados individuais | | | |
| LOGCE50 | 1.473 | 1.501 | 1.482 |
| CE50 | 29.72 | 31.73 | 30.31 |
| Intervalos de Confiança 95% | | | |
| LOGCE50 | 1.362 to 1.584 | 1.396 to 1.607 | 1.218 to 1.745 |
| CE50 | 23.01 to 38.39 | 24.89 to 40.44 | 16.52 to 55.61 |
| Bondade do Ajustamento: | | | |
| Graus de Liberdade | 17 | 17 | 17 |
| R ² | 0.9397 | 0.9414 | 0.8862 |
| Soma de Quadrados Absoluta | 1880 | 1964 | 3071 |
| Sy.x | 10.52 | 10.75 | 13.44 |

Figura 3

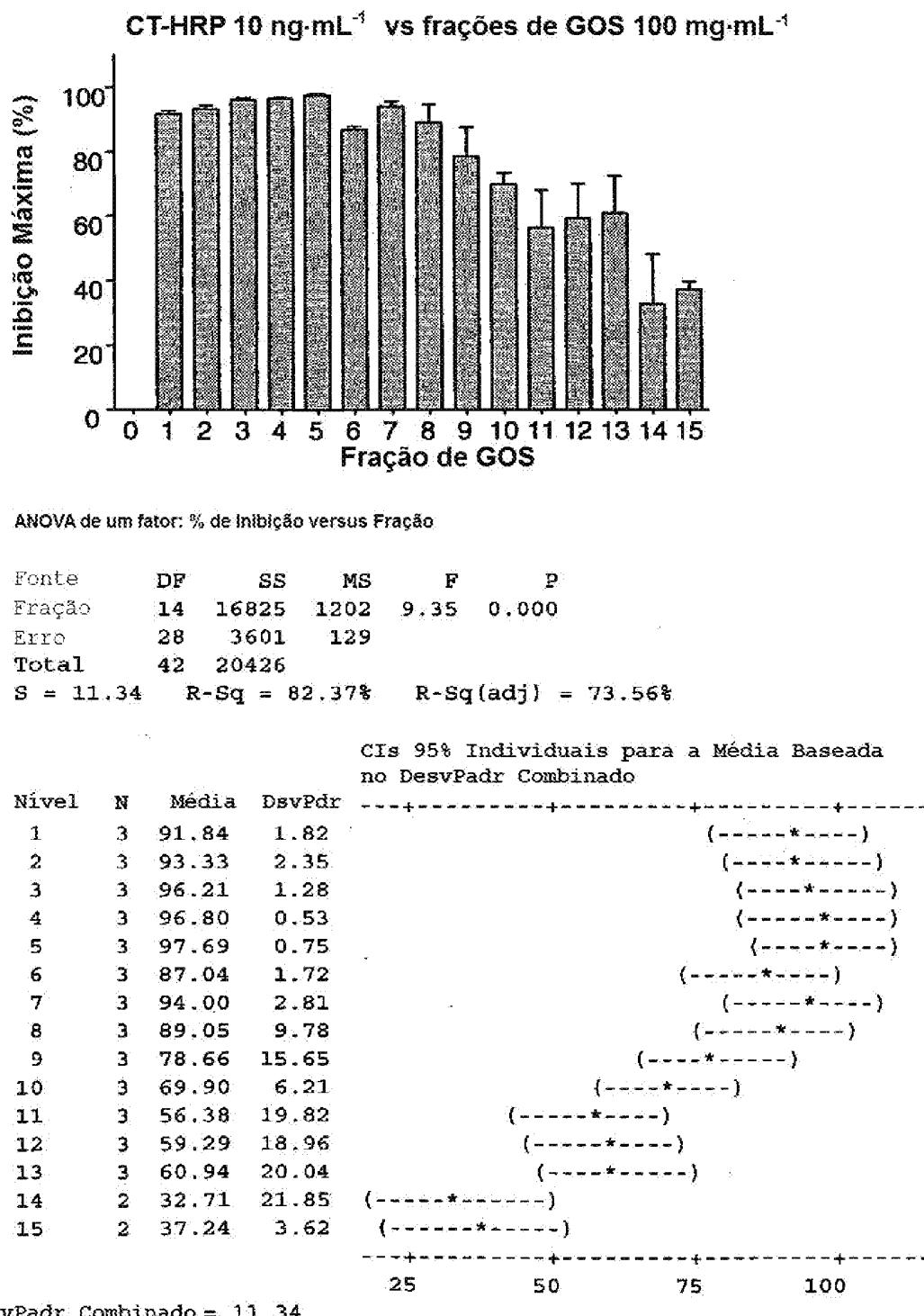
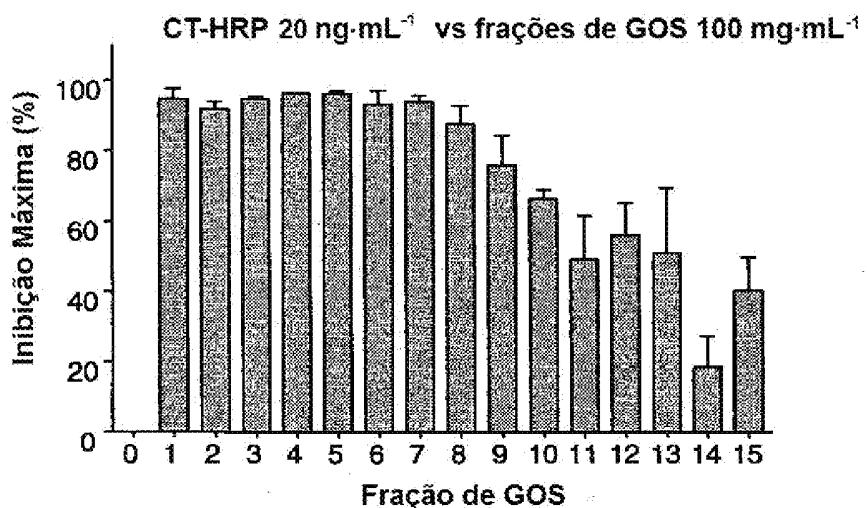


Figura 4A



ANOVA de um fator: % de Inibição versus Fração

| Fonte | DF | SS | MS | F | P |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| Fração | 14 | 22408 | 1601 | 9.60 | 0.000 |
| Erro | 28 | 4667 | 167 | | |
| Total | 42 | 27075 | | | |

S = 12.91 R-Sq = 82.76% R-Sq(adj) = 74.14%

CIs 95% Individuais para a Média Baseada
no DesvPadr Combinado

| Nível | N | Média | DsvPdr | CI 95% Individual |
|-------|---|-------|--------|-------------------|
| 1 | 3 | 94.75 | 5.08 | (----*----) |
| 2 | 3 | 92.07 | 3.72 | (----*----) |
| 3 | 3 | 94.94 | 0.75 | (----*----) |
| 4 | 3 | 96.60 | 0.32 | (----*----) |
| 5 | 3 | 96.53 | 1.19 | (----*----) |
| 6 | 3 | 93.54 | 6.61 | (----*----) |
| 7 | 3 | 93.98 | 3.21 | (----*----) |
| 8 | 3 | 87.73 | 9.13 | (----*----) |
| 9 | 3 | 75.98 | 14.75 | (----*----) |
| 10 | 3 | 66.51 | 4.42 | (----*----) |
| 11 | 3 | 49.21 | 21.33 | (----*----) |
| 12 | 3 | 56.06 | 15.79 | (----*----) |
| 13 | 3 | 51.01 | 32.31 | (----*----) |
| 14 | 2 | 18.47 | 12.63 | (----*----) |
| 15 | 2 | 40.27 | 13.37 | (----*----) |

DesvPadr Combinado = 12.91

Figura 4B

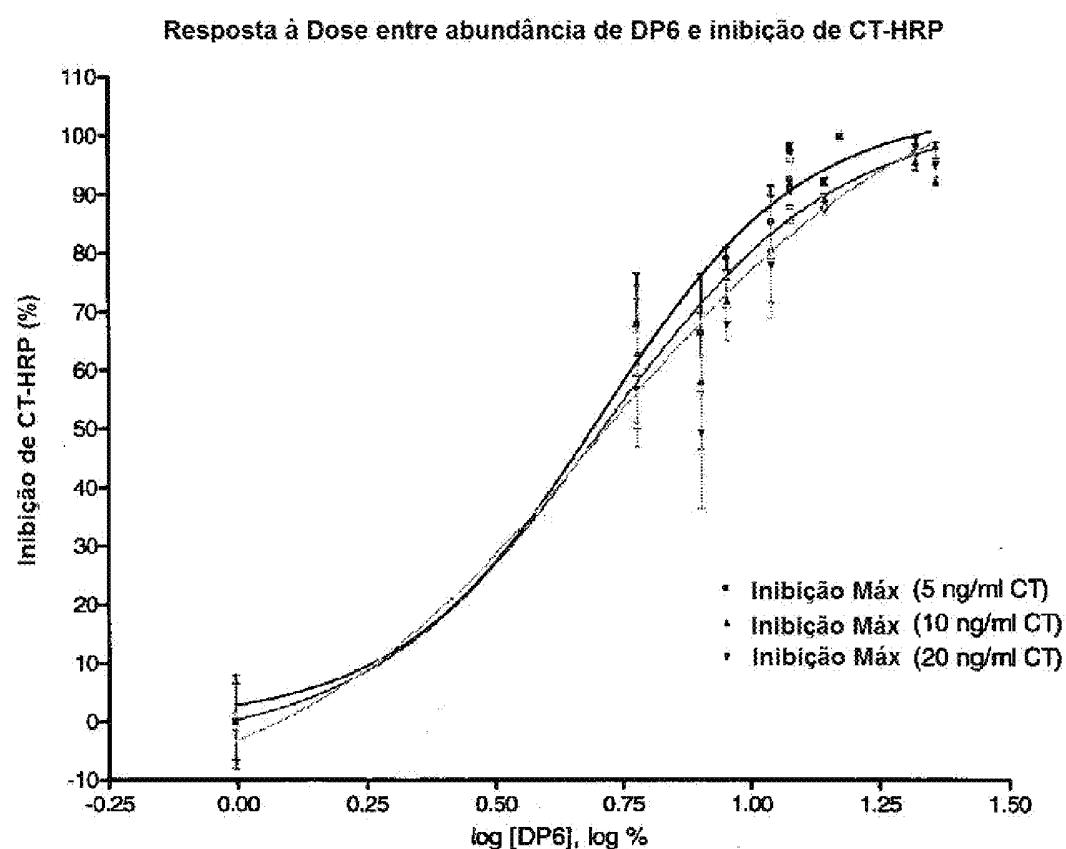


Figura 5