(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 044964 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.17

(21) Номер заявки
202191255

(22) Дата подачи заявки
2019.11.08

(51) Int. Cl. ***A23K 20/163*** (2016.01)
A61K 31/702 (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ СИНТЕТИЧЕСКИЙ ОЛИГОСАХАРИДНЫЙ ПРЕПАРАТ

(31) **62/757,500; 62/757,465**
(32) **2018.11.08**
(33) **US**
(43) **2021.09.15**
(86) **PCT/US2019/060443**
(87) **WO 2020/097446 2020.05.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДСМ АйПи АССЕТС, Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Верльяк Вивиан, Блоккер Бритт, Ришар Натали, Шмайссер Жером, Зайферт Николь, Перес-Кальво Эстефания, Дюваль Стефан (NL), Джеремия Джон М. (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) US-A1-20160366909
US-A1-20160213702
WO-A1-2017125929
US-A1-20080260696
US-A1-20120196811

(57) Настоящее изобретение направлено на способы и применение питательной композиции, содержащей основную питательную композицию и синтетический олигосахаридный препарат, у животного, где синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn), где n является целым числом больше 3, и где каждая из фракций DP1 и DP2 независимо включает от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, определяемой масс-спектрометрией, для лечения или профилактики дисфункции желудочно-кишечного барьера у животного, нуждающегося в этом, и для лечения или профилактики инфекции у животного, нуждающегося в этом.

044964 B1

044964 B1

Родственные заявки

По настоящей заявке испрашиваются преимущества для предварительной заявки на патент США № 62/757,500, поданной 8 ноября 2018, и по предварительной заявки на патент США № 62/757,465, поданной 8 ноября 2018, раскрытия каждой из которых включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

Предшествующий уровень техники

Желудочно-кишечная система животного представляет собой поверхность раздела с наибольшей площадью между внутренними органами животного и внешней средой. Она отвечает за переваривание и усвоение питательных веществ и обеспечивает эффективный барьер против патогенов окружающей среды. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) тесно взаимодействует с иммунной системой животного-хозяина и является домом для кишечного микробиома животного, который состоит из различных микроорганизмов (бактерий, грибов, плесени, вирусов и т.д.), обитающих в пищеварительном тракте.

У здоровых животных желудочно-кишечная система поддерживает гомеостаз за счет сложного взаимодействия между иммунной функцией животного-хозяина, физиологией слизистой оболочки кишечника и эндотелия, и биохимией микробиома кишечника. Продукция муцина и слизи бокаловидными клетками кишечника, неспецифическая активность иммунной системы, модуляция воспаления, опосредованная хемокинами и цитокинами, а также плотные контакты между клетками слизистой оболочки кишечника способствуют здоровой абсорбции питательных веществ и защите от патогенов и токсинов.

Нарушение гомеостаза желудочно-кишечного тракта приводит к негативным последствиям для здоровья и питания животного. Например, нарушение здоровой барьерной функции делает возможным перемещение содержимого кишечника в кровоток хозяина, например, позволяя патогенам и токсинам проникать через слизистую оболочку и эндотелиальный слой и отрицательно воздействовать на животное-хозяина. Воспаление и/или повреждение эпителиальных клеток кишечника снижает способность животного усваивать питательные вещества. У продуктивных животных нарушение здорового желудочно-кишечного гомеостаза желудочно-кишечной системы демонстрирует плохие результаты в отношении питания и здоровья, что приводит к снижению привеса, снижению эффективности питания, снижению выхода мяса, ухудшению качества мяса и более высокой смертности. Для домашних животных нарушение гомеостаза желудочно-кишечного тракта может ухудшать качество жизни и общее состояние здоровья. Следовательно, существует значительная потребность в питательных композициях, включая корма для животных, которые предотвращают и/или лечат дисфункцию желудочно-кишечного барьера.

Изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение направлено на способ лечения или профилактики дисфункции желудочно-кишечного барьера у животного, нуждающегося в этом, включающий введение питательной композиции, содержащей основную питательную композицию и синтетический олигосахаридный препарат, животному, где синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn), где n является целым числом более 3, и где каждая из фракций DP1 и DP2 независимо включает от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, определяемой масс-спектрометрией.

Настоящее изобретение также направлено на способ лечения или профилактики инфекции у животного, нуждающегося в этом, включающий введение питательной композиции, содержащей основную питательную композицию и синтетический олигосахаридный препарат, животному, где синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn), где n является целым числом больше 3, и где каждая из фракций DP1 и DP2 независимо включает от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, определяемой масс-спектрометрией.

Настоящее изобретение также направлено на применение питательной композиции, содержащей основную питательную композицию и синтетический олигосахаридный препарат, у животного, где синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn), где n является целым числом более 3, и где каждая из фракций DP1 и DP2 независимо включает от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, определяемой масс-спектрометрией, для лечения или профилактики дисфункции желудочно-кишечного барьера у животного, нуждающегося в этом.

Согласно изобретению проницаемость желудочно-кишечного барьера животного снижается по сравнению с проницаемостью желудочно-кишечного барьера животного перед применением синтетического олигосахаридного препарата.

Согласно изобретению уменьшение является уменьшением по меньшей мере на 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% относительно проницаемости желудочно-кишечного барьера животного перед применением синтетического олигосахаридного препарата.

Согласно изобретению проницаемость желудочно-кишечного барьера определяют по образцу кро-

ви, фекалий или мочи животного.

Согласно изобретению проницаемость измеряют путем определения уровня по меньшей мере одного вида микробов в образце крови, фекалий или мочи.

Согласно изобретению дисфункция желудочно-кишечного барьера связана с инфекцией или вызвана ею.

Настоящее изобретение также направлено на применение питательной композиции, содержащей основную питательную композицию и синтетический олигосахаридный препарат, у животного, где синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn), где n является целым числом больше 3, и где каждая из фракций DP1 и DP2 независимо включает от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, определяемой масс-спектрометрией, для лечения или профилактики инфекции у животного, нуждающегося в этом.

Согласно изобретению уровень по меньшей мере одной иммунной клетки в образце от животного повышен относительно уровня по меньшей мере одной иммунной клетки в образце от животного до применения питательной композиции, которая содержит синтетический олигосахаридный препарат.

Согласно изобретению увеличение является увеличением по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% или 10% относительно уровня по меньшей мере одной иммунной клетки до применения питательной композиции, содержащей синтетический олигосахаридный препарат.

Согласно изобретению уровень по меньшей мере одного провоспалительного цитокина в образце от животного повышен относительно уровня по меньшей мере одного провоспалительного цитокина в образце от животного до применения питательной композиции, содержащей синтетический олигосахаридный препарат.

Согласно изобретению дисфункция желудочно-кишечного барьера связана с инфекцией или вызвана ею.

Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены сюда посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки. В той степени, в которой публикации и патенты или заявки на патенты, включенные посредством ссылки, противоречат раскрытию, содержащемуся в описании, данное описание предназначено для замены и/или имеет преимущество над любым таким противоречащим материалом.

Краткое описание фигур

Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено со ссылкой на следующее подробное описание, где представлены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы изобретения, и прилагаемые чертежи (также "фигуры" и "фиг. " в настоящем изобретении), где:

фиг. 1 иллюстрирует часть ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР спектра олигосахаридного препарата из примера 9.7;

фиг. 2 иллюстрирует спектр MALDI-MS олигосахаридного препарата из примера 9.7, который демонстрирует присутствие ангидро-субъединиц;

фиг. 3 иллюстрирует 1D ^{1}H-протонный ЯМР-спектр фракции ангидро-DP1, выделенной из олигосахарида из примера 9;

фиг. 4 иллюстрирует ID APT ^{13}C-ЯМР спектр фракции ангидро-DP1, выделенной из олигосахарида из примера 9;

фиг. 5 показывает хроматограммы ГХ-МС (графики TIC и XIC (m/z 229)), показывающие компоненты DP2 и ангидро-DP2 для олигосахаридного препарата 2.9 после дериватизации;

фиг. 6 иллюстрирует ^{1}H, ^{13}C-HSQC спектр олигосахаридного препарата с ангидро-субъединицей от карамелизации;

фиг. 7 иллюстрирует часть спектров MALDI-MS, сравнивающих олигосахаридный препарат из примера 9 при различных энергиях лазера;

фиг. 8A показывает ЖХ-МС/МС детекцию форм ангидро-DP2 при концентрации 1-80 мкг/мл олигосахаридного препарата в воде; фиг. 8B иллюстрирует линейную калибровочную кривую, полученную в результате ЖХ-МС/МС детекции с фиг. 8A;

фиг. 9 показывает количественное определение содержания ангидро-DP2 в различных контрольных и обработанных питательных композициях;

фиг. 10 иллюстрирует спектр 2D-1H JRES ЯМР образца глюко-олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы;

фиг. 11 представляет собой типичный ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР спектр образца глюкоолигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, с соответствующими резонансами и назначениями, используемыми для распределения связей;

фиг. 12 иллюстрирует наложение спектров ^{1}H DOSY трех олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы;

фиг. 13 иллюстрирует сравнение 1,6-ангидро-β-D-глюкозы (DP1-18), 1,6-ангидро-β-D-целобиозы

(DP2-18) и образца олигосахаридов, содержащего ангидро-субъединицы;

фиг. 14 иллюстрирует масс-хроматограммы олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы (вверху), и расщепленных олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы (внизу), при селективном мониторинге множественных реакций (MRM);

фиг. 15 показывает график зависимости относительного содержания от степени полимеризации (DP) олигосахарида из примера 9; на графике показано, что олигосахаридный препарат имеет монотонно убывающее распределение DP;

фиг. 16 показывает график зависимости относительной распространенности от степени полимеризации олигосахарида из примера 9; график показывает, что олигосахаридный препарат имеет не монотонно убывающее распределение DP;

фиг. 17 является графическим изображением здорового желудочно-кишечного барьера и негерметичного желудочно-кишечного барьера;

фиг. 18 является графическим изображением устройства, используемого для оценки целостности здорового кишечного барьера;

фиг. 19 представляет собой проточную цитограмму, показывающую гранулоциты с проглоченными патогенами и без них;

фиг. 20 представляет собой график, показывающий кратное изменение экспрессии иммунных и воспалительных цитокинов и хемокинов в ткани пейеровых бляшек для выбранных генов по меньшей мере с 1,5-кратным увеличением экспрессии;

фиг. 21 показывает камеру для оценки in vitro прямого и косвенного воздействия олигосахаридных препаратов на нарушение функции кишечного барьера, обусловленное рамнолипидным апикальным стрессором;

фиг. 22 представляет собой гистограмму, показывающую кратное изменение экспрессии IL1B, IL4, IL10 и SLC5A10 у птиц, получавших рационы с 500 ч/млн олигосахарида из примера 9.3 (сплошные столбцы), по сравнению с контрольным рационом (белые столбцы); данные показывают повышенную экспрессию генов, связанных с иммунитетом, противовоспалительным ответом и абсорбцией питательных веществ у птиц, получавших олигосахарид из примера 9.3;

фиг. 23 представляет собой гистограмму, показывающую относительную экспрессию гена SLC34A2 в экспериментальных группах A-B, как подробно описано в табл. 26; данные демонстрируют, что олигосахариды из примеров 9.2 и 9.3 приводят к улучшенной абсорбции фосфора в подвздошной кишке, как показывает анализ повышенной экспрессии гена SLC34A2;

фиг. 24 представляет собой микроскопическое изображение ткани подвздошной кишки птиц в экспериментальных группах B и D (группы, определенные в табл. 26); гистология подвздошной кишки выявила значительно меньшее воспаление и увеличение длины ворсинок у бройлеров, получавших рацион, содержащий олигосахариды из примера 9.2;

фиг. 25 представляет собой гистограмму, показывающую процент бокаловидных клеток в экспериментальных группах A, B и D (как определено в табл. 26); данные показывают, что олигосахариды увеличивают количество бокаловидных клеток у бройлеров, подвергшихся воспалительной инфекции (группа B);

фиг. 26 представляет собой гистограмму, показывающую процент лимфоцитов от птиц в экспериментальных группах A, B, C и D (как определено в табл. 26); данные показывают, что у цыплят-бройлеров, получавших избранные олигосахариды из примера 9, отмечена стимуляция увеличения количества Т-хелперов, измеряемых как процент от общего количества лимфоцитов, при воздействии острого воспалительного стимула;

фиг. 27A представляет собой микроскопическое изображение ткани печени цыплят-бройлеров, получавших рацион, содержащий олигосахарид из примера 9.3, со здоровой тканью печени (слева) и тканью, демонстрирующей воспалительное поражение (справа); фиг. 27B показывает гистограмму гистологической оценки повреждений в образцах печени от бройлеров из экспериментальных групп A, B или C (как определено в табл. 26); данные показывают, что в экспериментальной группе C (с кормом, содержащим олигосахарид из примера 9.3) отмечено снижение повреждения печени; фиг. 27C показывает уровень AGP у цыплят-бройлеров в экспериментальных группах A, B и C (как определено в табл. 26); данные показывают снижение острофазового печеночного белка AGP при воспалительной нагрузке;

фиг. 28A представляет собой гистограмму, показывающую уровень IgA в образцах крови цыплят-бройлеров в экспериментальных группах A, B и D на 21 день; данные показывают, что цыплята-бройлеры в экспериментальной группе D проявляли ускоренный иммунный ответ на 21 день; фиг. 28B представляет собой гистограмму, показывающую уровень IgA в образцах крови цыплят-бройлеров в экспериментальных группах A, B и D на 28 день; данные показывают, что цыплята-бройлеры демонстрировали более быстрое восстановление по отношению к исходному уровню контрольной группы A (день 28) при воздействии острого воспалительного стимула на 14-и день;

фиг. 29A представляет собой гистограмму, показывающую уровень диаминоксидазы в образцах крови цыплят-бройлеров в экспериментальных группах A, B и D на 21 день; данные показывают, что цыплята-бройлеры продемонстрировали более быстрое восстановление по отношению к исходному

уровню контрольной группы A, чем птицы, не получавшие олигосахарид, когда подвергались воздействию острого воспалительного стимула на 14-й день; фиг. 29B представляет собой гистограмму, показывающую уровень в образцах крови цыплят-бройлеров в экспериментальных группах A, B и D на 28 день; данные показывают, что цыплята-бройлеры демонстрировали более быстрое восстановление до исходного уровня контрольной группы A, чем птицы, не получавшие олигосахарид, когда подвергались воздействию острого воспалительного стимула на 14-й день;

фиг. 30 показывает два содержащих ангидро-субъединицы олигосахарида из фракции DP1 и один из фракции DP2;

фиг. 31 иллюстрирует олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы (целлотриозан);

фиг. 32A показан спектр MALDI-MS олигосахаридного препарата из примера 2, который демонстрирует присутствие ангидро-субъединиц; фиг. 32B иллюстрирует спектр MALDI-MS олигосахаридного препарата из примера 2, который демонстрирует присутствие ангидро-субъединиц;

фиг. 33A иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 1; фиг. 33B иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 1; фиг. 33C иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 1;

фиг. 34A иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 3; фиг. 34B иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 3; фиг. 34C иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 3.

фиг. 35A иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 4; фиг. 35B иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 4; фиг. 35C иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 4;

фиг. 36A иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 7; фиг. 36B иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 7; фиг. 36C иллюстрирует детекцию посредством ЖХ-МС/МС разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 7;

фиг. 37A иллюстрирует спектр от ГХ-МС детекции с фракциями ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 1; фиг. 37B иллюстрирует увеличение фракций DP2 и ангидро DP2, как показано на фиг. 37A;

фиг. 38A иллюстрирует спектр от ГХ-МС детекции с фракциями ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 3; фиг. 38B иллюстрирует увеличение фракций DP2 и ангидро DP2, как показано на фиг. 38A;

фиг. 39A иллюстрирует спектр от ГХ-МС детекции с фракциями ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 4; фиг. 39B иллюстрирует увеличение фракций DP2 и ангидро DP2, как показано на фиг. 39A;

фиг. 40A иллюстрирует спектр от ГХ-МС детекции с фракциями ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2 олигосахаридного препарата из примера 7; фиг. 40B иллюстрирует увеличение фракций DP2 и ангидро DP 2, как показано на фиг. 40A;

фиг. 41 иллюстрирует влияние температуры реакции, содержания воды и времени реакции на количество олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы DP2, в олигосахаридных препаратах по сравнению с олигосахаридным препаратом согласно примеру 2;

фиг. 42 иллюстрирует назначения ЯМР 1,6-ангидро-бета-D-глюкофуранозы и 1,6-ангидро-бета-D-глюкопиранозы;

фиг. 43 иллюстрирует спектры MALDI-MS, сравнивающие олигосахаридный препарат из примера 9 при различных энергиях лазера.

Подробное описание изобретения

Следующее ниже описание и примеры подробно иллюстрируют варианты осуществления настоящего изобретения. Следует понимать, что это настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем изобретении, и как таковое может варьировать. Специалисты в данной области техники поймут, что существуют многочисленные вариации и модификации этого настоящего изобретения, которые входят в его объем.

Все термины предназначены для понимания так, как они будут поняты специалисту в данной области техники. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится изобретение.

Заголовки разделов, используемые в настоящем изобретении, предназначены только для организа-

ционных целей и не должны толковаться как ограничивающие описанный предмет.

Хотя различные признаки настоящего изобретения могут быть описаны в контексте единственного варианта осуществления, эти признаки также могут быть предоставлены отдельно или в любой подходящей комбинации. И наоборот, хотя настоящее изобретение может быть описано здесь в контексте отдельных вариантов осуществления для ясности, настоящее изобретение также может быть реализовано в одном варианте осуществления.

Следующие ниже определения дополняют определения в данной области техники и относятся к текущей заявке и не должны относиться к какому-либо связанному или не связанному случаю, например, к какому-либо общему патенту или заявке. Хотя любые методы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, могут быть использованы на практике для тестирования настоящего изобретения, здесь описаны предпочтительные материалы и методы. Соответственно, используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

I. Определения.

Используемая в настоящем изобретении терминология предназначена только для описания конкретных случаев и не предназначена для ограничения. Используемые здесь формы единственного числа предназначены для включения и форм множественного числа, если контекст явно не указывает иное. Кроме того, в той степени, в которой термины "включающий", "включает", "имеющий", "имеет", "с" или их варианты используются в подробном описании и/или формуле изобретения, такие термины предназначены для включения аналогично термину "содержащий".

Понятно, что такие термины, как "содержит", "содержащий" и т.п. имеют значение, приписываемое им в Патентном законодательстве США; т.е. они означают "включает", "включен", "включающий" и т.п. и предназначены для включения или расширения и не исключают дополнительных, не перечисленных элементов или этапов способа; и что такие термины, как "состоящий по существу из" и "состоит по существу из", имеют значение, приписываемое им в Патентном законодательстве США; то есть они допускают элементы, не перечисленные явно, но исключают элементы, которые встречаются в предшествующем уровне техники или которые влияют на основные или новые характеристики изобретения.

Термин "и/или", используемый здесь во фразе, такой как "A и/или B", предназначен для включения как A, так и B; A или B; A (отдельно); и B (отдельно). Аналогичным образом, термин "и/или", используемый во фразе, такой как "A, B и/или C", предназначен для охвата каждого из следующих вариантов осуществления: A, B и C; A, B или C; A или B; A или C; B или C; A и B; A и C; B и C; A (отдельно); B (отдельно); и C (отдельно).

Когда в настоящем изобретении используются диапазоны физических свойств, таких как молекулярная масса, или химические свойства, такие как химические формулы, предполагается, что все комбинации и субкомбинации диапазонов и конкретные варианты осуществления в них включены. Термин "примерно" при ссылке на число или числовой диапазон означает, что указанное число или числовой диапазон является приблизительным в пределах экспериментальной вариабельности (или в пределах статистической экспериментальной ошибки), и, таким образом, число или числовой диапазон в некоторых случаях будет варьировать от 1% до 15% от указанного числа или числового диапазона. В некоторых вариантах осуществления термин "примерно" означает в пределах 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, или 0,05% от заданного значения или диапазона.

Используемый в настоящем изобретении термин "применение" включает обеспечение синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции, жидкости или кормовой композиции для животных, описанных в настоящем изобретении, для животного таким образом, чтобы животное могло потреблять синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, жидкость или кормовую композицию для животных. В таких вариантах осуществления животное поглощает некоторую часть синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции или кормовой композиции для животных. В некоторых вариантах осуществления указанный животному дают синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, жидкость или кормовую композицию для животных, так что животное может потреблять синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, жидкость или кормовую композицию для животных по желанию. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, жидкость или кормовую композицию для животных применяют у указанного животного в виде предписанного рациона. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, жидкость или кормовую композицию для животных применяют у указанного животного посредством ручного кормления, например, кормления из орального шприца, кормления через зонд и т.д. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, жидкость или кормовую композицию для животных вводят указанному животному перорально, например, для самостоятельного приема или ручного кормления. В некоторых вариантах осуществления животное поглощает некоторую часть синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции, жидкости или кормовой композиции для животных каждые 24 ч или каждые вторые сутки в течение по меньшей мере 7 дней, 14 дней, 21 дней, 30 дней, 45 дней, 60 дней, 75 дней, 90 дней или 120 дней. В

некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат может быть растворен в воде или другой жидкости, и животное поглощает некоторую часть олигосахаридного препарата, выпивая жидкость. В некоторых вариантах осуществления олигосахарид доставляют животному через питьевую воду. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат, питательная композиция, жидкость или кормовая композиция для животных потребляются по желанию.

Используемый в настоящем изобретении термин "коэффициент конверсии корма (FCR)" ознаает отношение массы затраченного корма (например, потребляемого животным) к животному продукту, при этом животный продукт представляет собой целевой продукт животного происхождения. Например, животным продуктом для молочных животных является молоко, тогда как животным продуктом для мясных животных является масса тела.

Используемый в настоящем изобретении термин "эффективность питания" относится к отношению животного продукта к количеству затраченного корма (например, потребленного животным), при этом животный продукт представляет собой целевой продукт животного происхождения.

Используемый в настоящем изобретении термин "ангидро-субъединица" относится к продукту термической дегидратации моносахарида (или моносахаридной субъединицы) или продукту карамелизации сахара. Например, "ангидро-субъединица" может представлять собой ангидро-моносахарид, такой как ангидро-глюкоза. В качестве другого примера "ангидро-субъединица" может быть связана с одной или несколькими регулярными или ангидро-моносахаридными субъединицами через гликозидную связь.

Термин "олигосахарид" относится к моносахариду или соединению, содержащему две или более моносахаридных субъединиц, связанных гликозидными связями. По существу, олигосахарид включает обычный моносахарид, ангидро-моносахарид или соединение, содержащее две или более моносахаридных субъединиц, где одна или более моносахаридных субъединиц при необходимости независимо заменены одной или несколькими ангидро-субъединицами. Олигосахарид может быть функционализирован. Используемый в настоящем изобретении термин "олигосахарид" охватывает все виды олигосахаридов, где каждая моносахаридная субъединица в олигосахариде независимо и необязательно функционализирована и/или заменена соответствующей ангидромоносахаридной субъединицей.

Используемый в настоящем изобретении термин "олигосахаридный препарат" относится к препарату, который содержит по меньшей мере один олигосахарид.

Используемый в настоящем изобретении термин "глюко-олигосахарид" относится к глюкозе или соединению, содержащему две или более субъединиц моносахарида глюкозы, связанных гликозидными связями. По существу, глюко-олигосахарид включает глюкозу, ангидро-глюкозу или соединение, содержащее две или более субъединиц моносахарида глюкозы, связанных гликозидными связями, причем каждая из указанных субъединиц моносахарида глюкозы при необходимости и независимо заменена субъединицей ангидро-глюкозы.

Используемый в настоящем изобретении термин "галакто-олигосахарид" относится к галактозе или соединению, содержащему две или более субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями. По существу, галакто-олигосахарид включает галактозу, ангидро-галактозу или соединение, содержащее две или более субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями, где каждая из указанных субъединиц моносахарида галактозы при необходимости и независимо заменена субъединицей ангидро-галактозы.

Используемый в настоящем изобретении термин "глюко-галакто-олигосахаридный препарат" относится к композиции, которую получают в результате реакции полной или неполной конденсации сахаров глюкозы и галактозы. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления глюко-галактозо-олигосахаридный препарат включает глюко-олигосахариды, галакто-олигосахариды, соединения, содержащие одну или несколько субъединиц моносахарида глюкозы и одну или несколько субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления глюко-галактозо-олигосахаридный препарат включает глюко-олигосахариды и соединения, содержащие одну или несколько субъединиц моносахарида глюкозы и одну или несколько субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления глюко-галактозо-олигосахаридный препарат включает галакто-олигосахариды и соединения, содержащие одну или несколько субъединиц моносахарида глюкозы и одну или несколько субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления глюко-галактозо-олигосахаридный препарат включает соединения, содержащие одну или несколько субъединиц моносахарида глюкозы и одну или несколько субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями.

Используемые в настоящем изобретении термины "моносахаридная единица" и "моносахаридная субъединица" используются взаимозаменяемо. "Моносахаридная субъединица" относится к мономеру моносахарида в олигосахариде. Для олигосахарида, имеющего степень полимеризации 1, олигосахарид может называться моносахаридной субъединицей или моносахаридом. Для олигосахарида, имеющего степень полимеризации 2 или выше, его моносахаридные субъединицы связаны гликозидными связями.

Используемый в настоящем изобретении термин "регулярный моносахарид" относится к моносахариду, который не содержит ангидро-субъединицу. Термин "регулярный дисахарид" относится к дисаха-

риду, который не содержит ангидро-субъединицу. Соответственно, термин "регулярная субъединица" относится к субъединице, которая не является ангидро-субъединицей.

Термин "относительная распространенность" или "распространенность" в контексте настоящего описания относится к распространенности вида с точки зрения того, насколько часто или редко встречается этот вид. Например, фракция DP1, включающая 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, может относиться к множеству олигосахаридов DP1, где 10% олигосахаридов DP1 представляют собой ангидромоносахариды. Относительную распространенность, например, для определенной фракции DP олигосахаридов, можно определить с помощью подходящих аналитических инструментов, например, масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии, такой как ЖХ-МС/МС, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС и MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность определяют путем интегрирования площади под пиками на хроматографах (например, ЖХ-МС/МС, ГХ-МС и ВЭЖХ-МС), которые соответствуют интересующим фракциям. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность определяют по интенсивности пиков (например, MALDI-MS). В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность определяют комбинацией аналитических методов, таких как определение массы после разделения с помощью жидкостной хроматографии.

Используемый в настоящем изобретении термин "ангидро-DPn-олигосахарид", "ангидро-DPn-разновидность" или "олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицу DPn" относится к олигосахариду, который имеет степень полимеризации n и включает ангидро-субъединицы. По существу, ангидроглюкоза представляет собой олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицу DP1, а целлотриозан представляет собой олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицу DP3.

Используемые в настоящем изобретении формы единственного числа включают множественное число, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на термин "агент" включает множество таких агентов, а ссылка на "олигосахарид" включает ссылку на один или несколько олигосахаридов (или на множество олигосахаридов) и их эквиваленты, известные специалистам в данной области техники, и так далее.

II. Олигосахаридный препарат.

В настоящем изобретении раскрыты олигосахаридные препараты, подходящие для использования в питательных композициях. В некоторых вариантах осуществления указанный олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn), где n является целым числом, равным 2 или более. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число более 2. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций от 1 до n в олигосахаридном препарате независимо включает от 0,1% до 90% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов в каждой фракции монотонно уменьшается со степенью полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное 3 или более. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100, например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 или 50. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракции от 1 до n в олигосахаридном препарате независимо включает от 0,1% до 90% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии или ЖХ-МС/МС или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций от 1 до n в олигосахаридном препарате независимо включает примерно от 0,1 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций от 1 до n в олигосахаридном препарате независимо включает примерно от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция из DP1 и DP2 независимо включает примерно от 0,1 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной масс-спектрометрией, такой как MALDI-MS, или ЖХ-МС/МС или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция из DP1 и DP2 независимо включает примерно от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция из DP1 и DP2 независимо включает примерно от 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,8%, 1%, 2% или 3% до примерно 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% или 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной масс-спектрометрией, ЖХ-МС/МС или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов в каждой фракции монотонно уменьшается со степенью полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат представляет собой синтетический олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат относится к множеству олигосахаридов, полученных способом, не требующим живых организмов. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат относится к множеству олигосахаридов, полученных с помощью процесса, который не требует ферментов. В некото-

рых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат относится к множеству олигосахаридов, полученных химическим способом. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат относится к множеству олигосахаридов, полученных конденсацией сахаров.

А. Пребиотическая ценность олигосахаридов.

В настоящем изобретении раскрыты олигосахаридные препараты, содержащие ангидро-сахарные компоненты и/или компоненты продукта дегидратации сахара, которые демонстрируют сложную функциональную модуляцию микробного сообщества, такого как микробном кишечника животных. Олигосахаридные препараты обеспечивают пользу для регуляции использования ферментируемого углерода микрофлорой и прямого метаболического потока к полезным видам, обеспечивая, таким образом, опосредованное микробиомом улучшение здоровья или питания.

Неперевариваемые углеводы могут действовать как пребиотики, обеспечивая ферментируемый источник углерода для микробного сообщества. Например, рационы, богатые растворимой растительной клетчаткой, были идентифицированы по их способности питать микрофлору кишечника. Кроме того, бифидогенные пребиотики поддерживают рост бифидобактерий (например, представителей рода Bifidobacterium), а лактогенные пребиотики поддерживают рост видов Lactobacillus.

Пребиотические волокна могут быть ферментированы до полезных химических веществ, таких как короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК). Пребиотические волокна включают устойчивые крахмалы; целлюлозу; пектины, такие как рамногалактаны, арабиногалактаны, арабинаны; гемицеллюлозы, такие как арабиноксиланы, ксилоглюканы, глюкоманнаны, галактоманнаны; ксиланы, такие как олигосахариды кукурузного початка; b-глюканы, такие как b-глюканы злаков, дрожжевые b-глюканы, бактериальные b-глюканы; полифруктаны, такие как инулин и леван; и камеди, такие как альгинат. Инулин - это обычное бифидогенное пребиотическое волокно.

В других случаях пребиотики действуют, препятствуя способности патогенных бактерий приживаться и, таким образом, инфицировать организм-хозяин, через такие механизмы противодействия, как конкурентное связывание рецепторов на клеточной поверхности. Некоторые галакто-олигосахариды эффективно препятствуют адгезии различных энтеропатогенных организмов, таких как виды Escherichia.

Пребиотики обычно применяют у животного-хозяина путем включения в рацион, при котором они проявляют дозозависимый ответ (по меньшей мере, до порога насыщения). Например, применение более высокой дозы бифидогенного пребиотика, такого как инулин, имеет тенденцию к большему увеличению популяции видов Bifidobacterium. Более высокие дозы инулина соответствуют более высокому производству КЦЖК посредством ферментации. Это связано с тем, что пребиотик является источником метаболического углерода, и большее количество углерода превращается в более ферментированный продукт. Точно так же применение более высокой дозы пребиотика против адгезии обеспечивает вероятность конкурентного связывания участков поверхностных рецепторов.

Определенные виды углеводов, содержащие модифицированные мономерные субъединицы, могут влиять на способ, которым микробные системы используют другие углеводы, в противном случае доступные им в качестве источника пребиотиков. Например, такие виды углеводов могут быть модифицированными видами углеводов, которые модулируют систему утилизации бактериального крахмала (SUS), то есть белки, ответственные за распознавание на клеточной поверхности, гликозидное расщепление и импорт метаболитов крахмала.

Углеводные композиции, способные к комплексной модуляции микробиоты животных, можно использовать в качестве кормовых добавок, которые улучшают здоровье и питание животных за счет воздействия на микробном животных. Например, модуляция выработки бутирата микрофлорой кишечника приносит пользу для здоровья животного, способствуя здоровой слизистой оболочке кишечника, барьерной функции, и обеспечивая противовоспалительное действие. Модуляция выработки пропионовой кислоты влияет на метаболическую энергию, извлекаемую из рациона животного, за счет увеличения глюконеогенеза. Соответствующие микробные сообщества включают, например, микробиоту подвздошной кишки, тощей кишки, слепой кишки и/или фекалий у домашних птиц, свиней, собак, кошек, лошадей, или микробиоту жвачных животных у крупного рогатого скота, коров, овец и т.д. Другие микробные сообщества включают микрофлору кожи, микрофлору носа и др.

Кроме того, описанные в настоящем изобретении олигосахаридные препараты имеют преимущество в том, что они могут быть выборочно проанализированы и количественно определены в сложной питательной композиции, такой как комбикорм для животных, благодаря присутствию ангидро-субъединиц. Коммерчески полезен анализ присутствия и/или концентрации кормовых добавок, таких как олигосахаридные препараты. Такой анализ может быть выполнен с целью контроля качества, чтобы определить, была ли добавка надлежащим образом смешана с основной питательной композицией для получения итоговой питательной композиции, содержащей добавку в намеченной дозе или уровне включения.

Однако сами питательные композиции содержат большое количество и разнообразие углеводных структур (например, крахмал, растительные волокна и пектины). Поэтому особенно сложно отличить небольшие количества кормовых добавок на основе олигосахаридов от огромного количества других углеводов, присутствующих в качестве основы питательной композиции. Таким образом, описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат обеспечивает средство отличия от других источни-

ков углеводов в питательной композиции посредством ангидро-субъединиц.

B. Распределение по степени полимеризации (DP).

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции DP1-DPn). В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит n фракций олигосахаридов, где каждая фракция имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции DP1-DPn). Например, в некоторых вариантах осуществления фракция DP1 содержит один или несколько моносахаридов и/или один или несколько ангидро-моносахаридов. В качестве другого примера, в некоторых вариантах осуществления фракция DP1 включает глюкозу, галактозу, фруктозу, 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозу, 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозу или любую их комбинацию. В качестве еще одного примера, в некоторых вариантах осуществления фракция DP2 содержит один или несколько регулярных дисахаридов и один или несколько дисахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 содержит лактозу.

В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34, по меньшей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по меньшей мере 42, по меньшей мере 43, по меньшей мере 44, по меньшей мере 45, по меньшей мере 46, по меньшей мере 47, по меньшей мере 48, по меньшей мере 49, по меньшей мере 50, по меньшей мере 51, по меньшей мере 52, по меньшей мере 53, по меньшей мере 54, по меньшей мере 55, по меньшей мере 56, по меньшей мере 57, по меньшей мере 58, по меньшей мере 59, по меньшей мере 60, по меньшей мере 61, по меньшей мере 62, по меньшей мере 63, по меньшей мере 64, по меньшей мере 65, по меньшей мере 66, по меньшей мере 67, по меньшей мере 68, по меньшей мере 69, по меньшей мере 70, по меньшей мере 71, по меньшей мере 72, по меньшей мере 73, по меньшей мере 74, по меньшей мере 75, по меньшей мере 76, по меньшей мере 77, по меньшей мере 78, по меньшей мере 79, по меньшей мере 80, по меньшей мере 81, по меньшей мере 82, по меньшей мере 83, по меньшей мере 84, по меньшей мере 85, по меньшей мере 86, по меньшей мере 87, по меньшей мере 88, по меньшей мере 89, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99, или по меньшей мере 100. В некоторых вариантах осуществления n равно 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100. В некоторых вариантах осуществления n составляет менее 10, менее 11, менее 12, менее 13, менее 14, менее 15, менее 16, менее 17, менее 18, менее 19, менее 20, менее 21, менее 22, менее 23, менее 24, менее 25, менее 26, менее 27, менее 28, менее 29, менее 30, менее 31, менее 32, менее 33, менее 34, менее 35, менее 36, менее 37, менее 38, менее 39, менее 40, менее 41, менее 42, менее 43, менее 44, менее 45, менее 46, менее 47, менее 48, менее 49, менее 50, менее 51, менее 52, менее 53, менее 54, менее 55, менее 56, менее 57, менее 58, менее 59, менее 60, менее 61, менее 62, менее 63, менее 64, менее 65, менее 66, менее 67, менее 68, менее 69, менее 70, менее 71, менее 72, менее 73, менее 74, менее 75, менее 76, менее 77, менее 78, менее 79, менее 80, менее 81, менее 82, менее 83, менее 84, менее 85, менее 86, менее 87, менее 88, менее 89, менее 90, менее 91, менее 92, менее 93, менее 94, менее 95, менее 96, менее 97, менее 98, менее 99 или менее 100. В некоторых вариантах осуществления n составляет от 2 до 100, от 5 до 90, от 10 до 90, от 10 до 80, от 10 до 70, от 10 до 60, от 10 до 50, от 10 до 40, от 10 до 30, от 15 до 60, от 15 до 50, от 15 до 45, от 15 до 40, от 15 до 35 или от 15 до 30.

Распределение степени полимеризации олигосахаридного препарата может быть определено любым подходящим аналитическим методом и оборудованием, включая метод концевых групп, осмотическое давление (осмометрию), ультрацентрифугирование, измерение вязкости, метод светорассеяния, эксклюзионную хроматографию (SEC), SEC-MALLS, проточное фракционирование в силовом поле (ПФП), проточное фракционирование под влиянием асимметричного силового поля (A4F), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и масс-спектрометрию (МС), но не ограничиваясь ими. Например, распределение степени полимеризации может быть определено и/или обнаружено с помощью масс-спектрометрии, такой как масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI)-MS, жидкостной хроматографии (ЖХ)-МС или газовой хроматографии (ГХ)-МС. В другом примере распределение степени полимеризации может быть определено и/или обнаружено с помощью SEC, такой как гель-проникающая хроматография (ГПХ). В качестве еще одного примера распределение степени полимеризации можно определить и/или обнаружить с помощью ВЭЖХ, ПФП или A4F. В некоторых вариантах осуществления распределение степени полимеризации определяют

и/или выявляют с помощью MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления распределение степени полимеризации определяют и/или обнаруживают с помощью ГХ-МС или ЖХ-МС. В некоторых вариантах осуществления распределение степени полимеризации определяют и/или обнаруживают с помощью SEC. В некоторых вариантах осуществления распределение степени полимеризации определяют и/или обнаруживают с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления распределение степени полимеризации определяют и/или обнаруживают с помощью комбинации аналитических инструментов, таких как MALDI-MS и SEC. В некоторых вариантах осуществления степень полимеризации олигосахаридного препарата может быть определена на основании его молекулярной массы и молекулярно-массового распределения. Например, фиг. 2 показывает спектр MALDI-MS, который иллюстрирует степени полимеризации различных фракций и присутствие олигосахаридов, содержащих ангидросубъединицы (смещение пиков -18 г/моль MW) во всех наблюдаемых фракциях.

В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов в большинстве фракций монотонно уменьшается со степенью полимеризации. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов менее 6, менее 5, менее 4, менее 3 или менее 2 фракций олигосахаридного препарата не уменьшается монотонно со степенью его полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов по меньшей мере в 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45 или по меньшей мере 50 фракциях DP монотонно уменьшается со степенью полимеризации. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенности олигосахаридов по меньшей мере в 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45 или по меньшей мере 50 последовательных фракциях DP монотонно уменьшается со степенью полимеризации. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов по меньшей мере в 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30 фракциях DP монотонно уменьшается со степенью полимеризации. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов по меньшей мере в 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30 последовательных фракциях DP монотонно уменьшается со степенью полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов в каждой из n фракций монотонно уменьшается со степенью полимеризации. Например, фиг. 15 представляет собой пример распределения DP, где относительная распространенность олигосахаридов в каждой из n фракций монотонно уменьшается с DP. Например, в некоторых вариантах осуществления только относительная распространенность олигосахаридов во фракции DP3 не уменьшается монотонно со степенью полимеризации, т.е. относительная распространенность олигосахаридов во фракции DP3 ниже, чем относительная распространенность олигосахаридов во фракции DP4. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов во фракции DP2 ниже, чем относительная распространенность олигосахаридов во фракции DP3. Например, фиг. 16 иллюстрирует распределение по степени полимеризации, при которой относительная распространенность олигосахаридов во фракции DP2 не уменьшается монотонно со степенью полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP1 примерно от 1% до 50%, примерно от 1% до 40%, примерно от 1% до 35%, примерно от 1% до 30%, примерно от 1% до 25%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 5% до 50%, примерно от 5% до 40%, примерно от 5% до 35%, примерно от 5% до 30%, примерно от 5% до 25%, примерно от 5% до 20%, примерно от 5% до 15%, примерно от 10% до 50%, примерно от 10% до 40%, примерно от 10% до 35%, примерно от 10% до 30%, примерно от 10% до 25%, примерно от 10% до 20% или примерно от 10% до 15% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP1 примерно от 10% до 35%, примерно от 10% до 20% или примерно от 10% до 15% по массе или относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP1 определяют путем MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP1 определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP1 определяют с помощью ЖХ-МС/МС или ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP2 примерно от 1% до 35%, примерно от 1% до 30%, примерно от 1% до 25%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 5% до 30%, примерно от 5% до 25%, примерно от 5% до 20%, примерно от 5% до 15%, или примерно от 5% до 10% по массе или относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP2 примерно от 5% до 25%, примерно от 5% до 20%, примерно от 5% до 15%, или примерно от 5% до 10% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP2 определяют посредством MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP2 определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP2 определяют с помощью ЖХ-МС/МС или

ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления описанный здесь олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP3 примерно от 1% до 30%, примерно от 1% до 25%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 5% до 30%, примерно от 5% до 25%, примерно от 5% до 20%, примерно от 5% до 15%, или примерно от 5% до 10% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP3 примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 5% до 15% или примерно от 5% до 10% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах содержание фракции DP3 определяют с помощью MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP3 определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP3 определяют с помощью ЖХ-МС/МС или ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP4 примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,1% до 15%, примерно от 0,1% до 10%, примерно от 0,1% до 5%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10% или примерно от 1% до 5% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP4 примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, или примерно от 1% до 5% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP5 примерно от 0,1 до 15%, примерно от 0,1% до 10%, примерно от 0,1% до 5%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10% или примерно от 1% до 5% по массе или относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP5 примерно от 1% до 10% или примерно от 1% до 5% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP4 и/или DP5 определяют с помощью MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP4 и/или DP5 определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP4 и/или DP5 определяют с помощью ЖХ-МС/МС или ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления отношение фракции DP2 к фракции DP1 в олигосахаридном препарате составляет примерно от 0,01 до 0,8, примерно от 0,02 до 0,7, примерно от 0,02 до 0,6, примерно от 0,02 до 0,5, примерно от 0,02 до 0,4, примерно от 0,02 до 0,3, примерно от 0,02 до 0,2, примерно от 0,1 до 0,6, примерно от 0,1 до 0,5, примерно от 0,1 до 0,4 или примерно от 0,1 до 0,3 по их массе или относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления отношение фракции DP2 к фракции DP1 в олигосахаридном препарате составляет примерно от 0,02 до 0,4 по их массе или относительной распространенности.

В некоторых вариантах осуществления отношение фракции DP3 к фракции DP2 в олигосахаридном препарате составляет примерно от 0,01 до 0,7, примерно от 0,01 до 0,6, примерно от 0,01 до 0,5, примерно от 0,01 до 0,4, примерно от 0,01 до 0,3 или примерно от 0,01 до 0,2 по массе или относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления отношение фракции DP3 к фракции DP2 в олигосахаридном препарате составляет примерно от 0,01 до 0,3 по массе или относительной распространенности.

В некоторых вариантах осуществления совокупное содержание фракций DP1 и DP2 в олигосахаридном препарате составляет менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, или менее 10% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления совокупное содержание фракций DP1 и DP2 в олигосахаридном препарате составляет менее 50%, менее 30% или менее 10% по массе или по относительной распространенности.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат, описанный в настоящем изобретении, имеет среднее значение DP в диапазоне от 2 до 10. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет среднее значение DP примерно от 2 до 8, примерно от 2 до 5 или примерно от 2 до 4. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет среднее значение DP примерно 3,5. Среднее значение DP может быть определено с помощью SEC или элементного анализа.

С. Уровень ангидро-субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления каждая из n фракций олигосахаридов в описанном в настоящем изобретении олигосахаридном препарате независимо включает уровень ангидро-субъединиц. Например, в некоторых вариантах осуществления фракция DP1 содержит примерно 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, а фракция DP2 включает примерно 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В другом примере, в некоторых вариантах осуществления каждая фракция из DP1, DP2 и DP3 содержит примерно 5%, примерно 10% и примерно 2% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, соответственно. В некоторых вариантах осуществления две или более фракций олигосахаридов содержат аналогичные уровни олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. Например, в некоторых вариантах осуществления каждая фракция из DP1 и DP3 содержит примерно 5% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности.

В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций от 1 до n в описанном в настоящем изо-

бретении олигосахаридном препарате независимо включает примерно от 0,1 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии, ЖХ-МС/МС или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций от 1 до n в олигосахаридном препарате независимо включает примерно от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии, ЖХ-МС/МС или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления ЖХ-МС/МС используют для определения относительной распространенности олигосахаридов во фракциях DP1, DP2 и/или DP3. В некоторых вариантах осуществления ГХ-МС или ЖХ-МС/МС используют для определения относительной распространенности олигосахаридов во фракциях DP1, DP2 и/или DP3. В некоторых вариантах осуществления MALDI-MS используют для определения относительной распространенности олигосахаридов во фракции DP4 или во фракции с более высокой DP. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность определенной фракции определяют путем интегрирования площади под пиками хроматограммы ЖХ-МС/МС, которые обозначены как соответствующие этой фракции. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность определенной фракции вычисляют путем интегрирования площади под пиками хроматограммы ГХ-МС, которые обозначены как соответствующие этой фракции.

Уровень ангидро-субъединиц можно определять и/или обнаруживать любыми подходящими аналитическими методами, такими как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрия, ВЭЖХ, ПФП, A4F или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления уровень олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют, по меньшей мере частично, масс-спектрометрией, такой как MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления уровень ангидро-субъединиц определяют, по меньшей мере частично, с помощью ЯМР. В некоторых вариантах осуществления уровень олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют, по меньшей мере частично, с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления уровень олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью MALDI-MS, как показано пиками, смещенными на -18 г/моль MW на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления присутствие и тип разновидностей ангидро-субъединиц определяют и/или обнаруживают с помощью ЯМР, как проиллюстрировано в примере 11 на фиг. 3 и фиг. 4. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ЖХ-МС/МС, как показано на фиг. 33A-33C, 34A-34C, 35A-35C и 36A-36C. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ГХ-МС, как показано на фиг. 37A-37B, 38A-38B, 39A-39B и 40A-40B.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее чем 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3% или менее 2% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает более 0,5%, более 0,8%, более 1%, более 2%, более 3%, более 4%, более 5%, более 6%, более 7%, более 8%, более 9%, более 10%, более 11%, более 12%, более 13%, более 14%, более 15%, более 16%, более 17%, более 18%, более 19%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%, более 60%, более 70%, или более 80% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает более 20%, более 21%, более 22%, более 23%, более 24%, более 25%, более 26%, более 27%, более 28%, более 29% или более 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция (такая как DP1, DP2 и/или DP3) олигосахаридного препарата содержит примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 1,5%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16%, примерно 17%, примерно 18%, примерно 19%, примерно 20%, примерно 21%, примерно 22%, примерно 23%, примерно 24%, примерно 25% или примерно 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция (такая как DP1, DP2 и/или DP3) олигосахаридного препарата содержит примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, при-

мерно 0,9%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция (такая как DP1, DP2 и/или DP3) олигосахаридного препарата содержит примерно от 0,1% до 90%, примерно от 0,5% до 90%, примерно от 0,5% до 80%, примерно от 0,5% до 70%, примерно от 0,5% до 60%, примерно от 0,5% до 50%, примерно от 0,5% до 40%, примерно от 0,5% до 30%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5% до 9%, примерно от 0,5% до 8%, примерно от 0,5% до 7%, примерно от 0,5% до 6% примерно от 0,5% до 5%, примерно от 0,5% до 4%, примерно от 0,5% до 3%, примерно от 0,5% до 2%, примерно от 1% до 10%, примерно от 2% до 9%, примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 7%, примерно от 2% до 6%, примерно от 2% до 5%, примерно от 2% до 4%, примерно от 2% до 3%, или примерно от 5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций DP1 и DP2 олигосахаридного препарата независимо включает олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, в диапазоне примерно от 0,1%; 0,5%; 0,6%; 0,7%; 0,8%; 0,9%; 1%; 1,1%; 1,2%; 1,3%; 1,4% или 1,5% до примерно 8%, 9%, 10%, 11%, 12% или 15% по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии, ЖХ-МС/МС или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция DP1 и DP2 независимо включает примерно от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии или ЖХ-МС/МС или ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция описанного здесь олигосахаридного препарата содержит менее 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% или 2% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В других вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит более 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В других вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит более 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% или 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 1,5%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16%, примерно 17%, примерно 18%, примерно 19%, примерно 20%, примерно 21%, примерно 22%, примерно 23%, примерно 24%, примерно 25% или примерно 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает примерно от 0,1% до 90%, примерно от 0,1 до 15%, примерно от 0,5% до 90%, примерно от 0,5% до 80%, примерно от 0,5% до 70%, примерно от 0,5% до 60%, примерно от 0,5% до 50%, примерно от 0,5% до 40%, примерно от 0,5% до 30%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5% до 9%, примерно от 0,5% до 8%, примерно от 0,5% до 7%, примерно от 0,5% до 6%, примерно от 0,5% до 5%, примерно от 0,5% до 4%, примерно от 0,5% до 3%, примерно от 0,5% до 2%, примерно от 2% до 9%, примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 7%, примерно от 2% до 6%, примерно от 2% до 5%, примерно от 2% до 4%, примерно от 2% до 3% или примерно от 5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит менее 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% или 2% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной рас-

пространенности. В других вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит более 0,5%, более 0,8%, более 1%, более 2%, более 3%, более 4%, более 5%, более 6%, более 7%, более 8%, более 9%, более 10%, более 11%, более 12%, более 13%, более 14%, более 15%, более 16%, более 17%, более 18%, более 19%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%, более 60%, более 70% или более 80% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В других вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит более 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% или 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16%, примерно 17%, примерно 18%, примерно 19%, примерно 20%, примерно 21%, примерно 22%, примерно 23%, примерно 24%, примерно 25% или примерно 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 1,5%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает примерно от 0,1% до 90%, примерно от 0,1 до 15%, примерно от 0,5% до 90%, примерно от 0,5% до 80%, примерно от 0,5% до 70%, примерно от 0,5% до 60%, примерно от 0,5% до 50%, примерно от 0,5% до 40%, примерно от 0,5% до 30%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5% до 9%, примерно от 0,5% до 8%, примерно от 0,5% до 7%, примерно от 0,5% до 6%, примерно от 0,5% до 5%, примерно от 0,5% до 4%, примерно от 0,5% до 3%, примерно от 0,5% до 2%, примерно от 2% до 9%, примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 7%, примерно от 2% до 6%, примерно от 2% до 5%, примерно от 2% до 4%, примерно от 2% до 3% или примерно от 5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности.

В некоторых вариантах осуществления фракция DP1 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит менее 30%, менее 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP1 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает более 0,1%, более 0,5%, более 0,8%, более 1%, более 1,5%, более 2%, более 3%, более 4%, более 5%, более 6%, более 7%, более 8%, более 9%, более 10%, более 11%, более 12%, более 13%, более 14% или более 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP1 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит примерно 0,5%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16% примерно 17%, примерно 18%, примерно 19% или примерно 20% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP1 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит примерно от 0,1 до 15%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5 до 15%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 2% до 14%, примерно от 3% до 13%, примерно от 4% до 12%, примерно от 5% до 11%, примерно от 5% до 10%, примерно от 6% до 9% или примерно от 7% до 8% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, или в любых интервалах между ними. В некоторых вариантах осуществления фракция DP1 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает примерно от 5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью масс-спектрометрии, такой как MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит менее 30%, менее 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает более 0,1%, более

0,5%, более 0,8%, более 1%, более 1,5%, более 2%, более 3%, более 4%, более 5%, более 6%, более 7%, более 8%, более 9%, более 10%, более 11%, более 12%, более 13%, более 14% или более 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит примерно 0,5%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16%, примерно 17%, примерно 18%, примерно 19% или примерно 20% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит примерно от 0,1 до 15%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5 до 15%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 2% до 14%, примерно от 3% до 13%, примерно от 4% до 12%, примерно от 5% до 11%, примерно от 5% до 10%, примерно от 6% до 9%, или примерно от 7% до 8% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, или в любых диапазонах между ними. В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает примерно от 5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью масс-спектрометрии, такой как MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления фракция DP3 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит менее 30%, менее 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP3 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата включает более 0,1%, более 0,5%, более 0,8%, более 1%, более 1,5%, более 2%, более 3%, более 4%, более 5%, более 6%, более 7%, более 8%, более 9%, более 10%, более 11%, более 12%, более 13%, более 14% или более 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP3 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит примерно 0,5%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16% примерно 17%, примерно 18%, примерно 19% или примерно 20% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP3 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит примерно от 0,1 до 15%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5 до 15%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 2% до 14%, примерно от 3% до 13%, примерно от 4% до 12%, примерно от 5% до 11%, примерно от 5% до 10%, примерно от 6% до 9% или примерно от 7% до 8% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, или в любых диапазонах между ними. В некоторых вариантах осуществления фракция DP3 описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата содержит примерно от 5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью масс-спектрометрии, такой как MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы, включает одну или несколько ангидро-субъединиц. Например, DP1 олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы, включает одну ангидро-субъединицу. В некоторых вариантах осуществления DPn олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы, может содержать от 1 до n ангидро-субъединиц. Например, в некоторых вариантах осуществления DP2 олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы, включает одну или две ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления каждый олигосахарид в олигосахаридном препарате независимо содержит ноль, одну или две ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления более 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35% или 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеют только одну ангидро-субъединицу. В некоторых вариантах осуществления более 99%, 95%, 90%, 85% или 80% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, содержат только одну ангидро-субъединицу.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько олигосахаридов в олигосахаридном

препарате или в каждой фракции олигосахаридного препарата содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ангидро-субъединиц, каждая из которых связана через гликозидную связь, где гликозидная связь, связывающая каждую ангидро-субъединицу, выбрана независимо. В некоторых вариантах осуществления один или несколько олигосахаридов в олигосахаридном препарате в или в каждой фракции олигосахаридного препарата содержат 1, 2 или 3 ангидро-субъединицы, каждая из которых связана гликозидной связью, при этом гликозидная связь, связывающая каждую ангидро-субъединицу, выбрана независимо. В некоторых вариантах осуществления более 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 99% олигосахаридов в олигосахаридном препарате или в каждой фракции содержат 1, 2 или 3 ангидро-субъединицы, каждая из которых связана гликозидной связью, где гликозидная связь, связывающая каждую ангидро-субъединицу, выбрана независимо. В некоторых вариантах осуществления один или несколько олигосахаридов в олигосахаридном препарате или в каждой фракции содержат 1 ангидро-субъединицу, связанную гликозидной связью. В некоторых вариантах осуществления более 50%, более 60%, более 70%, более 80%, более 90% или более 99% олигосахаридов в олигосахаридном препарате или в каждой фракции содержат 1 ангидро-субъединицу, связанную через гликозидную связь.

D. Виды ангидро-субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит различные виды ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления типичные олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, проиллюстрированы на фиг. 42, фиг. 30 и фиг. 31. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько ангидро-субъединиц, которые являются продуктами термической дегидратации моносахаридов, то есть ангидро-моносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько ангидро-субъединиц, которые являются продуктами обратимой термической дегидратации моносахаридов.

Следует понимать, что ангидро-моносахарид (или ангидро-моносахаридная субъединица) относится к одному или нескольким видам продуктов термической дегидратации моносахарида. Например, в некоторых вариантах осуществления ангидроглюкоза относится к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе (левоглюкозану) или 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозе. В некоторых вариантах осуществления множество ангидро-глюкоз относится к множеству 1,6-ангидро-β-D-глюкопираноз (левоглюкозанов), множеству 1,6-ангидро-β-D-глюкофураноз, множеству других термических продуктов дегидратации глюкозы, или любых их комбинаций. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления термин "множество ангидро-галактоз" относится к множеству любых продуктов термической дегидратации галактозы или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат, как описано в настоящем изобретении, содержит одну или несколько субъединиц ангидро-глюкозы, ангидро-галактозы, ангидро-маннозы, ангидро-аллозы, ангидро-альтрозы, ангидро-гулозы, ангидро-индозы, ангидро-талозы, ангидро-фруктозы, ангидро-рибозы, ангидро-арабинозы, ангидро-рамнозы, ангидро-ликсозы, ангидро-ксилозы, или любую комбинацию этих субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько субъединиц ангидро-глюкозы, ангидро-галактозы, ангидро-маннозы или ангидро-фруктозы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат, как описано в настоящем изобретении, содержит один или несколько из 1,6-ангидро-3-O-β-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозы, 1,6-ангидро-3-O-α-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозы, 1,6-ангидро-2-O-β-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозы, 1,6-ангидро-2-O-α-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозы, 1,6-ангидро-β-D-целлобиозы (целлобиозана), 1,6-ангидро-β-D-целлотриозы (целлотриозана), 1,6-ангидро-β-D-целлотетраозы (целлотетраозана), 1,6-ангидро-β-D-целлопентаозы (целлопентаозана) и 1,6-ангидро-β-D-мальтозы (мальтозана).

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько субъединиц 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько субъединиц 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы (левоглюкозана). Например, фиг. 42 иллюстрирует два DP1 олигосахарида, содержащих ангидро-субъединицы (левоглюкозан и 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозу) и DP2 олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы (ангидро-целлобиозу).

Присутствие и уровень разновидностей ангидро-субъединицы могут варьировать в зависимости от кормовых сахаров, используемых для производства олигосахарида. Например, в некоторых вариантах осуществления глюко-олигосахариды содержат ангидро-глюкозные субъединицы, галакто-олигосахариды содержат ангидро-галактозные субъединицы, а глюко-галакто-олигосахариды содержат ангидро-глюкозные и ангидро-галактозные субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит как 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозные, так и 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозные ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 0,1%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 99% ангидро-субъединиц выбраны из группы, состоящей из 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы и 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% ангидро-субъединиц представляют собой ангидро-

субъединицы 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 60% ангидро-субъединиц представляют собой 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозу.

В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно от 10:1 до 1:10, от 9:1 до 1:10, от 8:1 до 1:10, от 7:1 до 1:10, от 6:1 до 1:10, от 5:1 до 1:10, от4:1 до 1:10, от 3:1 до 1:10, от 2:1 до 1:10, от 10:1 до 1:9, от 10:1 до 1:8, от 10:1 до 1:7, от 10:1 до 1:6, от 10:1 до 1:5, от 10:1 до 1:4, от 10:1 до 1:3, от 10:1 до 1:2 или от 1:1 до 3:1 в препарате. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:8, 1:9 или 1:10 в препарате. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы и 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы в препарате составляет примерно 2:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно от 10:1 до 1:10, от 9:1 до 1:10, от 8:1 до 1:10, от 7:1 до 1:10, отб:1 до 1:10, от5:1 до 1:10, от4:1 до 1:10, от3:1 до 1:10, от 2:1 до 1:10, от 10:1 до 1:9, от 10:1 до 1:8, от 10:1 до 1:7, от 10:1 до 1:6, от 10:1 до 1:5, от 10:1 до 1:4, от 10:1 до 1:3, от 10:1 до 1:2 или от 1:1 до 3:1 в каждой фракции. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 в каждой фракции. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно 2:1 в каждой фракции.

В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно от 10:1 до 1:10, от 9:1 до 1:10, от 8:1 до 1:10, от 7:1 до 1:10, отб:1 до 1:10, от5:1 до 1:10, от4:1 до 1:10, от3:1 до 1:10, от 2:1 до 1:10, от 10:1 до 1: 9, от 10:1 до 1:8, от 10:1 до 1:7, от 10:1 до 1:6, от 10:1 до 1:5, от 10:1 до 1:4, от 10:1 до 1:3, от 10:1 до 1:2 или от 1:1 до 3:1 по меньшей мере в одной фракции. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по меньшей мере в одной фракции. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно 2:1 по меньшей мере в одной фракции.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат включает DP2 олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит ангидро-лактозу, ангидро-сахарозу, ангидро-целлобиозу или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает примерно от 2 до 20, от 2 до 15, от 5 до 20, от 5 до 15 или от 5 до 10 видов DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат, описанный в настоящем изобретении, не содержит целлобиозан или не содержит определяемого уровня целлобиозана.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит одну или несколько ангидро-субъединиц, которые представляют собой продукты карамелизации сахара. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько ангидро-субъединиц, являющихся продуктами карамелизации сахара, выбранными из группы, состоящей из метанола; этанола; фурана; метилглиоксаля; 2-метилфурана; винилацетата; гликольальдегида; уксусной кислоты; ацетола; фурфурола; 2-фуранметанола; 3-фуранметанола; 2-гидроксициклопент-2-ен-1-она; 5-метилфурфурола; 2(5H)-фуранона; 2-метилциклопентенолона; левоглюкозенона; циклического гидроксил-лактона; 1,4,3,6-диангидро-α-D-глюкопиранозы; диангидроглюкопиранозы; и 5-гидроксиметилфурфурола (5-hmf). В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит ангидро-субъединицы 5-hmf.

В некоторых вариантах осуществления в олигосахаридном препарате или по меньшей мере в одной из фракций DP ангидро-субъединицы, которые являются продуктами карамелизации, менее распространены, чем ангидро-субъединицы, которые являются продуктами обратимой термической дегидратации моносахарида. В некоторых вариантах осуществления в олигосахаридном препарате или по меньшей мере в одной из фракций ангидро-субъединицы, которые являются продуктами карамелизации, более распространены, чем ангидро-субъединицы, которые являются продуктами обратимой термической дегидратации моносахарида. В некоторых вариантах осуществления в олигосахаридном препарате или по меньшей мере в одной из фракций ангидро-субъединицы, которые являются продуктами карамелизации, и ангидро-субъединицы, которые являются продуктами обратимой термической дегидратации моносахарида, имеют аналогичную распространенность.

В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,01% до 50%, примерно от 0,01% до 40%, примерно от 0,01% до 30%, примерно от 0,01% до 20%, примерно от 0,01% до 10%, примерно от 0,01% до 5%, примерно от 0,01% до 4%, примерно от 0,01% до 3%, примерно от 0,01% до 2%, примерно от

0,01% до 1%, примерно от 0,1% до 0,5%, примерно от 0,1% до 50%, примерно от 0,1% до 40%, примерно от 0,1% до 30%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,1% до 10% примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 4%, примерно от 0,1% до 3%, примерно от 0,1% до 2%, примерно от 0,1% до 1%, или примерно от 0,1% до 0,5% ангидро-субъединиц в описанном здесь олигосахаридном препарате являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 2% или примерно от 0,1% до 1% ангидро-субъединиц в олигосахаридном препарате являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% ангидро-субъединиц в олигосахаридном препарате являются продуктами карамелизации.

В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,01% до 50%, примерно от 0,01% до 40%, примерно от 0,01% до 30%, примерно от 0,01% до 20%, примерно от 0,01% до 10%, примерно от 0,01% до 5%, примерно от 0,01% до 4%, примерно от 0,01% до 3%, примерно от 0,01% до 2%, примерно от 0,01% до 1%, примерно от 0,01 примерно от 0,1% до 0,5%, примерно от 0,1% до 50%, примерно от 0,1% до 40%, примерно от 0,1% до 30%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,1% до 10% примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 4%, примерно от 0,1% до 3%, примерно от 0,1% до 2%, примерно от 0,1% до 1% или примерно от 0,1% до 0,5% ангидро-субъединиц по меньшей мере в одной фракции (например, DP1, DP2 и/или DP3) описанного здесь препарата являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 2% или примерно от 0,1% до 1% ангидро-субъединиц по меньшей мере в одной фракции (например, DP1, DP2 и/или DP3) препарата являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления менее 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% ангидро-субъединиц по меньшей мере в одной фракции препарата являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления менее 20%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% ангидро-субъединиц во фракциях DP1, DP2 и/или DP3 описанного здесь олигосахаридного препарата являются продуктами карамелизации.

В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,01% до 50%, примерно от 0,01% до 40%, примерно от 0,01% до 30%, примерно от 0,01% до 20%, примерно от 0,01% до 10%, примерно от 0,01% до 5%, примерно от 0,01% до 4%, примерно от 0,01% до 3%, примерно от 0,01% до 2%, примерно от 0,01% до 1%, примерно от 0,01 примерно от 0,1% до 0,5%, примерно от 0,1% до 50%, примерно от 0,1% до 40%, примерно от 0,1% до 30%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,1% до 10% примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 4%, примерно от 0,1% до 3%, примерно от 0,1% до 2%, примерно от 0,1% до 1% или примерно от 0,1% до 0,5% ангидро-субъединиц в каждой фракции описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 2% или примерно от 0,1% до 1% ангидро-субъединиц в каждой фракции препарата являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее более 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее более 2% или менее 1% ангидро-субъединиц в каждой фракции препарата являются продуктами карамелизации.

В некоторых вариантах осуществления каждый из олигосахаридов в описанном в настоящем изобретении олигосахаридном препарате независимо и при необходимости содержит ангидро-субъединицу. В некоторых вариантах осуществления два или более независимых олигосахарида содержат одинаковые или разные ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления два или более независимых олигосахарида содержат разные ангидро-субъединицы. Например, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает DP1 олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицу, который включает 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозу, и олигосахарид DP2, содержащий ангидро-субъединицу, который включает 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозную субъединицу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько олигосахаридов в олигосахаридном препарате содержат две или более одинаковых или разных ангидро-субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления в любой фракции олигосахаридного препарата, которая имеет степень полимеризации, равную 2 или более (т.е. фракции DP2-DPn), ангидро-субъединица может быть связана с одной или несколькими регулярными или ангидро-субъединицами. В некоторых вариантах осуществления во фракциях DP2-DPn по меньшей мере одна ангидро-субъединица связана с одной, двумя или тремя другими регулярными или ангидро-субъединицами. В некоторых вариантах осуществления во фракциях DP2-DPn по меньшей мере одна ангидро-субъединица связана с одной или двумя регулярными субъединицами. В некоторых вариантах осуществления во фракциях DP2-DPn по меньшей мере одна ангидро-субъединица связана с одной регулярной субъединицей. В некоторых вариантах осуществления в любой из фракций DP2-DPn более 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40% или 30% ангидро-субъединиц связаны с одной регулярной субъединицей. В некоторых вариантах осуществления в каждой

из фракций DP2-DPn более 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40% или 30% ангидро-субъединиц связаны с одной регулярной субъединицей.

В некоторых вариантах осуществления в любой фракции олигосахаридного препарата, которая имеет степень полимеризации, равную 2 или более (т.е. фракции DP2-DPn), ангидро-субъединица может быть расположена на конце цепи олигосахарида. В некоторых вариантах осуществления в любой фракции олигосахаридного препарата, которая имеет степень полимеризации, равную 3 или более (т.е. фракции DP3-DPn), ангидро-субъединица может находиться в положении, которое не является концом цепи олигосахарида. В некоторых вариантах осуществления во фракциях DP2-DPn по меньшей мере одна субъединица расположена на конце олигосахаридной цепи. В некоторых вариантах осуществления более 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35% или 30% ангидро-субъединиц во фракциях DP2-DPn расположены на конце олигосахаридной цепи. В некоторых вариантах осуществления более 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% или 10% ангидро-субъединиц в олигосахаридном препарате расположены на конце олигосахаридной цепи. В некоторых вариантах осуществления более 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу, включают ангидро-субъединицу на конце цепи. В некоторых вариантах осуществления более 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу, включают ангидро-субъединицу на конце цепи.

E. Гликозидные связи.

В некоторых вариантах осуществления описанный здесь олигосахаридный препарат содержит множество гликозидных связей. Тип и распределение гликозидных связей может зависеть от источника и способа производства олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления тип и распределение различных гликозидных связей можно определять и/или обнаруживать любыми подходящими способами, известными в данной области техники, такими как ЯМР. Например, в некоторых вариантах осуществления гликозидные связи определяют и/или обнаруживают с помощью ^{1}H-ЯМР, ^{13}C-ЯМР, 2D ЯМР, такого как 2D JRES, HSQC, HMBC, DOSY, COSY, ECOSY, TOCSY, NOESY или ROESY, или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления гликозидные связи определяют и/или обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью ^{1}H-ЯМР. В некоторых вариантах осуществления гликозидные связи определяют и/или обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью ^{13}C-ЯМР. В некоторых вариантах осуществления гликозидные связи определяют и/или обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит одну или несколько α-(1,2) гликозидных связей, α-(1,3) гликозидных связей, α-(1,4) гликозидных связей, α-(1,6) гликозидных связей, β-(1,2) гликозидных связей, β-(1,3) гликозидных связей, β-(1,4) гликозидных связей, β-(1,6) гликозидных связей, α-(1,1)-α-гликозидных связей, α-(1,1)-β-гликозидных связей, β-(1,1)-β-гликозидных связей или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 60 мол.%, примерно от 5% до 55 мол.%, примерно от 5% до 50 мол.%, примерно от 5% до 45 мол.%, примерно от 5% до 40 мол.%, примерно от 5% до 35 мол.%, примерно от 5% до 30 мол.%, примерно от 5% до 25 мол.%, примерно от 10% до 60 мол.%, примерно от 10% до 55 мол.%, примерно от 10% до 50 мол.%, примерно от 10% до 45 мол.%, примерно от 10% до 40 мол.%, примерно от 10% до 35 мол.%, примерно от 15% до 60 мол.%, примерно от 15% до 55 мол.%, примерно от 15% до 50 мол.%, примерно от 15% до 45 мол.%, примерно от 15% до 40 мол.%, примерно от 15% до 35 мол.%, примерно от 20% до 60 мол.%, примерно от 20% до 55 мол.%, примерно от 20% до 50 мол.%, примерно от 20% до 45 мол.%, примерно от 20% до 40 мол.%, примерно от 20% до 35 мол.%, примерно от 25% до 60 мол.%, примерно от 25% до 55 мол.%, примерно от 25% до 50 мол.%, примерно от 25% до 45 мол.%, примерно от 25% до 40 мол.%, или примерно от 25% до 35 мол.% α-(1,6) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 50 мол.%, примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 35 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 5% до 40 мол.%, примерно от 5% до 35 мол.%, примерно от 5% до 30 мол.% примерно от 5% до 25 мол.%, примерно от 5% до 20 мол.%, примерно от 10% до 40 мол.%, примерно от 10% до 35 мол.%, примерно от 10% до 20 мол.% примерно от 15% до 40 мол.%, примерно от 15% до 35 мол.%, примерно от 15% до 30 мол.%, примерно от 15% до 25 мол.% или примерно от 15% до 20 мол.% α-(1,3) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 35 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол. мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.%, примерно от 2% до 30 мол.%, примерно от 2% до 25 мол.%, примерно от 2% до 20 мол.%, примерно от 2% до 15 мол.%, примерно от 2% до 10 мол.%, примерно от 3% до 30 мол.%, примерно от 3% до 25 мол.%, примерно от 3% до 20 мол.%, примерно от 3% до 15 мол.%, примерно от 3% до 10 мол.%, примерно от 5% до 30 мол.%, примерно от 5% до 25 мол.%, примерно от 5% до 20 мол.%, при-

мерно от 5% до 15 мол.% или примерно от 5% до 10 мол.% α-(1,2) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.% или примерно от 0 до 5 мол.% α-(1,4) гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи менее 40 мол.%, менее 30 мол.%, менее 20 мол.%, менее 15 мол.%, менее 10 мол.%, менее 9 мол.%, менее 8 мол.%, менее 7 мол.%, менее 6 мол.%, менее 5 мол.%, менее 4 мол.%, менее 3 мол.% или менее 2 мол.% α-(1,4) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 35 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.%, примерно от 2% до 30 мол.%, примерно от 2% до 25 мол.%, примерно от 2% до 20 мол.%, примерно от 2% до 15 мол.%, примерно от 2% до 10 мол.%, примерно от 5% до 30 мол.%, примерно от 5% до 25 мол.%, примерно от 5% до 20 мол.%, примерно от 5% до 15 мол.%, примерно от 5% до 10 мол.%, примерно от 8% до 30 мол.%, примерно от 8% до 25 мол.%, примерно от 8% до 20 мол.%, примерно от 8% до 15 мол.% или примерно от 10% до 15 мол.% β-(1,6) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 35 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.%, примерно от 2% до 30 мол.%, примерно от 2% до 25 мол.%, примерно от 2% до 20 мол.%, примерно от 2% до 15 мол.%, примерно от 2% до 10 мол.%, примерно от 3% до 30 мол.%, примерно от 3% до 25 мол.%, примерно от 3% до 20 мол.%, примерно от 3% до 15 мол.%, примерно от 3% до 10 мол.%, примерно от 5% до 30 мол.%, примерно от 5% до 25 мол.%, примерно от 5% до 20 мол.%, примерно от 5% до 15 мол.% или примерно от 5% до 10 мол.% β-(1,4) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.%, примерно от 0 до 5 мол.%, примерно от 1% до 20 мол.%, примерно от 1% до 15 мол.%, примерно от 1% до 10 мол.%, примерно от 1% до 5 мол.%, примерно от 2% до 20 мол.%, примерно от 2% до 15 мол.%, примерно от 2% до 10 мол.%, или примерно от 2% до 5 мол.% β-(1,2) гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи менее 40 мол.%, менее 30 мол.%, менее 20 мол.%, менее 15 мол.%, менее 10 мол.%, менее 9 мол.%, менее 8 мол.%, менее 7 мол.%, менее 6 мол.%, менее 5 мол.%, менее 4 мол.%, менее 3 мол.% или менее 2 мол.% β-(1,2) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.%, примерно от 0 до 5 мол.%, примерно от 1% до 20 мол.%, примерно от 1% до 15 мол.%, примерно от 1% до 10 мол.%, примерно от 1% до 5 мол.%, примерно от 2% до 20 мол.%, примерно от 2% до 15 мол.%, примерно от 2% до 10 мол.%, или примерно от 2% до 5 мол.% β-(1,3) гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи менее 40 мол.%, менее 30 мол.%, менее 20 мол.%, менее 15 мол.%, менее 10 мол.%, менее 9 мол.%, менее 8 мол.%, менее 7 мол.%, менее 6 мол.%, менее 5 мол.%, менее 4 мол.%, менее 3 мол.% или менее 2 мол.% β-(1,3) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи, которое отличается от распределения типа гликозидной связи в несинтетических олигосахаридных препаратах. Например, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типов гликозидных связей, которое отличается от такового в основных питательных композициях. В некоторых вариантах осуществления основные питательные композиции содержат природный источник углеводов, такой как крахмал и растительные волокна. Некоторые из природных источников углеводов имеют высокий процент α-(1,4), α-(1,6) и/или β-(1,6) гликозидных связей. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют более низкий процент α-(1,4) гликозидных связей, чем основная питательная композиция. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют более низкий процент α-(1,6) гликозидных связей, чем основная питательная композиция. В других вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют более высокий процент α-(1,6) гликозидных связей, чем основная питательная композиция. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют более низкий процент β-(1,6) гликозидных связей, чем основная питательная композиция. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит гликозидные связи, которые трудно расщепляются или гидролизуются ферментами.

В частности, в некоторых вариантах осуществления α-(1,2), α-(1,3), α-(1,4), α-(1,6), β-(1,2), β-(1,3),

β-(1,4) и/или β-(1,6) гликозидные связи в распределении типа гликозидной связи описанных в настоящем изобретении олигосахаридных препаратов по меньшей мере на 50 мол.%, по меньшей мере на 40 мол.%, по меньшей мере на 30 мол.%, по меньшей мере на 20 мол.%, по меньшей мере на 15 мол.%, по меньшей мере на 10 мол.%, по меньшей мере на 5 мол.%, по меньшей мере на 2 мол.% или по меньшей мере на 1 мол.% ниже, чем в основной питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления α-(1,2), α-(1,3), α-(1,4), α-(1,6), β-(1,2), β-(1,3), β-(1,4) и/или β-(1,6) гликозидные связи в распределении типа гликозидной связи олигосахаридных препаратов по меньшей мере на 50 мол.%, по меньшей мере на 40 мол.%, по меньшей мере на 30 мол.%, по меньшей мере на 20 мол.%, по меньшей мере на 15 мол.%, по меньшей мере на 10 мол.%, по меньшей мере на 5 мол.%, по меньшей мере на 2 мол.% или по меньшей мере на 1 мол.% выше, чем в основной питательной композиции.

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что определенные типы гликозидных связей могут быть неприменимы к олигосахаридам, содержащим определенный тип моносахаридов. Например, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит α-(1,2) гликозидные связи и α-(1,6) гликозидные связи. В других вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит α-(1,2) гликозидные связи и β-(1,3) гликозидные связи. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит α-(1,2) гликозидные связи, α-(1,3) гликозидные связи и β-(1,6) гликозидные связи. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит α-(1,2) гликозидные связи, α-(1,3) гликозидные связи, α-(1,4) гликозидные связи, α-(1,6) гликозидные связи, β-(1,2) гликозидные связи, β-(1,3) гликозидные связи, β-(1,4) гликозидные связи и β-(1,6) гликозидные связи.

F. Молекулярная масса.

Молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение описанных в настоящем изобретении олигосахаридных препаратов могут быть определены любыми подходящими аналитическими средствами и инструментами, такими как метод концевых групп, осмотическое давление (осмометрия), ультрацентрифугирование, измерение вязкости, метод светорассеяния, SEC, SEC-MALLS, ПФП, A4F, ВЭЖХ и масс-спектрометрия. В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение определяют масс-спектрометрией, такой как MALDI-MS, ЖХ-МС или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение определяют с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), такой как гель-проникающая хроматография (ГПХ). В других вариантах осуществления молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение определяют с помощью MALDI-MS.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат имеет средневесовую молекулярную массу примерно от 100 до 10000 г/моль, примерно от 200 до 8000 г/моль, примерно от 300 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 5000 г/моль, примерно от 700 до 5000 г/моль, примерно от 900 до 5000 г/моль, примерно от 1100 до 5000 г/моль, примерно от 1300 до 5000 г/моль, примерно от 1500 до 5000 г/моль, примерно от 1700 до 5000 г/моль, примерно от 300 до 4500 г/моль, примерно от 500 до 4500 г/моль, примерно от 700 до 4500 г/моль, примерно от 900 до 4500 г/моль, примерно от 1100 до 4500 г/моль, примерно от 1300 до 4500 г/моль, примерно от 1500 до 4500 г/моль, примерно от 1700 до 4500 г/моль, примерно от 1900 до 4500 г/моль, примерно от 300 до 4000 г/моль, примерно от 500 до 4000 г/моль, примерно от 700 до 4000 г/моль, примерно от 900 до 4000 г/моль, примерно от 1100 до 4000 г/моль, примерно от 1300 до 4000 г/моль, примерно от 1500 до 4000 г/моль, примерно от 1700 до 4000 г/моль, примерно от 1900 до 4000 г/моль, примерно от 300 до 3000 г/моль, примерно от 500 до 3000 г/моль, примерно от 700 до 3000 г/моль, примерно от 900 до 3000 г/моль, примерно от 1100 до 3000 г/моль, примерно от 1300 до 3000 г/моль, примерно от 1500 до 3000 г/моль, примерно от 1700 до 3000 г/моль, примерно от 1900 до 3000 г/моль, примерно от 2100 до 3000 г/моль, примерно от 300 до 2500 г/моль, примерно от 500 до 2500 г/моль, примерно от 700 до 2500 г/моль, примерно от 900 до 2500 г/моль, примерно от 1100 до 2500 г/моль, примерно от 1300 до 2500 г/моль, примерно от 1500 до 2500 г/моль, примерно от 1700 до 2500 г/моль, примерно от 1900 до 2500 г/моль, примерно от 2100 до 2500 г/моль, примерно от 300 до 1500 г/моль, примерно от 500 до 1500 г/моль, примерно от 700 до 1500 г/моль, примерно от 900 до 1500 г/моль, примерно от 1100 до 1500 г/моль, примерно от 1300 до 1500 г/моль, примерно от 2000 до 2800 г/моль, примерно от 2100 до 2700 г/моль, примерно от 2200 до 2600 г/моль, примерно от 2300 до 2500 г/моль или примерно от 2320 до 2420 г/моль. В некоторых вариантах осуществления средневесовая молекулярная масса олигосахаридного препарата составляет примерно от 2000 до 2800 г/моль, примерно от 2100 до 2700 г/моль, примерно от 2200 до 2600 г/моль, примерно от 2300 до 2500 г/моль, или примерно от 2320 до 2420 г/моль. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет средневесовую молекулярную массу в диапазоне по меньшей мере от 500 г/моль, 750 г/моль, 1000 г/моль или 1500 г/моль до не более 1750 г/моль, 2000 г/моль, 2250 г/моль, 2500 г/моль или 3000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления средневесовую молекулярную массу описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата определяют с помощью ВЭЖХ согласно примеру 9.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат имеет среднечисленную молекулярную массу примерно от 100 до 10000 г/моль, примерно от 200 до 8000 г/моль, примерно от 300 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 5000 г/моль, примерно от 700 до 5000 г/моль, примерно от 900 до 5000 г/моль, примерно от 1100 до 5000 г/моль, примерно от 1300 до 5000 г/моль, примерно от 1500 до 5000 г/моль, примерно от 1700 до 5000 г/моль, примерно от 300 до 4500 г/моль, примерно от 500 до 4500 г/моль, примерно от 700 до 4500 г/моль, примерно от 900 до 4500 г/моль, примерно от 1100 до 4500 г/моль, примерно от 1300 до 4500 г/моль, примерно от 1500 до 4500 г/моль, примерно от 1700 до 4500 г/моль, примерно от 1900 до 4500 г/моль, примерно от 300 до 4000 г/моль, примерно от 500 до 4000 г/моль, примерно от 700 до 4000 г/моль, примерно от 900 до 4000 г/моль, примерно от 1100 до 4000 г/моль, примерно от 1300 до 4000 г/моль, примерно от 1500 до 4000 г/моль, примерно от 1700 до 4000 г/моль, примерно от 1900 до 4000 г/моль, примерно от 300 до 3000 г/моль, примерно от 500 до 3000 г/моль, примерно от 700 до 3000 г/моль, примерно от 900 до 3000 г/моль, примерно от 1100 до 3000 г/моль, примерно от 1300 до 3000 г/моль, примерно от 1500 до 3000 г/моль, примерно от 1700 до 3000 г/моль, примерно от 1900 до 3000 г/моль, примерно от 2100 до 3000 г/моль, примерно от 300 до 2500 г/моль, примерно от 500 до 2500 г/моль, примерно от 700 до 2500 г/моль, примерно от 900 до 2500 г/моль, примерно от 1100 до 2500 г/моль, примерно от 1300 до 2500 г/моль, примерно от 1500 до 2500 г/моль, примерно от 1700 до 2500 г/моль, примерно от 1900 до 2500 г/моль, примерно от 2100 до 2500 г/моль, примерно от 300 до 2000 г/моль, примерно от 500 до 2000 г/моль, примерно от 700 до 2000 г/моль, примерно от 900 до 2000 г/моль, примерно от 1100 до 2000 г/моль, примерно от 300 до 1500 г/моль, примерно от 500 до 1500 г/моль, примерно от 700 до 1500 г/моль, примерно от 900 до 1500 г/моль, примерно от 1100 до 1500 г/моль, примерно от 1300 до 1500 г/моль, примерно от 1000 до 2000 г/моль, примерно от 1100 до 1900 г/моль, примерно от 1200 до 1800 г/моль, примерно от 1300 до 1700 г/моль, примерно от 1400 до 1600 г/моль или примерно от 1450 до 1550 г/моль. В некоторых вариантах осуществления среднечисленная молекулярная масса олигосахаридного препарата составляет примерно от 1000 до 2000 г/моль, примерно от 1100 до 1900 г/моль, примерно от 1200 до 1800 г/моль, примерно от 1300 до 1700 г/моль, примерно от 1400 до 1600 г/моль или примерно от 1450 до 1550 г/моль. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет среднечисленную молекулярную массу в диапазоне по меньшей мере от 500 г/моль, 750 г/моль, 1000 г/моль или 1500 г/моль до не более 1750 г/моль, 2000 г/моль, 2250 г/моль, 2500 г/моль или 3000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления среднечисленную молекулярную массу описанного в настоящем изобретении олигосахаридного препарата определяют с помощью ВЭЖХ согласно примеру 9.

G. Типы олигосахаридов.

Виды олигосахаридов, присутствующих в олигосахаридном препарате, могут зависеть от типа одного или нескольких кормовых сахаров. Например, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты содержат глюко-олигосахарид, когда кормовые сахара содержат глюкозу. Например, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты содержат галакто-олигосахарид, когда кормовые сахара содержат галактозу. В другом примере, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты содержат глюко-галакто-олигосахариды, когда кормовые сахара включают галактозу и глюкозу.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении олигосахаридные препараты содержат один или несколько видов моносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат может содержать олигосахариды с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более различными видами моносахаридных субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит олигосахариды с 1, 2, 3 или 4 различными видами моносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает олигосахариды с 1, 2 или 3 различными видами моносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит олигосахариды с 3 различными видами моносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает олигосахариды с 2 различными видами моносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает один вид моносахаридных субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает различные виды олигосахаридов, при этом каждая молекула олигосахарида независимо включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных видов моносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь олигосахаридный препарат содержит 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 или более различных видов олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления некоторые из олигосахаридов в препарате содержат один вид моносахаридных субъединиц, а некоторые другие олигосахариды в том же препарате содержат два или более видов моносахаридных субъединиц. Например, в некоторых вариантах осуществления, когда кормовые сахара представляют собой глюкозу и галактозу, олигосахаридный препарат может включать олигосахариды, которые содержат только глюкозные субъединицы, олигосахариды, которые содержат только галактозные субъединицы, олигосахариды, которые содержат глюкозные и галактозные субъединицы в различных соотношениях, или любую комбинацию из них.

В некоторых вариантах осуществления любая или все n фракций препарата олигосахаридов содер-

жат различные виды олигосахаридных субъединиц, где каждый олигосахарид независимо включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных видов моносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления некоторые из олигосахаридов во фракции препарата содержат один вид моносахаридных субъединиц, а некоторые другие олигосахариды в той же фракции препарата содержат два или более видов моносахаридных субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит одну или несколько моносахаридных субъединиц, выбранных из группы, состоящей из триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы и любой их комбинации, где каждая из указанных триозной, тетрозной, пентозной, гексозной или гептозной субъединиц независимо и при необходимости функционализирована и/или заменена одной из своих соответствующих ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления соответствующая ангидро-субъединица является продуктом обратимой термической дегидратации моносахаридной субъединицы. В некоторых вариантах осуществления соответствующая ангидро-субъединица представляет собой продукт карамелизации моносахаридной субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит пентозные субъединицы, гексозные субъединицы или любую их комбинацию, где каждая из указанных пентозных или гексозных субъединиц независимо и при необходимости функционализирована и/или заменена одной из своих соответствующих ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит гексозные субъединицы, где каждая из указанных гексозных субъединиц независимо и при необходимости заменена одной из своих соответствующих ангидро-субъединиц.

В контексте настоящего изобретения тетроза относится к моносахариду с четырьмя атомами углерода, такому как эритроза, треоза и эритрулоза. В контексте настоящего изобретения пентоза относится к моносахариду с пятью атомами углерода, такому как арабиноза, ликсоза, рибоза и ксилоза. В контексте настоящего изобретения гексоза относится к моносахариду с шестью атомами углерода, такому как аллоза, альтроза, глюкоза, манноза, гулоза, идоза, галактоза, талоза, психоза, фруктоза, сорбоза и тагатоза. В контексте настоящего изобретения гептоза относится к моносахариду с семью атомами углерода, такому как седогептулоза и манногептулоза.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит глюкозную субъединицу, где по меньшей мере одна глюкозная субъединица при необходимости заменена ангидро-глюкозной субъединицей. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит галактозную субъединицу, где по меньшей мере одна галактозная субъединица при необходимости заменена ангидро-галактозной субъединицей. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит галактозные и глюкозные субъединицы, где по меньшей мере одна галактозная субъединица или по меньшей мере одна глюкозная субъединица при необходимости заменена одной из ее соответствующих ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит фруктозные и глюкозные субъединицы, где по меньшей мере одна фруктозная субъединица или по меньшей мере одна глюкозная субъединица при необходимости заменена одной из ее соответствующих ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит маннозную и глюкозную субъединицы, где по меньшей мере одна маннозная субъединица или по меньшей мере одна глюкозная субъединица при необходимости заменена одной из ее соответствующих ангидро-субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат включает глюко-галактозо-олигосахаридный препарат, глюко-олигосахаридный препарат, галакто-олигосахаридный препарат, фрукто-олигосахаридный препарат, манно-олигосахаридный препарат, арабино-олигосахаридный препарат, ксило-олигосахаридный препарат, глюко-фрукто-олигосахаридный препарат, глюко-манно-олигосахаридный препарат, глюко-арабино-олигосахаридный препарат, глюко-ксило-олигосахаридный препарат, галакто-фрукто-олигосахаридный препарат, манно-олигосахаридный препарат, галакто-арабино-олигосахаридный препарат, галакто-ксило-олигосахаридный препарат, фрукто-манно-олигосахаридный препарат, фрукто-арабино-олигосахаридный препарат, фрукто-ксило-олигосахаридный препарат, манно-арабино-олигосахаридный препарат, манно-ксило-олигосахаридный препарат, арабино-ксило-олигосахаридный препарат, галакто-арабино-ксило-олигосахаридный препарат, фрукто-галакто-ксило-олигосахаридный препарат, арабино-фрукто-манно-ксило-олигосахаридный препарат, глюко-фрукто-галакто-арабино-олигосахаридный препарат, фрукто-глюко-арабино-манно-ксило-олигосахаридный препарат, глюко-галакто-фрукто-манно-арабино-ксило-олигосахаридный препарат, или любые их комбинации; где каждая из моносахаридных субъединиц в составе препарата независимо и при необходимости функционализирована и/или заменена одной из своих соответствующих ангидро-субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит более 99% субъединиц глюкозы по массе. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит только глюкозные субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный

препарат содержит примерно от 45% до 55% субъединиц глюкозы и примерно от 55% до 45% субъединиц галактозы по массе. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно 50% субъединиц глюкозы и 50% субъединиц галактозы по массе.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит примерно от 80% до 95% субъединиц глюкозы и примерно от 20% до 5% субъединиц маннозы по массе. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно от 85% до 90% субъединиц глюкозы и примерно от 15% до 10% субъединиц маннозы по массе.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит примерно от 80% до 95% глюкозных субъединиц и примерно от 20% до 5% галактозных субъединиц по массе. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно от 85% до 90% глюкозных субъединиц и примерно от 15% до 10% галактозных субъединиц по массе.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит примерно от 80% до 95% глюкозных субъединиц, от 0% до 8% галактозных субъединиц и от 5% до 20% маннозных субъединиц по массе. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно от 80% до 90% глюкозных субъединиц, от 1% до 5% галактозных субъединиц и от 10% до 15% маннозных субъединиц по массе.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат, описанный в настоящем изобретении, содержит примерно от 1 до 100 мас.%, примерно от 50 мас.% до 100 мас.%, примерно от 80 мас.% до 98 мас.% или примерно от 85 мас.%. до 95 мас.% глюкозных субъединиц, или в любых диапазонах между ними. В некоторых вариантах осуществления галактозные субъединицы присутствуют в олигосахаридном препарате, описанном в настоящем изобретении, в количестве примерно от 0 до 90 мас.%, примерно от 1 до 50 мас.%, примерно от 2 до 20 мас.%, или примерно от 5 мас.% до 15 мас.%, или в любом диапазоне между ними. В некоторых вариантах осуществления маннозные субъединицы присутствуют в олигосахаридном препарате, описанном в настоящем изобретении, в количестве примерно от 0 мас.% до 90 мас.%, примерно от 1 мас.% до 50 мас.%, примерно от 2 мас.% до 20 мас.%, или примерно от 5 мас.% до 15 мас.%, или в любом диапазоне между ними.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат имеет состав моносахаридных субъединиц, как показано в табл. 29.

Таблица 29

Примерный состав олигосахаридных препаратов

№ олигосахаридной композиции	Глюкозные и ангидро-глюкозные субъединицы (масс.%)	Галактозные и ангидро-галактозные субъединицы (масс.%)	Маннозные и ангидро-маннозные субъединицы (масс.%)	Фруктозные и ангидро-фруктозные субъединицы (масс.%)
1	87,5	12,5	0	0
2	100	0	0	0
3	85	2,5	12,5	0
4	87,5	0	12,5	0
5	50	50	0	0
6	75	0	25	0
7	9	6	0	0
8	90	0	10	0
9	95	5	0	0
10	97,5	2,5	0	0
11	85	5	10	0
12	85	1,5	13,5	0
13	80	10	10	0
14	85	0	15	0
15	85	15	0	0
16	87,5	0	0	12,5

H. D-формы и L-формы.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна моносахаридная субъединица в олигосахариде находится в L-форме. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна моносахаридная субъединица в олигосахариде находится в D-форме. В некоторых вариантах осуществления моносахаридные субъединицы в описанном в настоящем изобретении олигосахаридном препарате находятся в их естественной распространенной форме, например, в виде D-глюкозы, D-ксилозы и L-арабинозы.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат включает смесь L- и D-форм моносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществ-

ления отношение моносахаридных субъединиц L- к D- или D- к L- форме составляет примерно 1:1, примерно 1:2, примерно 1:3, примерно 1:4, примерно 1:5, примерно 1: 6, примерно 1: 7, примерно 1: 8, примерно 1: 9, примерно 1:10, примерно 1:12, примерно 1:14, примерно 1:16, примерно 1:18, примерно 1:20, примерно 1:25, примерно 1:30, примерно 1:35, примерно 1:40, примерно 1:45, примерно 1:50, примерно 1:55, примерно 1:60, примерно 1:65, примерно 1:70, примерно 1:75, примерно 1:80, примерно 1:85, примерно 1:90, примерно 1:100 или примерно 1:150.

I. Функционализированные олигосахариды.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько олигосахаридов в описанном в настоящем изобретении олигосахаридном препарате функционализированы независимо. Функционализированные олигосахариды могут быть получены, например, путем объединения одного или нескольких сахаров с одним или несколькими функционализирующими соединениями в присутствии катализатора. Способы получения функционализированных олигосахаридов описаны в WO 2012/118767, WO 2014/031956 и WO/2016/122887, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для их раскрытия.

В некоторых вариантах осуществления функционализирующее соединение содержит одну или несколько кислотных групп (например, -COOH), гидроксильных групп или N-содержащих групп (например, -CN, $-NO_2$ и $-N(Ra)_2$, где Ra представляет собой водородную, алкильную, алкенильную, алкинильную, галогеналкильную, гетероалкильную, циклоалкильную, арильную, гетероциклоалкильную или гетероарильную группу), S-содержащих групп (например, тиольных и сульфатных), галогенидов (например, -Cl), P-содержащих группы (например, фосфатных) или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления функционализирующее соединение связано по меньшей мере с одной моносахаридной субъединицей посредством простой эфирной, сложноэфирной, кислород-серной, аминной или кислород-фосфорной связи. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько функционализирующих соединений связаны с моносахаридной субъединицей посредством одной связи. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно функционализирующее соединение связано с одним или двумя олигосахаридами двумя или более связями.

Следует понимать, что для каждого олигосахарида в олигосахаридном препарате каждый из описанных вариантов осуществления является независимым и может быть объединен, как если бы каждая комбинация была перечислена отдельно; таким образом, любое сочетание вариантов осуществления охвачено настоящим раскрытием. Например, различные варианты осуществления могут быть сгруппированы в несколько категорий, которые включают (i) наличие или отсутствие ангидро-субъединицы; (ii) количество и уровень ангидро-субъединицы; (iii) тип разновидностей ангидро-субъединицы; (iv) расположение ангидро-субъединицы; (v) степень полимеризации; (vi) молекулярную массу; (vii) наличие или отсутствие каких-либо функциональных групп; (viii) тип олигосахарида; (ix) тип гликозидной связи и (x) L- или D-форму; но не ограничиваются ими. Соответственно, описанный олигосахаридный препарат включает множество олигосахаридов разных видов. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 или 10^{10} различных видов олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит по меньшей мере 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 или 10^9 различных видов олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит по меньшей мере 10^3 различных вида олигосахаридов.

III. Способы производства олигосахаридных препаратов.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлены способы производства олигосахаридных препаратов. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы производства олигосахаридных препаратов, подходящих для использования в питательной композиции, такой как кормовая композиция для животных, или для скармливания непосредственно животному. В одном аспекте в настоящем изобретении представлены способы производства олигосахаридного препарата, включающие нагревание водной композиции, содержащей один или несколько кормовых сахаров и катализатор, до температуры и в течение времени, достаточных для индукции полимеризации, где катализатор выбран из группы, состоящей из: (+)-камфор-10-сульфоновой кислоты; 2-пиридинсульфоновой кислоты; 3-пиридинсульфоновой кислоты; 8-гидрокси-5-хинолинсульфоновой кислоты гидрата; α-гидрокси-2-пиридинметансульфоновой кислоты; (β)-камфор-10-сульфоновой кислоты; бутилфосфоновой кислоты; дифенилфосфиновой кислоты; гексилфосфоновой кислоты; метилфосфоновой кислоты; фенилфосфиновой кислоты; фенилфосфоновой кислоты; трет-бутилфосфоновой кислоты; (S)-VAPOL-гидрофосфата; 6-хинолинсульфоновой кислоты, 3-(1-пиридино)-1-пропансульфоната; 2-(2-пиридинил)этансульфоновой кислоты; 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-п,п'-дисульфоновой кислоты мононатриевой соли гидрата; 1,1'-бинафтил-2,2'-диил-гидрофосфата; бис(4-метоксифенил)фосфиновой кислоты; фенил(3,5-ксилил)фосфиновой кислоты; L-цистеиновой кислоты моногидрата; поли(стиролсульфоновой кислоты-со-дивинилбензола); лизина; этандисульфоновой кислоты; этансульфоновой кислоты; изетионовой кислоты; гомоцистеиновой кислоты; HEPBS (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(4-бутансульфоновой кислоты)); HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты); 2-гидрокси-3-морфолинопропансульфоновой кислоты; 2-(N-

морфолино)этансульфоновой кислоты; метансульфоновой кислоты; метаниазида; нафталин-1-сульфоновой кислоты; нафталин-2-сульфоновой кислоты; перфторбутансульфоновой кислоты; 6-сульфохиновозы; трифликовой кислоты; 2-аминоэтансульфоновой кислоты; бензойной кислоты; хлоруксусной кислоты; трифторуксусной кислоты; капроновой кислоты; энантовой кислоты; каприловой кислоты; пеларгоновой кислоты; лауриновой кислоты; пальмитиновой кислоты; стеариновой кислоты; арахидиновой кислоты; аспарагиновой кислоты; глутаминовой кислоты; серина; треонина; глутамина; цистеина; глицина; пролина; аланина; валина; изолейцина; лейцина; метионина; фенилаланина; тирозина; триптофана, и где олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 (фракция DP1) до n (фракция DPn), где n представляет собой целое число, равное 2 или более.

В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное 3 или более. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100, например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 или 50. В некоторых вариантах осуществления полимеризация кормовых сахаров достигается путем ступенчатой полимеризации. В некоторых вариантах осуществления полимеризация кормовых сахаров достигается поликонденсацией.

А. Кормовой сахар.

В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридных препаратов, описанный в настоящем изобретении, включает нагревание одного или нескольких типов кормовых сахаров. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержит моносахариды, дисахариды, трисахариды, тетрасахариды или любые их смеси.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и галактозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу, ксилозу и галактозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и маннозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и фруктозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу, фруктозу и галактозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу, галактозу и маннозу.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат дисахариды, такие как лактоза, сахароза и целлобиоза. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат трисахариды, такие как мальтотриоза или рафиноза. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу, маннозу, галактозу, ксилозу, мальтодекстрин, арабинозу или галактозу, или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат сахарный сироп, такой как кукурузный сироп. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и лактозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и сахарозу.

В некоторых вариантах осуществления тип кормовых сахаров может влиять на получаемые в результате олигосахаридные препараты. Например, в некоторых вариантах, когда один или несколько кормовых сахаров представляют собой глюкозу, полученные олигосахаридные препараты включают глюкоолигосахаридные препараты. В других вариантах осуществления, когда один или несколько кормовых сахаров представляют собой маннозу, полученные олигосахаридные препараты включают маннолигосахаридные препараты. В некоторых вариантах осуществления, где один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и галактозу, полученные олигосахаридные препараты включают глюкогалакто-олигосахаридные препараты. В еще других вариантах осуществления, где один или несколько кормовых сахаров включают ксилозу, глюкозу и галактозу, полученные олигосахаридные препараты включают глюко-галакто-ксило-олигосахаридные препараты.

В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или нескольких кормовых сахаров может независимо находиться в своей дегидратированной или гидратной форме. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу, галактозу, фруктозу, маннозу или любую их комбинацию, и где каждая из глюкозы, галактозы, фруктозы или маннозы независимо находится в своей моногидратной или дегидратированной форме. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат моногидрат моносахарида, такой как моногидрат глюкозы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат дигидрат сахарида, такой как дигидрат трегалозы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат по меньшей мере один сахар в его дегидратированной форме и по меньшей мере один сахар в его гидратной форме.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров могут быть обеспечены в виде сахарного раствора, где сахара объединены с водой и загружены в реактор. В некоторых вариантах осуществления сахара можно подавать в реактор в твердой форме и объединять с водой в реакторе. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров объединяют и перемешивают перед добавлением воды. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормо-

вых сахаров объединяют в воде и после этого смешивают.

В некоторых вариантах осуществления способ включает объединение двух или более кормовых сахаров с катализатором для получения олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления два или более кормовых сахара включают глюкозу, галактозу, фруктозу, маннозу, лактозу или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления способ включает объединение смеси сахаров (например, моносахаридов, дисахаридов и/или трисахаридов) с катализатором для получения олигосахаридного препарата. В других вариантах осуществления способ включает объединение смеси сахаров и сахароспиртов с катализатором для получения олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат функционализированные или модифицированные сахара.

Функционализированные или модифицированные сахара могут включать аминосахара, сахарные кислоты, сахароспирты, амиды сахаров, простые эфиры сахаров, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления аминосахара относятся к молекулам сахара, в которых гидроксильная группа заменена аминогруппой. Примеры аминосахаров включают N-ацетил-D-глюкозамин, маннозамин, нейраминовую кислоту, мурамовую кислоту, N-ацетилнейраминовую кислоту, N-ацетилмурамовую кислоту, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-маннозу, N-гликолилнейраминовую кислоту, акарвиозин, D-глюкозамин и D-галактозамин, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления сахарные кислоты относятся к сахарам с карбоксильной группой. Примеры сахарных кислот включают альдоновые кислоты (такие как глицериновая кислота, ксилоновая кислота, глюконовая кислота и аскорбиновая кислота), улозоновые кислоты (такие как нейраминовая кислота и кетодезоксиоктулозоновая кислота), уроновые кислоты (такие как глюкуроновая кислота, галактуроновая кислота и идуроновая кислота) и альдаровые кислоты (такие как винная кислота, муциновая кислота и сахарная кислота), но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления сахароспирты относятся к полиолам, производным от сахаров. Примеры сахароспиртов включают этиленгликоль, арабитол, глицерин, эритритол, треитол, ксилитол, рибитол, маннитол, сорбитол, галактитол, фуцитол, идитол, инозитол и волемитол, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления изобретения амиды сахаров относятся к молекулам сахара, которые содержат группу -C(=O)-N-. В некоторых вариантах осуществления изобретения простые эфиры сахаров относятся к молекулам сахара, которые содержат эфирную связь, например, к глюкозидам.

В некоторых вариантах осуществления функционализированные или модифицированные сахарные кислоты включают глюкозамин, N-ацетилглюкозамин, глюкуроновую кислоту, галактуроновую кислоту, глюцитол, ксилитол, маннитол, сорбитол. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров включают дезоксисахара, такие как фукоза, рамноза, дезоксирибоза или фукулоза.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении способ производства олигосахаридного препарата осуществляют в граммовом масштабе. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении способ производства олигосахаридного препарата осуществляют в килограммовом или более крупном масштабе. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции, содержащей один или несколько кормовых сахаров в количестве более 0,5, более 1, более 2, более 3, более 4, более 5, более 6, более 7, более 9, более 10, более 100 или более 1000 кг. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции, содержащей один или несколько кормовых сахаров в количестве не более 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 100, 1000 или 1500 кг. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции, содержащей один или несколько кормовых сахаров в количестве более 1 кг.

B. Катализаторы.

В некоторых вариантах осуществления предложенный здесь катализатор включает одну или несколько кислот. В некоторых вариантах осуществления предложенный здесь катализатор включает минеральную кислоту, карбоновую кислоту; аминокислоту; сульфоновую кислоту; бороновую кислоту; фосфоновую кислоту; фосфиновую кислоту; серную кислоту; фосфорную кислоту; поли(стиролсульфоновой кислоты-со-винилбензил-имидазолия сульфат-со-дивинилбензол); поли(стиролсульфоновой кислоты-со-дивинилбензол); (+)-камфор-10-сульфоновую кислоту; 2-пиридинсульфоновую кислоту; 3-пиридинсульфоновую кислоту; 8-гидрокси-5-хинолинсульфоновой кислоты гидрат; α-гидрокси-2-пиридинметансульфоновую кислоту; (β)-камфор-10-сульфоновую кислоту; бутилфосфоновую кислоту; дифенилфосфиновую кислоту; гексилфосфоновую кислоту; метилфосфоновую кислоту; фенилфосфиновую кислоту; фенилфосфоновую кислоту; трет-бутилфосфоновую кислоту; (S)-VAPOL-гидрофосфат; 6-хинолинсульфоновую кислоту; 3-(1-пиридино)-1-пропансульфонат; 2-(2-пиридинил)этансульфоновую кислоту; 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-п,п'-дисульфоновой кислоты мононатриевой соли гидрат; 1,1'-бинафтил-2,2'-диилгидрофосфат; бис(4-метоксифенил)фосфиновую кислоту; фенил(3,5-ксилил) фосфиновую кислоту; L-цистеиновой кислоты моногидрат; уксусную кислоту; пропионовую кислоту; бутановую кислоту; глутаминовую кислоту; лизин, этандисульфоновую кислоту; этансульфоновую кислоту; изетионовую кислоту; гомоцистеиновую кислоту; HEPBS (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(4-бутансульфоновую кислоту)); HEPES (4-(2-

гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту); 2-гидрокси-3-морфолинопропансульфоновую кислоту; 2-(N-морфолино) этансульфоновую кислоту; метансульфоновую кислоту; метаниазид; нафталин-1-сульфоновую кислоту; нафталин-2-сульфоновую кислоту; перфторбутансульфоновую кислоту; 6-сульфохиновозу; трифликовую кислоту; 2-аминоэтансульфоновую кислоту; бензойную кислоту; хлоруксусную кислоту; трифторуксусную кислоту; капроновую кислоту; энантовую кислоту; каприловую кислоту; пеларгоновую кислоту; лауриновую кислоту; пальмитиновую кислоту; стеариновую кислоту; арахидиновую кислоту; аспарагиновую кислоту; глутаминовую кислоту; серин; треонин; глутамин; цистеин; глицин; пролин; аланин; валин; изолейцин; лейцин; метионин; фенилаланин; тирозин; триптофан; полимерную кислоту; кислоту на углеродной основе; или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления предлагаемый в настоящем изобретении катализатор включает: (+)-камфор-10-сульфоновую кислоту; 2-пиридинсульфоновую кислоту; 3-пиридинсульфоновую кислоту; 8-гидрокси-5-хинолинсульфоновой кислоты гидрат; α-гидрокси-2-пиридинметансульфоновую кислоту; (β)-камфор-10-сульфоновую кислоту; бутилфосфоновую кислоту; дифенилфосфиновую кислоту; гексилфосфоновую кислоту; метилфосфоновую кислоту; фенилфосфиновую кислоту; фенилфосфоновую кислоту; трет-бутилфосфоновую кислоту; (S)-VAPOL-гидрофосфат; 6-хинолинсульфоновую кислоту, 3-(1-пиридино)-1-пропансульфонат; 2-(2-пиридинил) этансульфоновую кислоту; 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-п,п'-дисульфоновой кислоты мононатриевой соли гидрат; 1,1'-бинафтил-2,2'-диилгидрофосфат; бис(4-метоксифенил)фосфиновую кислоту; фенил(3,5-ксилил)фосфиновую кислоту; L-цистеиновой кислоты моногидрат; поли(стиролсульфоновую кислоту-со-дивинилбензол); лизин; этандисульфоновую кислоту; этансульфоновую кислоту; изетионовую кислоту; гомоцистеиновую кислоту; HEPBS (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(4-бутансульфоновую кислоту)); HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту); 2-гидрокси-3-морфолинопропансульфоновую кислоту; 2-(N-морфолино) этансульфоновую кислоту; метансульфоновую кислоту; метаниазид; нафталин-1-сульфоновую кислоту; нафталин-2-сульфоновую кислоту; перфторбутансульфоновую кислоту; 6-сульфохиновозу; трифликовую кислоту; 2-аминоэтансульфоновую кислоту; бензойную кислоту; хлоруксусную кислоту; трифторуксусную кислоту; капроновую кислоту; энантовую кислоту; каприловую кислоту; пеларгоновую кислоту; лауриновую кислоту; пальмитиновую кислоту; стеариновую кислоту; арахидиновую кислоту; аспарагиновую кислоту; глутаминовую кислоту; серин; треонин; глутамин; цистеин; глицин; пролин; аланин; валин; изолейцин; лейцин; метионин; фенилаланин; тирозин; триптофан; или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой (+)-камфор-10-сульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой 2-пиридинсульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой 3-пиридинсульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой 8-гидрокси-5-хинолинсульфоновой кислоты гидрат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой α-гидрокси-2-пиридинметансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой (β)-камфор-10-сульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой бутилфосфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой дифенилфосфиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой гексилфосфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой метилфосфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой фенилфосфиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой фенилфосфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой трет-бутилфосфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой (S)-VAPOL гидрофосфат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой 6-хинолинсульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой 3-(1-пиридино)-1-пропансульфонат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой 2-(2-пиридинил) этансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-п,п'-дисульфоновой кислоты мононатриевой соли гидрат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой Г-бинафтил-2,2'-диил-гидрофосфат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой бис(4-метоксифенил) фосфиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представля-

ет собой фенил(3,5-ксилил)фосфиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой L-цистеиновой кислоты моногидрат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой поли (стиролсульфоновую кислоту-со-дивинилбензол). В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой лизин.

В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой этандисульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой этансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой изетионовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой гомоцистеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой HEPBS (N-(2-гидроксиэтил) пиперазин-N'-(4-бутансульфоновую кислоту)). В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту). В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой 2-гидрокси-3-морфолинопропансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой 2-(N-морфолино) этансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой метансульфоновую кислоту. В вариантах осуществления катализатор представляет собой нафталин-1-сульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой метаниазид. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой нафталин-2-сульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой перфторбутансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой 6-сульфохиновозу. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой трифликовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой 2-аминоэтансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой хлоруксусную кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой трифторуксусную кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой капроновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой энантовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой каприловую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой пеларгоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой лауриновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой пальмитиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой стеариновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой арахидиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой аспарагиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой глутаминовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой серин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой треонин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой глутамин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой цистеин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой глицин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой пролин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой аланин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой валин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой изолейцин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой лейцин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой метионин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой фенилаланин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой тирозин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой триптофан.

В некоторых вариантах осуществления катализатор, представленный в настоящем изобретении, представляет собой полимерный катализатор или катализатор на углеродной подложке, раскрытый в WO 2016122887, который включен сюда посредством ссылки во всей полноте и для его раскрытия.

В некоторых вариантах осуществления предложенный в настоящем изобретении катализатор присутствует в количестве примерно от 0,01% до 5%, примерно от 0,02% до 4%, примерно от 0,03% до 3% или примерно от 0,05% до 2% от одного или нескольких кормовых сахаров по массе сухого вещества. В некоторых вариантах осуществления предлагаемый в настоящем изобретении катализатор присутствует в количестве примерно от 1% до 2% от одного или нескольких кормовых сахаров по массе сухого вещества. В некоторых вариантах осуществления предложенный в настоящем изобретении катализатор присутствует в количестве примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1,0%, примерно 1,1%, примерно 1,2%, примерно 1,3%, примерно 1,4%, примерно 1,5%, примерно 1,6%, примерно 1,7%, примерно 1,8%, примерно 1,9%, примерно 2,0%, примерно 2,1%, примерно 2,2%, примерно 2,3%, примерно 2,4%, примерно 2,5%, примерно 2,6%, примерно 2,7%, примерно 2,8%, примерно 2,9% или примерно 3,0% от одного или нескольких кормовых сахаров по массе сухого вещества.

В некоторых вариантах осуществления предложенный в настоящем изобретении катализатор присутствует в количестве примерно от 0,01% до 5%, примерно от 0,02% до 4%, примерно от 0,03% до 3% или примерно от 0,05% до 2% от водной композиции по массе сухого вещества. В некоторых вариантах

осуществления предложенный в настоящем изобретении катализатор присутствует в количестве примерно от 1% до 2% от водной композиции по массе сухого вещества. В некоторых вариантах осуществления предложенный здесь катализатор присутствует в количестве примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1,0%, примерно 1,1%, примерно 1,2%, примерно 1,3%, примерно 1,4%, примерно 1,5%, примерно 1,6%, примерно 1,7%, примерно 1,8%, примерно 1,9%, примерно 2,0%, примерно 2,1%, примерно 2,2%, примерно 2,3%, примерно 2,4%, примерно 2,5%, примерно 2,6%, примерно 2,7%, примерно 2,8%, примерно 2,9% или примерно 3,0% от водной композиции по массе сухого вещества.

В некоторых вариантах осуществления предлагаемый в настоящем изобретении катализатор представляет собой комбинацию двух или более различных катализаторов. В некоторых вариантах осуществления катализатор включает пригодный для повторного использования катализатор, такой как смолы и полимерные катализаторы, и не подлежащий повторному использованию катализатор. В некоторых вариантах осуществления, когда катализатор включает по меньшей мере два разных катализатора, каждый из катализаторов присутствует в количестве, предусмотренном в настоящем изобретении. В других вариантах осуществления, где катализатор включает по меньшей мере два разных катализатора, по меньшей мере два разных катализатора присутствуют в совокупности в указанном в настоящем изобретении количестве.

В некоторых вариантах осуществления катализатор добавляют в водную композицию в сухой форме. В других вариантах осуществления катализатор добавляют в водную композицию во влажной форме, например, в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления катализатор объединяют с одним или несколькими кормовыми сахарами перед добавлением воды. В других вариантах осуществления катализатор растворяют в воде перед его объединением с одним или несколькими кормовыми сахарами. В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящем изобретении, включает получение водной композиции путем объединения одного или нескольких кормовых сахаров в дегидратированной форме и катализатора во влажной форме (например, в виде водного раствора).

C. Добавление воды.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении способ производства олигосахаридных препаратов включает добавление воды для образования водной композиции. В некоторых вариантах осуществления всю или часть воды в водной композиции добавляют в виде свободной воды. В других вариантах осуществления всю воду в водной композиции добавляют в виде связанной воды, например, в моно- или дигидрате сахарида. В некоторых вариантах осуществления всю воду в водной композиции добавляют в виде связанной воды в моногидрате моносахарида, таком как моногидрат глюкозы. В некоторых вариантах осуществления всю или часть воды в водной композиции добавляют с катализатором, то есть через раствор катализатора.

D. Содержание воды.

По мере развития способов производства олигосахаридных препаратов вода может быть получена посредством реакции. Например, в некоторых вариантах осуществления воду получают (i) с образованием гликозидной связи, (ii) с образованием ангидро-субъединицы или (iii) с помощью других механизмов или источников. Поскольку обе реакции конденсации сахара и дегидратации включают воду, в некоторых вариантах осуществления содержание воды влияет на состав олигосахаридного препарата.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления содержание воды влияет на вязкость водной композиции, что, в свою очередь, может влиять на эффективность смешивания водной композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления чрезмерно вязкая водная композиция может привести к нежелательному гетерогенному распределению катализатора в водной композиции. Более того, в некоторых вариантах очень низкое содержание воды может привести к затвердеванию водной композиции, что препятствует эффективному смешиванию. С другой стороны, в некоторых других вариантах осуществления чрезвычайно высокое содержание воды может препятствовать реакции конденсации сахара и понижать уровень ангидро-субъединиц. Соответственно, настоящее изобретение описывает подходящее содержание воды для производства олигосахаридных препаратов.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении способ производства олигосахаридного препарата включает формирование и/или нагревание водной композиции. В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит примерно от 0% до 80%, примерно от 0% до 70%, примерно от 0% до 60%, примерно от 0% до 50%, примерно от 0% до 40%, примерно от 0% до 35%, примерно от 0% до 30%, примерно от 0% до 25%, примерно от 0% до 20%, примерно от 0% до 19%, примерно от 0% до 18%, примерно от 0% до 17%, примерно от 0% до 16%, примерно от 0% до 15%, примерно от 0% до 14%, примерно от 0% до 13%, примерно от 0% до 12%, примерно от 0% до 11%, примерно от 0% до 10%, примерно от 0% до 9%, примерно от 0% до 8%, примерно от 0% до 7%, примерно от 0% до 6%, примерно от 0% до 5%, примерно от 0% до 4%, примерно от 0% до 3%, примерно от 0% до 2% или примерно от 0% до 1% воды от общей массы. В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 18%, примерно от 1% до 16%, примерно от 1% до 14%, примерно от 1% до 12%, примерно от 1% до 10%, примерно от 1% до 8%, примерно от 1% до 6% или примерно от 1% до 4% воды от общей массы. В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит примерно от 3% до 16%, примерно от 3% до 14%, примерно от 3%

до 12%, примерно от 3% до 10%, примерно от 3% до 8%, примерно от 3% до 6%, примерно от 5% до 16%, примерно от 5% до 14%, примерно от 5% до 12%, примерно от 5% до 10%, примерно от 7% до 16%, примерно от 7% до 14%, примерно от 7% до 12%, примерно от 7% до 10% или примерно от 8% до 10% воды от общей массы. В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14% или примерно 15% воды от общей массы. В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит примерно 9% воды от общей массы. Однако следует понимать, что количество воды в водной композиции можно регулировать в зависимости от условий реакции и конкретного используемого катализатора. В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции, как описано выше, измеряют в начале реакции, например, перед нагреванием кормовых сахаров. В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции, описанной выше, измеряют в конце реакции полимеризации или конденсации. В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции, описанной выше, измеряют как среднее содержание воды в начале реакции и в конце реакции.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем изобретении, может дополнительно включать мониторинг содержания воды, присутствующей в водной композиции, и/или отношения воды к сахарам или катализатору в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции, например, путем дистилляции. Для удаления воды из водной композиции можно использовать любой способ, известный в данной области техники, включая, например, вакуумную фильтрацию, вакуумную перегонку, нагревание, пар, горячий воздух и/или испарение.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении олигосахаридные препараты являются гигроскопичными. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гигроскопичность кормовых сахаров и олигосахаридов, образующихся при полимеризации, может влиять на скорость, с которой вода может быть удалена из водной композиции.

В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы содержание воды в водной композиции составляло примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 18%, примерно от 1% до 16%, примерно от 1% до 14%, примерно от 1% до 12%, примерно от 1% до 10%, примерно от 1% до 8%, примерно от 2% до 16% примерно от 2% до 14%, примерно от 2% до 12%, примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 6%, примерно от 4% до 16%, примерно от 4% до 14%, примерно от 4% до 12%, примерно от 4% до 10%, примерно от 4% до 8%, примерно от 6% до 16%, примерно от 6% до 12%, примерно от 6% до 10% или примерно от 6% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8% или примерно от 4% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции, так чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно от 4% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы в конце реакции полимеризации и/или конденсации содержание воды в водной композиции было таким, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы в начале реакции полимеризации и/или конденсации среднее содержание воды в водной композиции было таким, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы среднее содержание воды в водной композиции в начале и в конце реакции полимеризации и/или конденсации находилось в пределах диапазона, описанного выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции, так чтобы на протяжении реакции полимеризации и/или конденсации содержание воды в водной композиции было в пределах диапазона, описанного выше.

В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 18%, примерно от 1% до 16%, примерно от 1% до 14%, примерно от 1% до 12%, примерно от 1% до 10%, примерно от 1% до 8%, примерно от 2% до 16%, примерно от 2% до 14%, примерно от 2% до 12%, примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 6%, примерно от 4% до 16%, примерно от 4% до 14%, примерно от 4% до 12%, примерно от 4% до 10%, примерно от 4% до 8%, примерно от 6% до 16%, примерно от 6% до 12%, примерно от 6% до 10% или примерно от 6% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8% или при-

мерно от 4% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию, так чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно от 4% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы в конце реакции полимеризации и/или конденсации содержание воды в водной композиции было таким, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы в начале реакции полимеризации и/или конденсации содержание воды в водной композиции было таким, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы среднее содержание воды в водной композиции в начале и в конце реакции полимеризации и/или конденсации находилось в пределах диапазона, описанного выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию, так чтобы на протяжении реакции полимеризации и/или конденсации содержание воды в водной композиции оставалось в пределах диапазона, описанного выше.

В некоторых вариантах осуществления степени полимеризации олигосахаридов и/или количество и тип ангидро-субъединиц в олигосахаридном препарате можно регулировать, устанавливая или контролируя содержание воды, присутствующей в водной композиции, на протяжении всего производственного процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления степень полимеризации олигосахаридов и количество ангидро-субъединиц увеличивают за счет уменьшения содержания воды.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает внутрипроцессный контроль (IPC) содержания воды, который может включать мониторинг содержания воды, поддержание содержания воды, увеличение содержания воды, уменьшение содержания воды или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления процесс IPC включает поддержание содержания воды, пока водная композиция нагревается до температуры, описанной в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления способ включает поддержание содержания воды в течение времени, достаточного для индукции полимеризации. В некоторых вариантах осуществления способ включает поддержание содержания воды в раскрытом диапазоне либо путем добавления воды, либо путем удаления воды из водной композиции, либо путем и того, и другого. В некоторых вариантах осуществления способ включает поддержание содержания воды в раскрытом диапазоне путем перегонки. В некоторых вариантах осуществления способ включает поддержание содержания воды в раскрытом диапазоне с помощью вакуумной перегонки. В некоторых вариантах осуществления способ включает поддержание содержания воды в раскрытом диапазоне путем перегонки при атмосферном давлении.

В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции поддерживают в диапазоне примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 18%, примерно от 1% до 16%, примерно от 1% до 14%, примерно от 1% до 12%, примерно от 1% до 10%, примерно от 1% до 8%, примерно от 2% до 16%, примерно от 2% до 14% примерно от 2% до 12%, примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 6%, примерно от 4% до 16%, примерно от 4% до 14%, примерно от 4% до 12%, примерно от 4% до 10%, примерно от 4% до 8%, примерно от 6% до 16%, примерно от 6% до 12%, примерно от 6% до 10% или примерно от 6% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции поддерживают в диапазоне примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8% или примерно от 4% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции поддерживают в диапазоне примерно от 2% до 8% от общей массы.

Содержание воды в водной композиции может быть определено множеством аналитических методов и инструментов. В некоторых вариантах осуществления содержание воды определяют методом испарения (например, методом потери массы при сушке), методом дистилляции или методом химической реакции (например, титрованием по Карлу Фишеру). В некоторых вариантах осуществления содержание воды определяют аналитическим прибором, таким как анализатор влажности. В некоторых вариантах осуществления содержание воды определяют титрованием по Карлу Фишеру.

В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции измеряют во время реакции и используют для осуществления контроля содержания воды в процессе производства (IPC). В некоторых вариантах осуществления содержание воды в реакции измеряют титрованием по Карлу-Фишеру, ИК-спектроскопией, БИК-спектроскопией, по проводимости, вязкости, плотности, моменту перемешивания или энергии перемешивания. В некоторых вариантах осуществления измерение содержания воды в реакции используют для управления устройством, которое активно регулирует содержание воды в реакции, например, насосом для добавления воды или проточным клапаном.

Не желая углубляться в теорию, считается, что содержание воды во время реакции полимеризации сахара и/или конденсации может влиять на уровень ангидро-субъединиц в описанном здесь олигосахаридном препарате. Например, как показано на фиг. 30, в некоторых вариантах осуществления более высокое содержание воды коррелирует с более низким уровнем ангидро-субъединиц. В некоторых вариан-

тах осуществления более низкая температура реакции может коррелировать с более низким уровнем содержания ангидро-субъединиц.

E. Температура.

В некоторых вариантах осуществления степени полимеризации олигосахаридов и/или количество и тип ангидро-субъединиц в олигосахаридном препарате можно регулировать путем регулирования температуры, до которой нагревают водную композицию. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении способ производства олигосахаридного препарата включает нагревание водной композиции до температуры примерно от 80°C до 250°C, примерно от 90°C до 200°C, примерно от 100°C до 200°C, примерно от 100°C до 180°C, примерно от 110°C до 170°C, примерно от 120°C до 160°C, примерно от 130°C до 150°C или примерно от 135°C до 145°C. В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридного препарата включает нагревание водной композиции до температуры примерно от 100°C до 200°C, примерно от 100°C до 180°C, примерно от 110°C до 170°C, примерно от 120°C до 160°C, примерно от 130°C до 150°C или примерно от 135°C до 145°C. В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридного препарата включает нагревание водной композиции до температуры примерно от 135°C до 145°C. В других вариантах осуществления способ производства олигосахаридного препарата включает нагревание водной композиции до температуры примерно от 125°C до 135°C.

F. Время реакции.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении способ производства олигосахаридного препарата включает нагревание водной композиции в течение достаточного времени. В некоторых вариантах осуществления степень полимеризации олигосахаридов, полученных в соответствии с описанными здесь способами, может быть отрегулирована временем реакции.

В некоторых вариантах осуществления достаточное время описывают количеством часов. Например, в некоторых вариантах осуществления достаточное время составляет по меньшей мере 30 мин, по меньшей мере 1 ч, по меньшей мере 2 ч, по меньшей мере 3 ч, по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 5 ч, по меньшей мере 6 ч, по меньшей мере 7 ч, по меньшей мере 8 ч, по меньшей мере 9 часов или по меньшей мере 10 ч. В некоторых вариантах осуществления достаточное время составляет примерно от 1 до 24 ч, примерно от 1 до 16 ч, примерно от 1 до 8 ч, примерно от 1 до 4 ч, примерно от 1 до 3 ч, примерно от 1 до 2 ч, примерно от 2 до 12 ч, примерно от 2 до 10 ч, примерно от 2 до 8 ч, примерно от 2 до 6 ч, примерно от 2 до 4 ч, примерно от 3 до 8 ч, примерно от 3 до 6 ч, примерно от 3 до 5 ч или примерно от 3 до 4 ч.

В других вариантах осуществления достаточное время определяют путем измерения одного или нескольких химических или физических свойств олигосахаридного препарата, например, содержания воды, вязкости, молекулярной массы, содержания ангидро-субъединиц, и/или распределения по степени полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу олигосахаридного препарата контролируют во время полимеризации. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для того, чтобы водная композиция достигла среднечисленной молекулярной массы или средневесовой молекулярной массы, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для достижения водной композиции среднечисленной молекулярной массы в диапазоне примерно от 300 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 5000 г/моль, примерно от 700 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 2000 г/моль, примерно от 700 до 2000 г/моль, примерно от 700 до 1500 г/моль, примерно от 300 до 1500 г/моль, примерно от 300 до 2000 г/моль, примерно от 400 до 1000 г/моль, примерно от 400 до 900 г/моль, примерно от 400 до 800 г/моль, примерно от 500 до 900 г/моль, или примерно от 500 до 800 г/моль. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для достижения водной композиции среднечисленной молекулярной массы примерно от 500 до 2000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для достижения водной композиции средневесовой молекулярной массы в диапазоне примерно от 300 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 5000 г/моль, примерно от 700 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 2000 г/моль, примерно от 700 до 2000 г/моль, примерно от 700 до 1500 г/моль, примерно от 300 до 1500 г/моль, примерно от 300 до 2000 г/моль, примерно от 400 до 1300 г/моль, примерно от 400 до 1200 г/моль, примерно от 400 до 1100 г/моль, примерно от 500 до 1300 г/моль, примерно от 500 до 1200 г/моль, примерно от 500 до 1100 г/моль, примерно от 600 до 1300 г/моль, примерно от 600 до 1200 г/моль или примерно от 600 до 1100 г/моль. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для достижения водной композиции средневесовой молекулярной массы примерно от 700 до 3000 г/моль.

В некоторых вариантах осуществления достаточное время - это время, необходимое водной композиции для достижения реакционного равновесия при соответствующей температуре реакции. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для того, чтобы водная композиция достигла равновесия. Например, в некоторых вариантах осуществления равновесие определяют путем измерения молекулярной массы, вязкости или

распределения DP водной композиции.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют путем измерения среднечисленной или средневесовой молекулярной массы водной композиции. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяется среднечисленной или средневесовой молекулярной массой водной композиции, которая остается практически неизменной с течением времени. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяется изменением среднечисленной или средневесовой молекулярной массы водной композиции, которое составляет менее определенного процента в течение периода времени. В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу водной композиции измеряют с помощью ВЭЖХ или SEC.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по изменению среднечисленной или средневесовой молекулярной массы водной композиции менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5% в течение периода времени. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют изменением среднечисленной или средневесовой молекулярной массы водной композиции в течение 3 ч, 2 ч, 1 ч, 30 мин, 20 мин или 10 мин. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют изменением средневесовой молекулярной массы водной композиции менее чем на 15% в течение 1 ч.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют путем измерения вязкости водной композиции. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по вязкости водной композиции, которая остается практически неизменной с течением времени. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по изменению вязкости водной композиции, которая составляет менее определенного процента в течение периода времени. В некоторых вариантах вязкость водной композиции измеряют вискозиметром или реометром.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по изменению вязкости водной композиции менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5% за период времени. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по изменению вязкости водной композиции в течение 3 ч, 2 ч, 1 ч, 30 мин, 20 мин или 10 мин. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по изменению вязкости водной композиции менее чем на 15% за период 1 ч.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют путем измерения распределения DP водной композиции. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют распределением DP водной композиции, которое остается по существу неизменным с течением времени. В некоторых вариантах осуществления изменение распределения DP водной композиции определяют путем вычисления ряда Km, где $Km=\frac{[DP_m][H_2O]}{[DP_{m-1}][DP1]}$, где $[H_2O]$ представляет собой молярную концентрацию воды (моль/л), а [DP1], [DPm-1] и [DPm] представляют собой молярные концентрации олигосахаридов (моль/л) в DP1, DPm-1 и DPm фракциях, соответственно. Например, K2 равно $[DP2][H_2O]/[DP1][DP1]$ согласно приведенной выше формуле. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число более 1 и менее n. В других вариантах осуществления m равно n. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число больше 1 и или равное n или менее. В некоторых вариантах осуществления m равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В некоторых вариантах осуществления концентрацию олигосахаридов во фракциях DP1, DPm-1 и DPm определяют с помощью SEC, ВЭЖХ, ПФП, A4F, масс-спектрометрии или любого другого подходящего метода. В некоторых вариантах осуществления концентрацию олигосахаридов во фракциях DP1, DPm-1 и DPm определяют с помощью SEC, например, ГПХ. В некоторых вариантах осуществления концентрацию олигосахаридов во фракциях DP1, DPm-1 и DPm определяют масс-спектрометрией, такой как ГХ-МС, ЖХ-МС/МС и MALDI-МС. В некоторых вариантах осуществления концентрацию олигосахаридов во фракциях DP1, DPm-1 и DPm определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления концентрацию воды определяют методом испарения (например, методом потери при сушке), методом дистилляции или методом химической реакции (например, титрованием по Карлу Фишеру). В некоторых вариантах осуществления концентрацию воды определяют любым подходящим аналитическим прибором, таким как анализатор влажности.

В некоторых вариантах осуществления способ включает вычисление ряда из по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40 или по меньшей мере 50 значений Km. В некоторых вариантах осуществления способ включает вычисление ряда из по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 15 значений Km. В некоторых вариантах осуществления способ включает вычисление примерно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 15 значений Km. В некоторых вариантах осуществления способ включает вычисление от K2 до K4, от K2 до K5, от K2 до K6, от K2 до K7, от K2 до K8, от K2 до K9, от K2 до K10, от K2 до K11, от K2 до K12, от K2 до K13, от K2 до K14, от K2 до K15, от K3 до K5, от K3 до K6, от K3 до K7, от K3 до K8, от K3 до K9, от K3 до K10, от K3 до K11, от K3 до K12, от K3 до K13, от K3 до K14, или от K3 до K15. В некоторых вариантах осуществления способ включает вычисление от K2 до K4 или от K3 до K5.

В некоторых вариантах осуществления значение Km зависит от температуры, концентрации воды и/или количества и типа кормовых сахаров. В некоторых вариантах осуществления Km составляет при-

мерно от 0,1 до 100, примерно от 0,1 до 90, примерно от 0,1 до 80, примерно от 0,1 до 70, примерно от 0,1 до 60, примерно от 0,1 до 50, примерно от 0,1 до 40, примерно от 0,1 до 30, примерно от 0,1 до 25, примерно от 0,1 до 20 или примерно от 0,1 до 15. В некоторых вариантах осуществления Km составляет примерно от 1 до 100, примерно от 1 до 90, примерно от 1 до 80, примерно от 1 до 70, примерно от 1 до 60, примерно от 1 до 50, примерно от 1 до 40, примерно от 1 до 30, примерно от 1 до 25, примерно от 1 до 20, примерно от 1 до 15, примерно от 1 до 10, примерно от 5 до 50, примерно от 5 до 40, примерно от 5 до 30, примерно от 5 до 20, примерно от 5 до 15 или примерно от 5 до 10. В некоторых вариантах осуществления Km составляет примерно от 1 до 15 или примерно от 5 до 15.

В некоторых вариантах осуществления для ряда рассчитанных Km определяют среднее значение, стандартное отклонение и/или относительное стандартное отклонение. В данном контексте относительное стандартное отклонение выражают в процентах и получают путем умножения стандартного отклонения на 100 и деления этого произведения на среднее значение.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют относительным стандартным отклонением ряда Km менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1%. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют относительным стандартным отклонением ряда Km менее 15%, менее 10% или менее 5%.

G. Стадии после реакции.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении способ производства олигосахаридных препаратов дополнительно включает одну или несколько дополнительных стадий обработки после нагревания водной композиции при температуре и в течение достаточного времени. В некоторых вариантах осуществления дополнительные стадии обработки включают, например, разделение (такое как хроматографическое разделение), разбавление, концентрирование, сушку, фильтрацию, деминерализацию, экстракцию, обесцвечивание или любую их комбинацию. Например, в некоторых вариантах осуществления способ включает стадию разбавления и стадию обесцвечивания. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию фильтрации и стадию сушки.

В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию разбавления, на которой воду добавляют в олигосахаридный препарат для получения сиропа олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления концентрация олигосахаридного препарата в сиропе составляет примерно от 5% до 80%, примерно от 10% до 70%, примерно от 10% до 60%, примерно от 10% до 50%, примерно от 10% до 40%, примерно от 10% до 30%, или примерно от 15% до 25%. В других вариантах осуществления способ не включает стадию разбавления, а скорее олигосахаридному препарату дают затвердеть. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию фильтрации. В некоторых вариантах осуществления способ включает рециркуляцию катализатора путем фильтрации.

В некоторых вариантах осуществления описанный способ включает стадию обесцвечивания. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат может подвергаться стадии обесцвечивания с использованием любого метода, известного в данной области техники, включая, например, обработку абсорбентом, активированным углем, хроматографию (например, с использованием ионообменной смолы), гидрирование и/или фильтрацию (например, микрофильтрацию).

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат приводят в контакт с материалом для удаления солей, минералов и/или других ионных частиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат пропускают через пару анионо/катионообменных колонок. В одном варианте осуществления анионообменная колонка содержит слабую смолу для обмена оснований в форме гидроксида, а катионообменная колонка содержит сильную смолу для обмена кислот в протонированной форме.

В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию концентрирования. В некоторых вариантах осуществления на стадии концентрирования получают олигосахаридный препарат с повышенной концентрацией. Например, в некоторых вариантах осуществления стадия концентрирования включает выпаривание (например, вакуумное испарение), сушку (например, лиофилизацию и распылительную сушку) или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию выделения, на которой отделяют по меньшей мере часть олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления стадия выделения включает кристаллизацию, осаждение, фильтрацию (например, вакуумную фильтрацию) и центрифугирование, или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию разделения. В некоторых вариантах осуществления стадия разделения включает отделение по меньшей мере части олигосахаридного препарата по меньшей мере от части катализатора, по меньшей мере от части непрореагировавших кормовых сахаров, или от того и другого. В некоторых вариантах осуществления стадия разделения включает фильтрацию, хроматографию, дифференциальную растворимость, осаждение, экстракцию или центрифугирование.

H. Реакторы.

Описанные в настоящем изобретении способы могут включать использование одного или нескольких реакторов, подходящих для конденсации сахара, с учетом температуры реакции, pH, давления и дру-

гих факторов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько подходящих реакторов включают реактор периодического действия с подпиткой и перемешиванием, реактор периодического действия с мешалкой, реактор с непрерывным потоком с мешалкой, реактор непрерывного действия с поршневым потоком, реактор с истиранием или реактор с перемешиванием, индуцируемым электромагнитным полем. В некоторых вариантах осуществления один или несколько подходящих реакторов включают реактор, описанный в Ryu, S. K., and Lee, J. M., Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor, Biotechnol. Bioeng. 25: 53-65(1983); Gusakov, A. V., and Sinitsyn, A. P., Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process, Enz. Microb. TechnoL, 7: 346-352 (1985); Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field, Appl. Biochem. Biotechnol., 56: 141-153(1996); or Fernanda de Castilhos Corazza, Flavio Faria de Moraes, Gisella Maria Zanin and Ivo Neitzel, Optimal control in fed-batch reactor for the cellobiose hydrolysis, Acta Scientiarum. Technology, 25: 33-38 (2003).

В некоторых вариантах осуществления один или несколько подходящих реакторов включают реакторы с псевдоожиженным слоем, с бланкетом с восходящим потоком, с иммобилизацией, или реакторы экструдерного типа для гидролиза и/или ферментации. В некоторых вариантах осуществления один или несколько подходящих реакторов включают открытый реактор, закрытый реактор, или оба из них. В некоторых вариантах осуществления, когда способ включает непрерывный процесс, один или несколько подходящих реакторов могут включать смеситель непрерывного действия, такой как шнековый смеситель.

I. Процесс.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении способ производства олигосахаридных препаратов включает периодический процесс, непрерывный процесс или и то, и другое. В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридного препарата включает периодический процесс. Например, в некоторых вариантах осуществления периодического процесса производство последующих партий олигосахаридного препарата не начинают до завершения текущей партии. В некоторых вариантах осуществления во время периодического процесса весь препарат или существенное количество олигосахаридного препарата удаляют из реактора. В некоторых вариантах осуществления во время периодического процесса все кормовые сахара и катализатор объединяют в реакторе до того, как водная композиция нагревается до описанной температуры, или до того, как инициируют полимеризацию. В некоторых вариантах осуществления во время периодического процесса кормовые сахара добавляют до, после или одновременно с добавлением катализатора.

В некоторых вариантах осуществления периодический процесс представляет собой периодический процесс с подпиткой, где все кормовые сахара не добавляют в реактор одновременно. В некоторых вариантах осуществления периодического процесса с подпиткой по меньшей мере часть кормовых сахаров добавляют в реактор во время полимеризации или после того, как водная композиция нагревается до описанной температуры. В некоторых вариантах осуществления периодического процесса с подпиткой по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 60% по массе кормовых сахаров добавляют в реактор во время полимеризации или после того, как водная композиция нагревается до описанной температуры.

В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридного препарата представляет собой непрерывный процесс. Например, в некоторых вариантах осуществления непрерывного процесса содержимое реактора непрерывно протекает через реактор. В некоторых вариантах осуществления комбинацию кормовых сахаров с катализатором и удаление по меньшей мере части олигосахаридного препарата выполняют одновременно.

В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридного препарата включает однореакторный и многореакторный процесс. Например, в некоторых вариантах осуществления однореакторного процесса полимеризацию проводят в одном реакторе. В качестве другого примера, в некоторых вариантах осуществления многореакторного процесса полимеризацию проводят в более чем одном реакторе. В некоторых вариантах осуществления многореакторного процесса способ включает 2, 3 или более реакторов. В некоторых вариантах осуществления многореакторного процесса способ включает стадию комбинирования, на которой объединяют продукты полимеризации из двух или более реакторов.

IV. Питательные композиции, включающие олигосахаридные препараты.

В настоящем изобретении представлены питательные композиции, содержащие олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены питательные композиции, содержащие описанный олигосахаридный препарат, где присутствие и/или концентрация олигосахаридного препарата в составе питательных композиций могут быть выборочно определены и/или обнаружены. Олигосахаридные препараты, которые демонстрируют сложную функциональную модуляцию микробного сообщества, могут быть важными компонентами питательных композиций. Таким образом, присутствие и/или концентрация олигосахаридного препарата в питательных композициях может быть одним из факторов, которые необходимо измерять в процессе контроля качества и производства питательных композиций. Соответственно, предлагаемые питательные композиции являются выгодными с точки зрения контроля качества и производственных целей, поскольку присутствие и/или концентрация олигосахаридного препарата могут быть выборочно определены и/или обнаружены. На-

пример, в некоторых вариантах осуществления присутствие и концентрацию олигосахаридного препарата можно определить и/или обнаружить путем измерения сигнала, связанного с олигосахаридами, содержащими ангидро-субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления питательная композиция представляет собой кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления питательная композиция включает основную питательную композицию.

А. Основные питательные композиции.

В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит источник углеводов, отличный от олигосахаридного препарата. Например, в некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция включает натуральный источник углеводов, такой как крахмал и растительные волокна. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит крахмал. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит растительные волокна.

В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит один или несколько источников углеводов, которые получены из семян, корней, клубней, кукурузы, тапиоки, маранта, пшеницы, риса, картофеля, сладкого картофеля, саго, бобов (например, кормовых бобов, чечевицы, бобов мунг, гороха и нута), кукурузы, маниоки или других крахмалистых продуктов (например, желудей, маранта, арракачи, бананов, ячменя, плодов хлебного дерева, гречки, канны, колоказии, кандыка японского, пуэрарии, ксантозомы, проса, овса, кислицы клубненосной, полинезийского маранта, сорго, ржи, таро, каштана, водяного ореха и ямса).

В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит один или несколько источников углеводов, которые получены из бобовых (например, гороха, соевых бобов, люпина, зеленой фасоли и других бобов), овса, ржи, чиа, ячменя, фруктов (например, инжира, авокадо, сливы, чернослива, ягод, бананов, кожуры яблока, айвы и груши), овощей (например, брокколи, моркови, цветной капусты, кабачков, сельдерея, нопала и топинамбура), корневых клубней, корнеплодов (например, сладкого картофеля и лука), шелухи семян подорожника, семян (например, семян льна), орехов (например, миндаля), цельнозерновых продуктов, пшеницы, кукурузных отрубей, лигнанов, или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления композиция включает одно или несколько растительных волокон, полученных из пшеничных отрубей, жома сахарной свеклы, пушистых семян хлопка, шелухи сои или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит менее 500 ч/млн, менее 400 ч/млн, менее 300 ч/млн, менее 200 ч/млн, менее 100 ч/млн, менее 50 ч/млн, менее 10 ч/млн, менее 5 ч/млн или менее 1 ч/млн ангидро-субъединиц или олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит менее 50 ч/млн, менее 10 ч/млн, менее 5 ч/млн или менее 1 ч/млн ангидро-субъединиц или олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция по существу не содержит ангидро-субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления в основной питательной композиции отсутствует определяемый уровень ангидро-субъединиц. В зависимости от методов детекции или определения уровень ангидро-субъединиц ниже определенного порога может быть не обнаруживаемым. Например, в некоторых вариантах осуществления обнаруживаемый уровень ангидро-субъединиц может относиться к по меньшей мере 1000 ч/млн, по меньшей мере 500 ч/млн, по меньшей мере 400 ч/млн, по меньшей мере 300 ч/млн, по меньшей мере 200 ч/млн, по меньшей мере 100 ч/млн, по меньшей мере 50 ч/млн, по меньшей мере 10 ч/млн, по меньшей мере 5 ч/млн или по меньшей мере 1 ч/млн ангидро-субъединиц или олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в основной питательной композиции.

В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит множество олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция включает распределение типа гликозидной связи, которое отличается от олигосахаридного препарата. Например, в некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит более высокий процент α-(1,4) гликозидных связей, чем олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления гликозидные связи, такие как α-(1,4) гликозидные связи в основных питательных композициях, расщепляются одним или несколькими ферментами. В некоторых вариантах осуществления гликозидные связи в основной питательной композиции легче расщепляются и/или гидролизуются, чем гликозидные связи в олигосахаридном препарате.

В некоторых вариантах осуществления уровень α-(1,2) гликозидной связи, α-(1,3) гликозидной связи, α-(1,6) гликозидной связи, β-(1,2) гликозидной связи, β-(1,3) гликозидной связи, β-(1,4) гликозидной связи или β-(1,6) гликозидной связи в основной питательной композиции по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, по меньшей мере на 13%, по меньшей мере на 14%, или по меньшей мере на 15% ниже уровня соответствующей гликозидной связи в олигосахаридном препара-

те. В некоторых вариантах осуществления уровень α-(1,2) гликозидной связи, α-(1,3) гликозидной связи, α-(1,6) гликозидной связи, β-(1,2) гликозидной связи, β-(1,3) гликозидной связи, β-(1,4) гликозидной связи или β-(1,6) гликозидной связи в основной питательной композиции по меньшей мере на 10% ниже уровня соответствующей гликозидной связи в олигосахаридном препарате.

В некоторых вариантах осуществления уровень α-(1,4) гликозидной связи в основной питательной композиции по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 5% или по меньшей мере на 2% выше уровня α-(1,4) гликозидной связи в олигосахаридном препарате. В некоторых вариантах осуществления уровень α-(1,4) гликозидной связи в основной питательной композиции по меньшей мере на 10% выше уровня α-(1,4) гликозидной связи в олигосахаридном препарате.

B. Кормовая композиция для животных.

В зависимости от типа и возраста животного питательная композиция может содержать олигосахаридный препарат и основную питательную композицию в различных соотношениях. Например, олигосахаридный препарат можно комбинировать с основной питательной композицией в различных соотношениях, подходящих для типа и возраста животного. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации примерно от 1 до 10000 ч/млн, примерно от 1 до 5000 ч/млн, примерно от 1 до 3000 ч/млн, примерно от 1 до 2000 ч/млн, примерно от 1 до 1500 ч/млн, примерно от 1 до 1000 ч/млн, примерно от 1 до 500 ч/млн, примерно от 1 до 250 ч/млн, примерно от 1 до 100 ч/млн, примерно от 10 до 5000 ч/млн, примерно от 10 до 3000 ч/млн, примерно от 10 до 2000 ч/млн, примерно от 10 до 1500 ч/млн, примерно от 10 до 1000 ч/млн, примерно от 10 до 500 ч/млн, примерно от 10 до 250 ч/млн, примерно от 10 до 100 ч/млн, примерно от 50 до 5000 ч/млн, примерно от 50 до 3000 ч/млн, примерно от 50 до 2000 ч/млн, примерно от 50 до 1500 ч/млн, примерно от 50 до 1000 ч/млн, примерно от 50 до 500 ч/млн, примерно от 50 до 250 ч/млн, примерно от 50 до 100 ч/млн, примерно от 100 до 5000 ч/млн, примерно от 100 до 3000 ч/млн, примерно от 100 до 2000 ч/млн, примерно от 100 до 1500 ч/млн, примерно от 100 до 1000 ч/млн, примерно от 100 до 500 ч/млн, примерно от 100 до 400 ч/млн, примерно от 100 до 300 ч/млн, примерно от 100 до 200 ч/млн, примерно от 200 до 5000 ч/млн, примерно от 200 до 3000 ч/млн, примерно от 200 до 2500 ч/млн, примерно от 200 до 2000 ч/млн, примерно от 200 до 1500 ч/млн, примерно от 200 до 1000 ч/млн, примерно от 200 до 500 ч/млн, примерно от 500 до 5000 ч/млн, примерно от 500 до 3000 ч/млн, примерно от 500 до 2500 ч/млн, примерно от 500 до 2000 ч/млн, примерно от 500 до 1500 ч/млн или примерно от 500 до 1000 ч/млн. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации примерно от 1 до 5000 ч/млн, примерно от 1 до 1000 ч/млн, примерно от 1 до 500 ч/млн, примерно от 10 до 5000 ч/млн, примерно от 10 до 2000 ч/млн, примерно от 10 до 1000 ч/млн, примерно от 10 до 500 ч/млн, примерно от 10 до 250 ч/млн, примерно от 10 до 100 ч/млн, примерно от 50 до 5000 ч/млн, примерно от 50 до 2000 ч/млн, примерно от 50 до 1000 ч/млн, примерно от 50 до 500 ч/млн, примерно от 50 до 250 ч/млн или примерно от 50 до 100 ч/млн. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации примерно от 1 до 5000 ч/млн, примерно от 10 до 1000 ч/млн, примерно от 10 до 500 ч/млн или примерно от 50 до 500 ч/млн.

В некоторых вариантах осуществления, олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации более 10 ч/млн, более 50 ч/млн, более 100 ч/млн, более 200 ч/млн, более 300 ч/млн, более 400 ч/млн, более 500 ч/млн, более 600 ч/млн, более 1000 ч/млн или более 2000 ч/млн. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации более 10 ч/млн, более 50 ч/млн, более 100 ч/млн, более 200 ч/млн или более 500 ч/млн.

В некоторых вариантах осуществления в зависимости от типа и возраста животного, питательная композиция может дополнительно включать белки, минералы (такие как медь, кальций и цинк), соли, незаменимые аминокислоты, витамины и/или антибиотики.

В настоящем изобретении также предложен способ применения у животного питательной композиции, содержащей основную питательную композицию и описанный олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления животное выбрано из крупного рогатого скота (например, мясного и молочного скота), свиней, водных животных, домашних птиц и человека. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой свинью, такую как свиноматки, поросята и боровы. В других вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, такую как цыпленок, утка, индейка, гусь, перепел и курица. В некоторых вариантах осуществления изобретения домашняя птица представляет собой бройлера, племенную птицу или несушку. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой водное животное, такое как лосось, сом, окунь, угорь, тилапия, камбала, креветка и краб. В некоторых вариантах осуществления питательную композицию дают животному в сухой форме, жидкой форме, в виде пасты, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления форма применения, скорость кормления и режим кормления могут варьировать в зависимости от типа и

возраста животного.

C. Способы производства питательных композиций.

В настоящем изобретении представлены способы производства питательной композиции, включающие объединение олигосахаридного препарата с основной питательной композицией. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает распределение типа гликозидной связи, которое отличается от такового в основной питательной композиции.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат представляет собой синтетический олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn). В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное 2 или более. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число больше 2. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное 3 или более. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100, например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 или 50. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций DP1-DPn включает от 0,1% до 90% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций DP1 и DP2 олигосахаридного препарата независимо включает примерно от 0,1 до 15% или примерно от 0,5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций DP1 и DP2 олигосахаридного препарата независимо включает олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, в диапазоне примерно от 0,1%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4% или 1,5% до 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 15% или 20% по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов в каждой из n фракций монотонно уменьшается со степенью полимеризации. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов по меньшей мере в 5, 10, 20 или 30 фракциях DP монотонно уменьшается со степенью полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления способ производства питательной композиции включает смешивание олигосахаридного препарата с основной питательной композицией. Например, в некоторых вариантах осуществления смешивание может быть выполнено с помощью промышленного смесителя и/или такого смесителя, как барабанный смеситель, двухконусный смеситель, ленточный смеситель, V-образный смеситель, смеситель со сдвиговым усилием и лопастной смеситель.

В некоторых вариантах осуществления способ производства питательной композиции дополнительно включает описанную в настоящем изобретении стадию контроля качества. В некоторых вариантах осуществления описанная здесь стадия контроля качества включает определение уровня сигнала в образце питательной композиции и вычисление концентрации олигосахаридного препарата в питательной композиции на основе уровня сигнала. В некоторых вариантах осуществления описанная здесь стадия контроля качества включает детекцию сигнала в образце питательной композиции с помощью аналитических приборов, и приемку или браковку партии питательной композиции на основании наличия или отсутствия сигнала. В некоторых вариантах осуществления описанная здесь стадия контроля качества включает детекцию с помощью аналитических приборов наличия или отсутствия первого сигнала в первом образце питательной композиции и второго сигнала во втором образце питательной композиции, и сравнение первого сигнала и второго сигнала. В некоторых вариантах осуществления сигнал, первый сигнал и/или второй сигнал (i) указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц; (ii) ассоциирован с распределением олигосахаридов по степени полимеризации (DP); или (iii) ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями или β-(1,6) гликозидными связями олигосахаридов.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления способ производства питательной композиции включает после выполнения стадии контроля качества дополнительное смешивание олигосахаридного препарата с основной питательной композицией, регуляцию уровня олигосахаридного препарата, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления регуляция уровня олигосахаридного препарата включает добавление дополнительного олигосахаридного препарата в питательную композицию или удаление части олигосахаридного препарата из питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления регуляция уровня олигосахаридного препарата включает добавление дополнительной основной питательной композиции в питательную композицию или удаление части основной питательной композиции из питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления регуляция уровня олигосахаридного препарата включает добавление дополнительного олигосахаридного препарата в питательную композицию.

D. Премикс корма для животных.

В некоторых вариантах осуществления питательная композиция включает премикс корма для животных, содержащий описанный олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления премикс корма для животных содержит материал-носитель, который может быть объединен с олигосахаридным препаратом для получения премикса корма для животных. В некоторых вариантах осуществления материал-носитель может быть любым материалом в сухой или жидкой форме, который подходит для объединения с олигосахаридным препаратом в питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления материал-носитель включает сухой остаток после ферментации зерна, глину, вермикулит, диатомовую землю, шелуху, такую как измельченная рисовая шелуха и измельченная шелуха овса, диоксид кремния, такой как силикагель кормового качества, и коллоидный кремнезем кормового качества, кукурузу, такую как кукурузный глютен, кукурузная глютеновая мука и молотая кукуруза, или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления материал-носитель представляет собой измельченную кукурузу. В других вариантах осуществления материал-носитель представляет собой измельченную рисовую шелуху или измельченную шелуху овса.

В некоторых вариантах осуществления премикс корма для животных получают путем объединения материала-носителя с олигосахаридным препаратом, оба в сухой форме. В некоторых вариантах осуществления премикс корма для животных получают путем объединения материала-носителя с олигосахаридным препаратом; один из которых находится в сухом виде. В некоторых вариантах осуществления премикс корма для животных получают путем объединения материала-носителя с олигосахаридным препаратом, оба из которых находятся в жидкой форме. Например, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат в жидкой форме относится к олигосахариду в растворе, например, водному раствору олигосахаридов, такому как сироп.

В некоторых вариантах осуществления премикс корма для животных получают путем объединения материала-носителя с сиропом, содержащим олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления концентрация олигосахаридного препарата в сиропе составляет по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80% по массе. В некоторых вариантах осуществления концентрация олигосахаридного препарата в сиропе составляет примерно от 40 до 80%, от 50 до 75% или от 60 до 70% по массе.

В некоторых вариантах осуществления премикс корма для животных находится в виде порошка (например, текучего порошка), кашицы, суспензии, гранул или жидкости. В некоторых вариантах осуществления премикс корма для животных имеет содержание влаги менее 40%, 30%, 20%, 15%, 10% или 5% по массе. В некоторых вариантах осуществления премикс корма для животных имеет содержание влаги менее 10% или 5% по массе. В некоторых вариантах осуществления премикс корма для животных имеет содержание влаги более 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% по массе. В дополнительных вариантах осуществления содержание влаги в премиксе корма для животных регулируют до любого из описанных диапазонов. Например, в некоторых вариантах осуществления предварительную смесь корма для животных сушат для увеличения содержания влаги в описанном диапазоне.

В некоторых вариантах осуществления, в зависимости от конкретного применения, премикс корма для животных содержит различные уровни олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления премикс корма для животных содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% олигосахаридного препарата по массе сухого вещества. В некоторых вариантах осуществления премикс корма для животных содержит самое большее 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% олигосахаридного препарата по массе сухого вещества.

В некоторых вариантах осуществления, премикс корма для животных или материал-носитель дополнительно содержит другой корм для животных, такой как минералы, жиры и белки. В некоторых вариантах осуществления материал-носитель или премикс корма для животных содержит медь, цинк или и то, и другое. В некоторых вариантах осуществления материал-носитель или премикс корма для животных содержит ионофор или другой кокцидиостатик. В некоторых вариантах осуществления материал-носитель или премикс корма для животных содержит антибиотик. В некоторых вариантах осуществления материал-носитель включает источник углеводов. В некоторых вариантах осуществления источник углеводов в материале-носителе не содержит ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления источник углеводов в материале-носителе включает распределение типа гликозидной связи, которое отличается от распределения типа гликозидной связи олигосахаридного препарата.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ производства питательной композиции включает объединение премикса корма для животных с основной питательной композицией.

V. Способы обеспечения животных олигосахаридными препаратами.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, включают предоставление животным олигосахаридных препаратов. В некоторых вариантах животных лечат путем кормления или предоставления олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления у животных применяют олигосахаридный препарат в намеченной конкретной дозе. Конкретная доза может быть определена количественно, например, как масса олигосахаридного препарата, потребляемого жи-

вотным за единицу времени (например, граммов в день), или как масса олигосахаридного препарата, потребляемого животным в единицу времени на единицу массы тела животного (например, мг олигосахарида на кг массы тела в день). В некоторых вариантах осуществления конкретная доза олигосахаридного препарата составляет 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 или 10000 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления массу олигосахаридного препарата измеряют как содержание DP1+ в пересчете на сухие твердые вещества. В некоторых вариантах осуществления массу олигосахаридного препарата измеряют как содержание DP2+ в пересчете на сухие твердые вещества.

В некоторых вариантах осуществления животным предоставляют олигосахаридные препараты путем перорального введения в виде питательных композиций. В некоторых вариантах осуществления изобретения питательная композиция включает олигосахаридный препарат с фиксированной концентрацией или уровнем включения. Концентрация или уровень включения олигосахарида в питательную композицию могут быть определены количественно, например, по массовой доле олигосахаридного препарата на общую массу конечного корма или питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления концентрацию или уровень включения измеряют в частях на миллион (ч/млн) олигосахарида в пересчете на сухие вещества на конечную питательную композицию в исходном состоянии. В некоторых вариантах осуществления концентрацию олигосахаридного препарата измеряют как массовую долю частиц DP1+ в пересчете на сухие твердые вещества. В некоторых вариантах осуществления концентрацию олигосахаридного препарата измеряют как массовую долю частиц DP2+ в пересчете на сухие твердые вещества.

Рядовому специалисту в данной области техники известны различные способы и методики определения концентрации олигосахаридного препарата в питательной композиции или конечном корме для достижения заданной конкретной дозы. Например, среднесуточное потребление корма в зависимости от возраста установлено для различных видов цыплят-бройлеров и может использоваться диетологом или ветеринаром для определения необходимого уровня включения в конечный корм.

В некоторых вариантах осуществления у животных применяют олигосахаридные препараты путем перорального введения с потребляемыми жидкостями. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты поступают с питьевой водой. В некоторых вариантах осуществления концентрацию олигосахаридного препарата в питьевой воде выбирают так, чтобы обеспечить животному заданную конкретную дозу олигосахаридного препарата.

VI. Дисфункция желудочно-кишечного барьера.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, включают предотвращение или лечение дисфункции желудочно-кишечного барьера животного. Желудочно-кишечные барьеры животных состоят из слоя слизи и слоя эпителиальных клеток кишечника (включая, например, бокаловидные клетки). Кишечный эпителий действует как барьер для предотвращения проникновения вредных внутрипросветных частиц, включая чужеродные антигены, микроорганизмы и их токсины, а также другое кишечное содержимое (например, частицы пищи). Кишечный эпителий также действует как селективный фильтр, позволяющий перемещать основные диетические питательные вещества, электролиты и воду из просвета кишечника в кровоток.

Желудочно-кишечный эпителий обеспечивает избирательную проницаемость двумя основными путями: трансэпителиальным/трансцеллюлярным и парацеллюлярным. Трансцеллюлярная проницаемость обычно связана с транспортом растворенных веществ через эпителиальные клетки и преимущественно регулируется селективными переносчиками аминокислот, электролитов, короткоцепочечных жирных кислот и сахаров. Парацеллюлярная проницаемость связана с транспортом в пространстве между эпителиальными клетками и регулируется межклеточными комплексами, локализованными на стыке апикально-латеральной мембраны и вдоль латеральной мембраны. Контакт между эпителиальными клетками кишечника включает три основных компонента: десмосомы, спайки и плотные соединения.

Проницаемость желудочно-кишечных барьеров регулируется множеством факторов, включая, например, экзогенные факторы, эпителиальный апоптоз, цитокины, иммунные клетки и микробном желудочно-кишечного тракта. Бактерии микробиома и кишечные патогены могут нарушать кишечный барьер напрямую, связываясь с молекулами клеточной поверхности и вызывая изменения в экспрессии белков плотных контактов. Бактерии микробиома и кишечные патогены также могут генерировать токсины и протеазы, которые могут способствовать повреждению клеток и апоптозу, изменять транспорт эпителиальных ионов и нарушать плотные контакты и цитоскелет.

Дисфункция желудочно-кишечного барьера делает возможным перемещение содержимого кишечника в кровоток, включая, например, патогены и токсины, которые могут отрицательно влиять на здоровье животного и вызывать заболевание. Воспаление и/или повреждение эпителиальных клеток также может снижать способность животного усваивать питательные вещества. Следовательно, животные с нарушенным желудочно-кишечным барьером демонстрируют нарушение питания и ухудшение здоровья, что приводит к снижению привеса, потере массы тела, снижению эффективности питания, снижению производства мяса, увеличению коэффициента конверсии корма, снижению качества мяса и более высокой смертности.

A. Способы предотвращения дисфункции желудочно-кишечного барьера.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, включают способы предотвращения дисфункции желудочно-кишечного барьера у животного. В некоторых вариантах осуществления дисфункция желудочно-кишечного барьера представляет собой увеличение проницаемости желудочно-кишечного барьера по сравнению со здоровым состоянием, что делает возможным перемещение содержимого кишечника, включая, например, частично переваренной пищи, патогенов и токсинов, в кровоток. В некоторых вариантах осуществления дисфункция желудочно-кишечного барьера представляет собой повышенную проницаемость желудочно-кишечного барьера. Гиперпроницаемость также известна в данной области техники как "негерметичный кишечник". Как описано выше, негерметичный кишечник может позволить токсинам, бактериям и частицам пищи проникать через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта и попадать в кровоток организма. Негерметичный кишечник может указывать на острое или хроническое заболевание. Негерметичный кишечник может привести к инфекции, сепсису или повреждению слизистой оболочки кишечника.

Симптомы повышенной кишечной проницаемости могут включать снижение синтеза слизи, снижение синтеза муцина, снижение секреции слизи, снижение секреции муцина, снижение абсорбции питательных веществ, усиление воспаления, снижение устойчивости к инфекции, снижение пролиферации эпителия кишечника, снижение созревания эпителиальных клеток кишечника, нарушение питания, снижение привеса, повышенный коэффициент конверсии корма, снижение эффективности питания, повышенную смертность, но не ограничиваются этим. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, предотвращают один или несколько симптомов дисфункции желудочно-кишечного барьера, таких как симптом повышенной проницаемости кишечника.

В некоторых вариантах осуществления изобретения дисфункция предотвращается за счет снижения проницаемости желудочно-кишечного барьера у животного. В некоторых вариантах осуществления проницаемость желудочно-кишечного барьера уменьшается примерно на 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50% по сравнению с проницаемостью желудочно-кишечного барьера указанного животного до применения указанного синтетического олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления проницаемость желудочно-кишечного барьера примерно на 0,5-40%, 0,5-30%, 0,5-20%, 0,5-10%, 0,5-5%, 0,5-4%, 0,5-3%, 0,5-3%, 0,5-2%, 0,5-1%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-10%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 1-2%, 5-40%, 5-30%, 5-20%, 5-10%, 10-40%, 10-30% или на 10-20% меньше, чем проницаемость желудочно-кишечного барьера указанного животного до применения указанного синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления изобретения дисфункцию предотвращают за счет снижения проницаемости желудочно-кишечного барьера у животного. В некоторых вариантах осуществления проницаемость желудочно-кишечного барьера примерно на 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50% меньше, чем проницаемость желудочно-кишечного барьера животного, у которого применяли питательную композицию, не содержащую синтетического олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления проницаемость желудочно-кишечного барьера примерно на 0,5-40%, 0,5-30%, 0,5-20%, 0,5-10%, 0,5-5%, 0,5-4%, 0,5-3%, 0,5-2%, 0,5-1%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-10%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 1-2%, 5-40%, 5-30%, 5-20%, 5-10%, 10-40%, 10-30% или 10-20% меньше, чем проницаемость желудочно-кишечного барьера животного, у которого применяли питательную композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

B. Способы лечения дисфункции желудочно-кишечного барьера.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, включают способы лечения дисфункции желудочно-кишечного барьера у животного. В некоторых вариантах осуществления дисфункция желудочно-кишечного барьера представляет собой увеличение проницаемости желудочно-кишечного барьера, по сравнению со здоровым состоянием, позволяющей содержимому кишечника, включая, например, частично переваренную пищу, патогены и токсины, перемещаться в кровоток.

В некоторых вариантах осуществления изобретения дисфункция желудочно-кишечного барьера представляет собой повышенную проницаемость желудочно-кишечного барьера. Гиперпроницаемость также известна в данной области техники как "негерметичный кишечник". Как описано выше, негерметичный кишечник позволяет токсинам, бактериям и частицам пищи проникать через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта и попадать в кровоток организма. Негерметичный кишечник может указывать на острое или хроническое заболевание. Негерметичный кишечник может привести к инфекции, сепсису или повреждению слизистой оболочки кишечника.

Симптомы повышенной кишечной проницаемости могут включать, помимо прочего, снижение синтеза слизи, снижение синтеза муцина, снижение секреции слизи, снижение секреции муцина, снижение абсорбции питательных веществ, усиление воспаления, снижение устойчивости к инфекции, уменьшение пролиферации эпителиальных клеток кишечника, снижение созревания эпителиальных клеток кишечника, нарушение питания, снижение привеса, увеличение коэффициента конверсии корма, снижение эффективности питания, повышенную смертность. В некоторых вариантах осуществления улучшается один или несколько симптомов повышенной кишечной проницаемости.

В некоторых вариантах осуществления изобретения дисфункция предотвращается за счет снижения проницаемости желудочно-кишечного барьера у животного. В некоторых вариантах осуществления про-

ницаемость желудочно-кишечного барьера снижается примерно на 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50%, по сравнению с проницаемостью желудочно-кишечного барьера указанного животного до применения указанного синтетического олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления проницаемость желудочно-кишечного барьера примерно на 0,5-40%, 0,5-30%, 0,5-20%, 0,5-10%, 0,5-5%, 0,5-4%, 0,5-3%, 0,5-2%, 0,5-1%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-10%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 1-2%, 5-40%, 5-30%, 5-20%, 5-10%, 10-40%, 10-30% или 10-20% меньше, чем проницаемость желудочно-кишечного барьера указанного животного до применения указанного синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления изобретения дисфункцию лечат снижением проницаемости желудочно-кишечного барьера у животного. В некоторых вариантах осуществления проницаемость желудочно-кишечного барьера примерно на 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% меньше, чем проницаемость желудочно-кишечный барьер животного до применения питательной композиции, не содержащей синтетического олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления проницаемость желудочно-кишечного барьера примерно на 0,5-40%, 0,5-30%, 0,5-20%, 0,5-10%, 0,5-5%, 0,5-1%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-10%, 1-5%, 1-2%, 5-40%, 5-30%, 5-20%, 5-10%, 10-40%, 10-30% или на 10-20% меньше, чем проницаемость желудочно-кишечного барьера животного до применения питательной композиции, не содержащей синтетического олигосахаридного препарата.

С. Способы определения проницаемости желудочно-кишечного барьера и абсорбции питательных веществ.

Проницаемость желудочно-кишечного барьера может быть продемонстрирована способами, известными в данной области техники, такими как тест на лактулозу/маннитол, где животному дают раствор, содержащий маннитол и лактулозу, и мочу собирают в течение шести часов и исследуют. Лактулоза (дисахарид) и маннитол (моносахарид) являются двумя водорастворимыми неметаболизируемыми сахарными молекулами. Маннитол легко всасывается, пассивно проникая в клетки, в то время как лактулоза с большей молекулярной массой и размером лишь частично абсорбируется здоровым желудочно-кишечным барьером. Если уровни маннитола и лактулозы в собранном образце мочи высоки, это указывает на слишком высокую проницаемость желудочно-кишечного тракта. Низкий уровень обеих молекул указывает на нарушение абсорбции питательных веществ. Высокий уровень маннитола и низкий уровень лактулозы указывают на то, что у животного нормальная функция желудочно-кишечного барьера.

Проницаемость желудочно-кишечного барьера также можно оценить с помощью анализа стула после пищеварения, который включает тестирование фекального материала на пищеварительную функцию, степень, в которой липиды, белки, углеводы и другие питательные вещества абсорбируются в тонком кишечнике и толстой кишке, а также присутствие Candida или других бактериальных инфекций, дисбактериоз (дисбаланс кишечных бактерий), паразитарные инфекции и другие показатели дисфункции пищеварения. Улучшение функции кишечника, вызванное применением синтетических олигосахаридных препаратов, описанных в настоящем изобретении, также может быть измерено по уменьшению диареи, уменьшению одного или нескольких симптомов повышенной кишечной проницаемости, увеличению твердого стула, увеличению продукции 5-гидрокситриптофана и 5-гидрокситриптамина, и 2-метил-5-гидрокситриптамина и других предшественников нейромедиаторов, которые могут быть произведены популяциями бактерий (предшественники серотонина). Оценка проницаемости желудочно-кишечного барьера также может быть выполнена с использованием флуоресцентных индикаторов (например, как описано в Droshow et al., "Measurement of gut permeability using fluorescent tracer agent technology", Scientific Reports, 7:108888 (2017)). Другие способы включают, например, способы, раскрытые в Wang et al., "Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease", J Immunol Methods, 421:44-53 (2015); Galipeau et al., Neurogastroenterology and Motility, 28:7 (2016); и описаны в настоящем изобретении в примерах. Проницаемость желудочно-кишечного барьера также можно оценить с использованием множества неперевариваемых сахаров, меченых декстранов и радиоизотопов, известных в данной области техники.

Проницаемость желудочно-кишечного барьера также можно оценить с помощью гистологического анализа образца ткани или образца клеток указанного желудочно-кишечного барьера. В некоторых вариантах осуществления в таком анализе используют один или несколько красителей или меток, которые известны в данной области техники. К ним относятся, например, окрашивание гематоксилином и эозином, иммунофлуоресцентное окрашивание, использование иммунофлуоресцентных антител или других нацеленных агентов. Способы микроскопии включают все методы, известные в данной области техники, например, световую микроскопию, конфокальную микроскопию, электронную микроскопию и т.д. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, включают оценку морфологии слизистой оболочки указанного желудочно-кишечного барьера. В некоторых вариантах осуществления указанная оценка включает определение длины ворсинок, длины крипт, уровня инфильтрации воспалительными клетками, или любую их комбинацию.

Способы, аналогичные описанным выше, можно использовать для оценки способности желудочно-кишечного тракта абсорбировать питательные вещества. Например, уровень определенных макро- или микроэлементов можно оценить в образце стула, например, жира. Образцы пота можно анализировать,

чтобы определить уровень ферментов, необходимых для правильного распределения питательных веществ. Для определения количества водорода в воздухе, выдыхаемым животным после приема раствора молочного сахара (например, лактозы), можно провести водородный дыхательный тест с лактозой. Можно взять биоптат желудочно-кишечного барьера, чтобы оценить абсорбцию питательных веществ. Многочисленные тесты для измерения способности абсорбции питательных веществ желудочно-кишечным трактом известны в данной области техники и включены в настоящую заявку.

В некоторых вариантах осуществления уровень по меньшей мере одного (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) транспортеров питательных веществ, экспрессируемых желудочно-кишечным барьером, анализируют для определения способности желудочно-кишечного барьера к абсорбции питательных веществ в целом или конкретного макро- или микронутриента. Способы такого анализа известны в данной области техники и включены в настоящую заявку в качестве ссылки. Транспортеры включают эксперссируемые белки SI (сахарозо-изомальтазу),

SLC5A10,

SLC34A1, SLC2A2, SLC34A2, SLC23A1, SLC23A2, SLC5A8, SLC16A3, SLC4, SLC4A9, SLC4A2, SLC4A3, NPC1L1, C6orf58, DDC, MCT1, MCT4, NaS1, DTDST, PAT1, DRA, CLD, SAT1, SUT2, SGLT1, GLUT2, B0AT1, ATB0+, SIT1, TAUT, EAAC1, ASCT2, SN1, SN2, PEPT1, SNAT2, GLYT1, y+LAT1, y+LAT2, CD36, LFABP, NPC1L1, ABCG5, ABCG8, SVCT1, SVCT2, SMVT, GIF, AMN, CUBL, MRP1, FOLT, PCFT, FOLR1, OAT10, RFVT1, RFVT2, THTR1, THTR2, VDR, DCYTB, DMT1, HCP1, FPN1, HEPH, HAMP, ZIP4, ZIP11, ZIP8, ZIP14A, ZIP14B, ZnT1, ZnT2, CTR1, SLC3A1, SLC1A4, ALPI, C17orf78, MUC17, DEFA5, RBP2, DEFA6, MLN, MEP1B, LCT, TM4SF20 или FABP6,

но не ограничиваются ими.

Проницаемость желудочно-кишечного барьера можно оценить с использованием множества образцов, например, как описано в настоящем изобретении. Например, указанные образцы включают образец ткани желудочно-кишечного барьера, биоптат желудочно-кишечного барьера, образец клеток желудочно-кишечного барьера, образец крови, образец сыворотки, образец мочи, образец кала, образец слепой кишки (например, ее содержимое), образец пота или образец слюны, но не ограничиваются ими.

Желудочно-кишечные барьеры включают любой барьер желудочно-кишечного тракта, например, подвздошную кишку, слепую кишку, тонкую кишку, толстую кишку, желудок, двенадцатиперстную кишку, тощую кишку.

D. Пролиферация бокаловидных клеток и продукция слизи.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, включают увеличение пролиферации бокаловидных клеток в желудочно-кишечном тракте животного. Бокаловидные клетки представляют собой простые столбчатые эпителиальные клетки, которые составляют часть эпителиальной выстилки желудочно-кишечного барьера. Бокаловидные клетки выделяют слизь, которая содержит большие гликопротеины, называемые муцинами. Слизистый слой желудочно-кишечного барьера защищает эпителиальные клетки и предотвращает повреждение эпителиальных клеток микроорганизмами, токсинами и т.д.

Стандартные анализы, известные специалисту в данной области техники, можно использовать для оценки пролиферации бокаловидных клеток. Например, можно использовать анализы in vitro, как описано в примерах в настоящем изобретении. Для оценки пролиферации бокаловидных клеток также можно использовать различные молекулярные или биохимические маркеры, включая экспрессию генов или экспрессию белков, характерных для бокаловидных клеток, например, муцинов, но не ограничиваясь этим.

Определенные гены муцинов, например, MUC5B, экспрессируются в желудочно-кишечном тракте и содержат генный продукт, широко представленный в слизи. Следовательно, экспрессия генов муцина является подходящим маркером для определения продукции слизи.

Экспрессию генов муцина можно оценить с помощью обычных технологий, таких как нозерн-блоттинг, полимеразная цепная реакция (ПЦР), исследование промотора гена муцина или анализ in situ. Альтернативно, белки муцина оценивают с помощью общепринятой методологии, такой как вестерн-блоттинг, ИФА, иммунохимия и т.п., с использованием обнаруживаемых меченных антител. Морфологические критерии также можно использовать для определения присутствия или отсутствия бокаловидных клеток в культуре; такие как выявление муцинов с использованием окрашивания альциановым синим/PAS (Lou et al. (1998) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157: 1927-1934). Антитела к муцинам можно исследовать с помощью анализов ИФА.

Анализы in vivo также можно использовать для оценки пролиферации бокаловидных клеток у животных. Ткань желудочно-кишечного тракта животного может быть оценена на предмет распространенности бокаловидных клеток. Образцы ткани желудочно-кишечного тракта животных также можно оце-

нивать на те же молекулярные и биохимические маркеры, описанные выше для анализов in vitro.

E. Восприимчивость к инфекции.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, включают снижение восприимчивости животного к инфекции. Способы также включают предотвращение инфекции у животного или популяции животных. Как описано выше, дисфункция желудочно-кишечного барьера, приводящая к увеличению проницаемости желудочно-кишечного барьера, делает возможным перемещение патогенных микроорганизмов из внутрипросветного пространства в кровоток. Описанные здесь способы предотвращают инфицирование животного за счет снижения проницаемости желудочно-кишечного барьера. Описанные здесь способы также снижают восприимчивость животного к инфекции за счет уменьшения проницаемости желудочно-кишечного барьера. Инфекция может быть результатом любого патогенного микроорганизма, присутствующего в просвете желудочно-кишечного тракта. Патоген может попасть в желудочно-кишечный тракт через зараженную пищу. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой микроорганизм. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой бактерию, вирус, паразит или грибок. В некоторых вариантах осуществления патоген относится к типу Proteobacteria. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой бактерию и классифицируется как представитель родов *Helicobacter, Escherichia, Salmonella, Vibrio* или *Yersinia*.

В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой бактерию и классифицируется как представитель родов

Treponema, Streptococcus, Staphylococcus, Shigella, Rickettsia, Orientia, Pseudomonas, Neisseria, Mycoplasma, Mycobacterium, Listeria, Leptospira, Legionella, Klebsiella, Haemophilus, Francisella, Ehrlichia, Enterococcus, Coxiella, Corynebacterium, Clostridium, Chlamydia, Chlamydophila, Campylobacter, Burkholderia, Brucella, Borrelia, Bordetella, Bifidobacterium и *Bacillus*.

Бактериальные виды включают

Helicobacter pylori, Proteobacteria johnsonii, Escherichia coli, Campylobacter jejuni и *Lactobacillus crispatus*,

но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой

Aeromonas hydrophila, Campylobacter fetus, Plesiomonas shigelloides, Bacillus cereus, Campylobacter jejuni, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, enteroaggregative Escherichia coli, enterohemorrhagic Escherichia coli, enteroinvasive Escherichia coli, enterotoxigenic Escherichia coli, Helicobacter pylori, Klebsiellia pneumonia, Lysteria monocytogenes, Plesiomonas shigelloides, Salmonella spp., Salmonella typhi, Salmonella paratyphi, Shigella spp., Staphylococcus spp., Staphylococcus aureus, vancomycin-resistant enterococcus spp., Vibrio spp., Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus и *Yersinia enterocolitica*.

В некоторых вариантах осуществления патоген является устойчивым к одному или нескольким лекарственным средствам. Инфицирование животного одним или несколькими патогенами можно оценить стандартными методами, известными специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления патоген является паразитом. В некоторых вариантах осуществления указанный паразит является паразитом Eimeria. В некоторых вариантах осуществления указанный паразит представляет собой

Eimeria acervuline, Eimeria maxima, Eimeria mitis, Eimeria tenella, Toxoplasma gondii, Hammondia spp. Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium muris, Cryptosporidium hominis, Isospora canis, Isospora ohioensis, Isospora burrosi, Isospora felis.

В некоторых вариантах осуществления указанный патоген представляет собой простейшие кокцидии. В некоторых вариантах осуществления указанные простейшие кокцидии представляют собой

Eimeria acervuline, Eimeria maxima, Eimeria mitis, Eimeria tenella, Toxoplasma gondii, Hammondia spp. Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium muris, Cryptosporidium hominis, Isospora canis, Isospora ohioensis, Isospora burrosi или *Isospora felis*.

В некоторых вариантах осуществления повышен уровень по меньшей мере одного провоспалительного цитокина или хемокина в желудочно-кишечном тракте животного. Примеры цитокинов и хемокинов включают факторы некроза опухоли (TNF), такие как TNF-α и TNF-β, молекулы суперсемейства TNF, такие как FasL, CD27L, CD30L, CD40L, Ox40L, 4-1BBL, TRAIL, TWEAK и Apo3L, интерлейкин-1 (IL-1), включая IL-1α и IL-1β, IL-2, интерферон-γ (IFN-γ), IFN-α/β, IL-6, IL-8, IL- 12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, LIF, CCL5, GROα, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, макрофагальный колониестимулирующий фактор (MCSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), CXCL2, CCL2, лимфотактин, фракталкин или GRO/KC, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления уровень по меньшей мере одного противовоспалительного цитокина или хемокина в желудочно-кишечном тракте животного снижается. Примеры противовоспалительных цитокинов и хемокинов включают антагонист рецептора интерлейкина (IL)-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 и TGFβ, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления уровень по меньшей мере одной иммунной клетки повышен в желудочно-кишечном тракте животного. В других вариантах осуществления уровень по меньшей мере одной иммунной клетки повышен в лимфатической системе животного. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой клетку врожденного иммунитета. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой адаптивную иммунную клетку. Примеры иммунных клеток включают Т-клетки, В-клетки, естественные клетки-киллеры, макрофаги, дендритные клетки, гранулоциты (включая, например, базофилы, эозинофилы и нейтрофилы), тучные клетки и моноциты, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой фагоцитарную клетку. Фагоцитарные иммунные клетки включают нейтрофилы, моноциты, макрофаги, тучные клетки и дендритные клетки, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления повышается фагоцитарная активность иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцировка иммунных клеток происходит в пейеровских бляшках.

F. Образцы желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, включают детекцию свойства (включая, например, уровень слизи, уровень иммунной клетки, уровень цитокина, уровень хемокина и т.д.) в желудочно-кишечном тракте животного. В некоторых вариантах осуществления это свойство выявляют или количественно оценивают в образце желудочно-кишечного тракта животного. Образцы желудочно-кишечного тракта могут быть получены от животного в любой стандартной форме, которая отражает метаболическое содержание желудочно-кишечного тракта животного. Образцы желудочно-кишечного тракта включают образцы тканей желудочно-кишечного тракта, полученные, например, с помощью эндоскопической биопсии. Ткани желудочно-кишечного тракта включают, например, ткань полости рта, пищевода, желудка, кишечника, подвздошной, слепой, толстой или прямой кишки. Также берут образцы кала, слюны, мочи и желудочно-кишечной асцитической жидкости. Способы получения образцов желудочно-кишечного тракта являются стандартными и известны специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления указанный образец представляет собой образец крови или сыворотки.

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой единственный образец от одного животного. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой комбинацию нескольких образцов от одного животного. В некоторых вариантах осуществления клетки или белки очищают из образца перед анализом. В некоторых вариантах осуществления очищают клетки или белки из одного образца. В некоторых вариантах осуществления клетки или белки из нескольких образцов от одного животного очищают и затем объединяют перед анализом.

VII. Способы повышения продуктивности животных.

A. Коэффициент конверсии корма.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, включают снижение коэффициента конверсии корма животного. В некоторых вариантах осуществления животное, у которого применяют синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, имеет более низкий коэффициент конверсии корма по сравнению с животным, получавшим рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат. Используемый здесь термин "коэффициент конверсии корма (FCR)" относится к отношению затраченной массы корма (например, потребляемой животным) к животному продукту, при этом животный продукт является целевым продуктом животного происхождения. Например, животный продукт для молочных животных - это молоко, а животный про-

дукт у животных, выращиваемых на мясо - это масса тела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животное выращивают на мясо, и целевым животным продуктом является масса тела. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления FCR относится к отношению массы потребленного корма к конечной массе тела животного до переработки. В некоторых вариантах осуществления FCR относится к отношению массы потребленного корма к конечному привесу животного до переработки. Следует понимать, что FCR может быть измерен для животного или популяции животных в разные периоды времени. Например, в некоторых вариантах осуществления FCR представляет собой FCR на протяжении всей жизни животного. В других вариантах осуществления FCR представляет собой суточный FCR, или недельный FCR, или совокупный FCR, измеренный до определенного момента времени (например, определенного дня).

Специалист в данной области техники поймет, что целевой минимальный FCR (оптимальный FCR) может быть различным для разных типов животных и может быть различным для разных пород одного типа животных (например, разных пород цыплят-бройлеров, или разных пород свиней). Минимальный FCR целевой производительности также может быть различным в зависимости от возраста животного (например, цыплят или свиней в первом периоде откорма по сравнению со вторым периодом откорма) или пола животного. Должно быть ясно, что оптимальный FCR может отличаться в зависимости от любой комбинации этих факторов.

Минимальный плановый показатель обычно относится к самой низкой эффективности питания, наблюдаемой для данного животного и породы при идеальных условиях выращивания, идеальном здоровье животных и идеальном диетическом питании. Специалистам в данной области техники хорошо известно, что в обычных условиях выращивания животное может не достичь минимального планового FCR. Животное может не достичь своего минимального планового FCR из-за различных факторов, связанных со здоровьем, питанием, окружающей средой и/или сообществом. Животное может не достичь своего минимального планового FCR при выращивании в сложной среде, которая может включать, например, патогенный стресс окружающей среды, чрезмерную температуру окружающей среды (тепловой стресс), чрезмерную влажность окружающей среды, скученность или другие эффекты социального взаимодействия, такие как трудности с доступом к корму или питьевой воде. В некоторых вариантах осуществления животное может не достичь своего минимального планового FCR из-за болезни или патогенного стресса окружающей среды. В других вариантах осуществления животное может не достичь своего минимального планового FCR из-за чрезмерной температуры окружающей среды (тепловой стресс) или чрезмерной влажности окружающей среды. В других вариантах осуществления животное может не достичь своего минимального планового FCR из-за скученности или других эффектов социального взаимодействия, таких как затруднение доступа к корму или питьевой воде.

В некоторых вариантах осуществления животное, получавшее рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат, описанный в настоящем изобретении, имеет FCR, который по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% или 10% выше, чем минимальный плановый FCR. В некоторых вариантах осуществления животное, получавшее рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат, описанный в настоящем изобретении, имеет FCR, который на 1-10% выше минимального планового показателя, на 2-10% выше минимального планового показателя или 5-10% выше минимального планового показателя.

В некоторых вариантах осуществления, животное, получившее питательную композицию, содержащую синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, имеет FCR, который ближе к минимальному плановому показателю, по сравнению с животным, получавшим рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат. В конкретных вариантах осуществления животное, получавшее синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, имеет FCR, который на 0-10% выше минимального планового показателя, на 0-5% выше минимального планового показателя или на 0-2% выше минимального планового показателя.

В некоторых вариантах осуществления животное, которому давали синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, имеет более низкий коэффициент конверсии корма по сравнению с животным, получавшим рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат. Например, в некоторых вариантах осуществления животное, получавшее рацион, включающий синтетический олигосахаридный препарат, потребляет меньше корма, но дает такой же животный продукт, как животное, получавшее рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат. В других вариантах осуществления животное, получавшее рацион, включающий синтетический олигосахаридный препарат, потребляет такое же количество корма, но дает более высокий животный продукт по сравнению с животным, получавшим рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат. В других вариантах осуществления животное, получавшее рацион, включающий синтетический олигосахаридный препарат, потребляет меньше пищи и дает более высокий животный продукт, по сравнению с животным, получавшим рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления FCR животного, получавшего синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, снижается по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 4-10%, на 1-8%, на 4-8%, на 1-6% или на 4-6% по сравнению с животным, получавшим рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу. В некоторых вариантах осуществления FCR домашней птицы снижается в возрасте от 0 до 14 дней, от 15 до 28 дней, от 29 до 35 дней, более 35 дней, более 42 дней, более 6 недель, более 6,5 недель, от 0 до 35 дней, от 0 до 42 дней, от 0 до 6 недель, от 0 до 6,5 недель, от 15 до 35 дней, от 36 до 42 дней, от 15 до 39 дней или от 40 до 46 дней.

В одном варианте осуществления FCR за 35 дней для домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, снижается на 4-6% по сравнению с домашней птицей, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат. Например, в определенном варианте осуществления FCR за 35 дней для домашней птицы, получавшей питательную композицию, содержащую синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, составляет 1,53, FCR за 35 дней для домашней птицы, получавшей рацион без синтетического олигосахаридного препарата, составляет 1,61, и FCR птицы, получавшей питательную композицию, содержащую олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, снижен примерно на 5% по сравнению с птицей, получавшей рацион без синтетического олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления FCR за 42 дня, более 6 недель или более 6,5 недель для домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, снижается на 4-6% по сравнению с домашней птицей, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления популяция животных, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательный препарат, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, имеет более низкий FCR по сравнению с популяцией животных, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат, где FCR скорректирован с учетом смертности в популяции животных.

В некоторых вариантах осуществления животное, получавшее синтетический олигосахаридный препарат, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет более низкий FCR, чем животное, получавшее рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат, но включающий один или несколько антибиотиков, один или несколько ионофоров, растворимое кукурузное волокно, модифицированный пшеничный крахмал или дрожжевой маннан, или любые их комбинации.

Специалистам в данной области техники известно, что при определении FCR его можно скорректировать с учетом смертности, чтобы уменьшить ошибки из-за небольшого количества статистических данных. Способы корректировки FCR с учетом смертности хорошо известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления, домашняя птица представляет собой отдельную домашнюю птицу, тогда как в других вариантах осуществления домашняя птица является популяцией домашних птиц.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, а кормовая композиция для животных представляет собой корм для домашней птицы, где синтетический олигосахаридный препарат, питательная композиция для домашней птицы, премикс корма для домашней птицы или кормовая композиция для домашней птицы снижает коэффициент конверсии корма (FCR) на примерно на 10%, или примерно на 5%, или на 1-10%, на 2-10%, на 3-10%, на 4-10%, на 5-10%, на 2-5%, на 2-6%, на 2-7%, на 2-8%, на 2-9% или на 1-5% при скармливании домашней птице, по сравнению с домашней птицей, получавшей кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления домашняя птица страдает заболеванием или расстройством, или выращивается в неблагоприятной среде, где синтетический олигосахаридный препарат, питательная композиция для домашней птицы, премикс корма для домашней птицы или кормовая композиция для домашней птицы снижают коэффициент конверсии корма (FCR) примерно на 30%, примерно на 25%, примерно на 20%, примерно на 15%, примерно на 10% или примерно на 5%, или от 1% до 30%, от 5% до 30%, от 10% до 30%, от 5% до 20%, от 10% до 20%, от 1% до 20%, от 1% до 15%, от 1% до 10%, от 2% до 10%, от 3% до 10%, от 4% до 10%, от 5% до 10%, от 2% до 5%, от 2% до 6%, от 2% до 7%, от 2% до 8%, от 2% до 9% или от 1% до 5% при скармливании домашней птице по сравнению с домашней птицей, получавшей кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления, животное представляет собой свинью, а кормовая композиция для животных представляет собой корм для свиней, где синтетический олигосахаридный препарат, питательная композиция для свиней, премикс корма для свиней или кормовая композиция для свиней

снижают коэффициент конверсии корма (FCR) примерно на 15%, примерно на 10% или примерно на 5%, или от 1% до 15%, от 2% до 15%, от 3% до 15%, от 4% до 15%, от 5% до 15%, от 10% до 15%, от 1% до 10%, от 2% до 10%, от 3% до 10%, от 4% до 10%, от 5% до 10%, от 2% до 5%, от 2% до 6%, от 2% до 7%, от 2% до 8%, от 2% до 9% или от 1% до 5% при скармливании свиньям, по сравнению со свиньями, получавшими кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления свинья страдает заболеванием или нарушением, или выращивается в неблагоприятной среде, где синтетический олигосахаридный препарат, питательная композиция для свиней, премикс корма для свиней или кормовая композиция для свиней снижают коэффициент конверсии корма (FCR) примерно на 40%, примерно на 35%, примерно на 30%, примерно на 25%, примерно на 20%, примерно на 15%, примерно на 10% или примерно на 5%, или от 1% до 40%, от 5% до 40%, от 10% до 40%, от 15% до 40%, от 20% до 40%, от 25% до 40%, от 30% до 40%, от 1% до 30%, от 5% до 30%, от 10% до 30%, от 5% до 20%, от 10% до 20%, от 1% до 20%, от 1% до 15%, от 1% до 10%, от 2% до 10%, от 3% до 10%, от 4% до 10%, от 5% до 10%, от 2% до 5%, от 2% до 6%, от 2% до 7%, от 2% до 8%, от 2% до 9% или от 1% до 5% при скармливании свиньям, по сравнению со свиньями, получавшими кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

B. Масса тела.

В некоторых вариантах осуществления животное в соответствии с изобретением, которое получает синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, описанные в настоящем изобретении, может проявлять увеличение массы тела по сравнению с контрольным животным, не получавшим олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления как животное в соответствии с изобретением, так и контрольное животное потребляют одинаковое количество корма на основе массы тела, но животное в соответствии с изобретением, получавшее синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, проявляет увеличение привеса по сравнению с контрольным животным, получавшим рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

Привес у животного можно определить любыми подходящими способами, известными в данной области техники. Например, чтобы определить привес животного, которое подвергается режиму кормления синтетическим олигосахаридным препаратом, питательной композицией, премиксом корма для животных или кормовой композицией для животных, специалист в данной области техники может измерить массу тела животного перед режимом кормления, измерить массу животного после того, как животное получит синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, и определить разницу между этими двумя измерениями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения привес может быть среднесуточной прибавкой в весе (также называемой среднесуточным привесом (ADG)), средненедельным привесом (AWG) или итоговым привесом (BWG).

C. Среднесуточный привес.

В некоторых вариантах осуществления предоставление животному синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции, премикса для корма для животных или кормовой композиции для животных приводит к увеличению среднесуточного привеса по сравнению с животным, получавшим корм без синтетического олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления обеспечение популяции животных синтетическим олигосахаридным препаратом, питательной композицией, премиксом корма для животных или кормовой композицией приводит к увеличению среднесуточного привеса, по сравнению с группы животных, получавшей корм без синтетического олигосахаридного препарата.

В одном варианте осуществления среднесуточный привес животного представляет собой вес, набираемый каждый день отдельным животным, усредненный за заданный период времени. В некоторых вариантах осуществления среднесуточный привес для популяции животных представляет собой среднесуточный привес для каждого отдельного животного, усредненный по популяции; где среднесуточный привес - это вес, набираемый каждый день отдельным животным, усредненный за заданный период времени. В других вариантах осуществления среднесуточный привес для популяции животных представляет собой общий вес, набираемый популяцией каждый день, разделенный на количество отдельных животных в популяции, усредненный за данный период времени. Следует понимать, что суточный привес или среднесуточный привес можно дополнительно усреднить, например, для обеспечения среднесуточного привеса среди популяций животных.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, и домашняя птица, получившая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет среднесуточный привес по меньшей мере 20 граммов в день, по меньшей мере 30 граммов в день, по меньшей мере 40 граммов в день, по меньшей мере 50 граммов в день, по меньшей мере 60 граммов в день, по меньшей мере 70 граммов в день, по меньшей мере 80 граммов в день, по меньшей мере 90 граммов в день, от 20 до 100 граммов в день, от 20 до 80 граммов в день, от 30 до 50 граммов в день, от 40 до 60 граммов в день, от 50 до

70 граммов в день или от 70 до 90 граммов в день. В одном варианте осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, и домашняя птица, получившая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет среднесуточный привес по меньшей мере 50 граммов в день. В некоторых вариантах осуществления домашняя птица, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет среднесуточный привес по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8%, или на 3-5% больше, чем среднесуточный привес домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, и домашняя птица находится в возрасте от 0 до 14 дней, и среднесуточный привес составляет по меньшей мере 30 г, по меньшей мере 40 г или по меньшей мере 50 г/день.

В других вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, возраст домашней птицы составляет от 14 до 28 дней, и среднесуточный привес составляет по меньшей мере 70 г, по меньшей мере 80 г или по меньшей мере 90 грамм на день.

В еще одних вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, домашняя птица находится в возрасте от 29 до 35 дней, и среднесуточный привес составляет по меньшей мере 50 г, по меньшей мере 60 г или по меньшей мере 70 г/день.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с вышеизложенным, животное представляет собой домашнюю птицу, а кормовая композиция для животных представляет собой корм для домашней птицы, где синтетический олигосахаридный препарат, питательная композиция для домашней птицы, премикс корма для домашней птицы или кормовая композиция для домашней птицы увеличивает среднесуточный прирост птицы примерно до 10%, или примерно 5%, или от 1% до 10%, от 2% до 10%, от 3% до 10%, от 4% до 10%, от 5% до 10%, от 2% до 5%, от 2% до 6%, от 2% до 7%, от 2% до 8%, от 2% до 9% или от 1% до 5% при скармливании домашней птице, по сравнению с домашней птицей, получавшей кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления домашняя птица страдает заболеванием или нарушением или выращивается в неблагоприятной среде, где синтетический олигосахаридный препарат, питательная композиция для домашней птицы, премикс корма для домашней птицы или кормовая композиция для домашней птицы увеличивают среднесуточный привес домашней птицы примерно на 30%, примерно на 25%, примерно на 20%, примерно на 15%, примерно на 10% или примерно на 5%, или от 1% до 30%, от 5% до 30%, от 10% до 30%, от 5% до 20%, от 10% до 20%, от 1% до 20%, от 1% до 15%, от 1% до 10%, от 2% до 10%, от 3% до 10%, от 4% до 10%, от 5% до 10%, от 2% до 5%, от 2% до 6%, от 2% до 7%, от 2% до 8%, от 2% до 9%, или от 1% до 5% при скармливании домашней птице, по сравнению с домашней птицей, получавшей кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с вышеизложенным, животное представляет собой свинью, а кормовая композиция для животных представляет собой корм для свиней, причем синтетический олигосахаридный препарат, питательный препарат для свиней, премикс корма для свиней или кормовая композиция для свиней увеличивает среднесуточный привес свиней примерно на 15%, примерно на 10% или примерно на 5%, или от 1% до 15%, от 2% до 15%, от 3% до 15%, от 4% до 15%, от 5% до 15%, от 10% до 15%, от 1% до 10%, от 2% до 10%, от 3% до 10%, от 4% до 10%, от 5% до 10%, от 2% до 5%, от 2% до 6%, от 2% до 7%, от 2% до 8%, от 2% до 9% или от 1% до 5% при скармливании свиньям по сравнению со свиньями, получавшими кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления свинья страдает заболеванием или расстройством, или выращивается в неблагоприятной среде, где олигосахаридный препарат, питательная композиция для свиней, премикс корма для свиней или кормовая композиция для свиней увеличивают среднесуточный прирост свиней примерно на 40%, примерно на 35%, примерно на 30%, примерно на 25%, примерно на 20%, примерно на 15%, примерно на 10% или примерно на 5%, или от 1% до 40%, от 5% до 40%, от 10% до 40%, от 15% до 40%, от 20% до 40%, от 25% до 40%, от 30% до 40%, от 1% до 30%, от 5% до 30%, от 10% до 30%, от 5% до 20%, от 10% до 20%, от 1% до 20%, от 1% до 15%, от 1% до 10%, от 2% до 10%, от 3% и 10%, от 4% до 10%, от 5% до 10%, от 2% до 5%, от 2% до 6%, от 2% до 7%, от 2% до 8%, от 2% и 9%, или от 1% до 5%, при скармливании свиньям, по сравнению со свиньями, получавшими кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой свинью, и свинья, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательный препарат для свиней, премикс корма для свиней или кормовую композицию для свиней, имеет среднесуточный привес по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, от 1 до 10%, от 2 до 8% или от 3 до 5% больше, чем среднесуточный

привес свиней, получавших рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

D. Средненедельный привес.

В некоторых вариантах осуществления предоставление животному синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции, премикса корма для животных или кормовой композиции для животных приводит к увеличению средненедельного привеса по сравнению с животным, получавшим корм без синтетического олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления предоставление популяции животных синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции, премикса корма для животных или кормовой композиции приводит к увеличению средненедельного привеса по сравнению с популяцией животных, получавшей корм без синтетического олигосахаридного препарата.

В одном из вариантов осуществления средненедельный привес животного представляет собой вес, набираемый каждую неделю отдельным животным, усредненный за данный период времени. В некоторых вариантах осуществления средненедельный привес для популяции животных представляет собой средненедельную прибавку в весе для каждого отдельного животного, усредненную по популяции; где средненедельный привес - это вес, набираемый каждую неделю отдельным животным, усредненный за данный период времени. В других вариантах осуществления средненедельный привес для популяции животных представляет собой общий вес, набираемый популяцией каждую неделю, деленный на количество отдельных животных в популяции, усредненное за данный период времени. Следует понимать, что средненедельный привес может быть дополнительно усреднен, например, для обеспечения средненедельного привеса среди популяций животных.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, и домашняя птица, получившая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет средненедельный привес по меньшей мере 100 граммов в неделю, по меньшей мере 200 граммов в неделю, по меньшей мере 300 граммов в неделю, по меньшей мере 400 граммов в неделю, по меньшей мере 500 граммов в неделю, по меньшей мере 600 граммов в неделю, по меньшей мере 700 граммов в неделю, по меньшей мере 800 граммов в неделю, от 100 до 800 граммов в неделю, от 100 до 400 граммов в неделю, от 300 до 600 граммов в неделю, от 500 до 800 граммов в неделю или от 350 до 550 граммов в неделю. В одном варианте осуществления домашняя птица, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет средненедельный привес по меньшей мере 400 граммов в неделю. В некоторых вариантах осуществления домашняя птица, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет средненедельный привес по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем средненедельный привес домашней птицы, получавшей рацион, не включающий при олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой свинью, и свинья, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию для свиней, премикс корма для свиней или кормовую композицию для свиней, имеет средненедельный привес по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем средненедельный привес свиней, получавших рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

E. Итоговый привес.

В некоторых вариантах осуществления, предоставление животному синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции, премикса для корма для животных или кормовой композиции для животных приводит к увеличению итогового привеса, по сравнению с животным, получавшим корм без синтетического олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления предоставление популяции животных синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции, премикса корма для животных или кормовой композиции приводит к увеличению среднего итогового привеса по сравнению с популяцией животных, получавшей корм без синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления обеспечение животного или популяции животных синтетическим олигосахаридным препаратом, питательной композицией, премиксом корма для животных или кормовой композицией для животных приводит к итоговому привесу или среднему итоговому привесу, который ближе к максимальным целевым показателям эффективности, чем у животных или популяции животных, получавших корм без синтетического олигосахаридного препарата. Максимальный целевой показатель эффективности обычно относится к наивысшему практическому привесу, наблюдаемому для данного типа животных и породы при идеальных условиях выращивания, идеальном здоровье животных и идеальном диетическом питании.

В одном варианте осуществления итоговый привес представляет собой количество веса, набираемо-

го отдельным животным за период времени. Например, в одном варианте осуществления общий привес представляет собой количество веса, которое набирает отдельное животное с 0-дневного возраста до последнего веса, полученного до переработки животного, или итоговый вес, взятый в день переработки животного. Например, в одном варианте осуществления общий привес с 0 по 28 день для животного представляет собой количество веса, которое набирает отдельное животное от 0-дневного возраста до 28-дневного возраста.

В другом варианте осуществления средний общий привес представляет собой количество веса, которое отдельное животное набирает за период времени, усредненное по популяции животных. Например, в одном варианте осуществления средний общий привес представляет собой количество веса, которое набирает отдельное животное в возрасте от 0 дней до итогового веса, полученного перед переработкой животного, или итогового веса, взятого в день переработки животного, животное, усредненное по популяции животных. В еще одном варианте осуществления средний общий привес представляет собой количество веса, которое популяция животных набирает за период времени, деленное на количество отдельных животных в популяции. Например, в одном варианте осуществления средний общий привес представляет собой количество веса, полученного популяцией животных от 0-дневного возраста до итогового веса, взятого перед переработкой популяции животных, или итогового веса, взятого в день переработки животного, деленное на количество отдельных животных в популяции.

Следует понимать, что значения общего привеса и среднего общего привеса могут быть дополнительно усреднены. Например, средний привес для разных популяций одного и того же типа животных может быть усреднен для получения среднего общего привеса для популяций.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, и домашняя птица, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет итоговый привес по меньшей мере 3 кг, по меньшей мере 2,5 кг, по меньшей мере 2 кг, по меньшей мере 1,5 кг, по меньшей мере 1 кг, от 1 до 3 кг или от 1,5 до 2,5 кг. В одном варианте осуществления домашняя птица, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет итоговый привес по меньшей мере 2 кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения домашняя птица, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет итоговый привес по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем итоговый привес птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления домашняя птица, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет итоговый привес по меньшей мере на 0,01 кг, по меньшей мере на 0,02 кг, по меньшей мере на 0,03 кг, по меньшей мере на 0,04 кг, по меньшей мере на 0,05 кг, по меньшей мере на 0,06 кг, по меньшей мере на 0,07 кг, по меньшей мере на 0,08 кг, по меньшей мере на 0,09 кг, по меньшей мере на 0,1 кг, на 0,01-0,1 кг, на 0,03-0,07 кг или на 0,04-0,06 кг больше, чем итоговый привес птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, и домашняя птица, получившая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет средний итоговый привес по меньшей мере 3 кг, по меньшей мере 2,5 кг, по меньшей мере 2 кг, по меньшей мере 1,5 кг, по меньшей мере 1 кг, от 1 до 3 кг или от 1,5 до 2,5 кг. В одном варианте осуществления домашняя птица, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет средний итоговый привес по меньшей мере 2 кг. В некоторых вариантах осуществления домашняя птица, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет средний итоговый привес по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8%, или на 3-5% больше, чем средний итоговый привес домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления домашняя птица, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, имеет средний итоговый привес по меньшей мере на 0,01 кг, по меньшей мере на 0,02 кг, по меньшей мере на 0,03 кг, по меньшей мере на 0,04 кг, по меньшей мере на 0,05 кг, по меньшей мере на 0,06 кг, по меньшей мере на 0,07 кг, по меньшей мере на 0,08 кг, по меньшей мере на 0,09 кг, по меньшей мере на 0,1 кг, на 0,01-0,1 кг, на 0,03-0,07 кг или на 0,04-0,06 кг больше среднего итогового привеса птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животное представляет собой домашнюю пти-

цу, а домашняя птица находится в возрасте от 0 до 14 дней, от 15 до 28 дней, от 29 до 35 дней, от 0 до 42 дней, от 0 до 6 недель или от 0 до 6,5 недель. В некоторых вариантах осуществления стартовая фаза составляет от 0 до 14 дней, фаза выращивания - от 15 до 28 дней, а завершающая фаза - от 29 до 35 дней. В других вариантах осуществления стартовая фаза составляет от 0 до 14 дней, фаза выращивания -от 15 до 35 дней, а завершающая фаза - от 36 до 42 дней. В других вариантах осуществления стартовая фаза составляет от 0 до 14 дней, фаза выращивания - от 15 до 39 дней, а завершающая фаза - от 40 до 46 дней. Следует понимать, что продолжительность стартовой фазы, фазы выращивания и завершающей фазы для домашней птицы может изменяться в зависимости от предполагаемого использования домашней птицы или продукта из птицы. Например, в некоторых вариантах осуществления продолжительность стартовой фазы, фазы выращивания и завершающей фазы может быть различной, если домашняя птица предназначена для выращивания цыплят-бройлеров, по сравнению с обработкой для куриного мяса в упаковке на лотках.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления, домашняя птица представляет собой отдельную домашнюю птицу, тогда как в других вариантах осуществления домашняя птица является популяцией домашних птиц.

В некоторых вариантах осуществления свинья, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию для свиней, премикс корма для свиней или кормовую композицию для свиней, имеет итоговый привес по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем итоговый привес свиней, получавших рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления свинья, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию для свиней, премикс корма для свиней или кормовую композицию для свиней, имеет средний итоговый привес по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8%, или на 3-5% больше, чем средний итоговый привес свиней, получавших рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления, свинья представляет собой отдельную свинью, тогда как в других вариантах осуществления свинья представляет собой популяцию свиней.

F. Выход животного продукта.

В некоторых вариантах осуществления обеспечение животного синтетическими олигосахаридными препаратами, питательной композицией, премиксом корма для животных или кормовой композицией для животных, как описано в настоящем изобретении, приводит к повышенному выходу животного продукта по сравнению с животными, получавшими корм, не включающий синтетический олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления животное, получавшее синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, дало по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, на 1-10%, на 4-10%, на 6-10% или на 2-8% больше животного продукта, по сравнению с животным, получавшим корм, который не включает синтетический олигосахаридный препарат. Например, в некоторых вариантах осуществления животный продукт представляет собой мясо животного, и животное, получавшее синтетический олигосахаридный препарат, как описано в настоящем изобретении, дает большее количество мяса по сравнению с животным, не получавшим олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления предоставление популяции животных синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции, премикса корма для животных или кормовой композиции для животных приводит к увеличению среднего выхода животного продукта, по сравнению с популяцией животных, получавшей корм, который не включает синтетический олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления средний выход животного продукта представляет собой количество животного продукта, полученного от каждого отдельного животного, усредненное по популяции животных.

В некоторых вариантах осуществления животный продукт представляет собой мясо животного (например, которое может быть продано потребителям, переработано для производства пищевого продукта или потреблено человеком). В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, а животный продукт представляет собой потрошенную тушу домашней птицы, мясо окорочков из потрошенной тушки домашней птицы, мясо грудки из потрошенной тушки домашней птицы, мясо голеней из потрошенной тушки домашней птицы, жир из потрошенной тушки домашней птицы, филе грудки из тушки птицы или филе окорочков из тушки птицы. В других вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, а животный продукт представляет собой белое мясо, филе грудки и мясо грудки. В другом варианте осуществления животное представляет собой домаш-

нюю птицу, а продукт представляет собой куриное мясо в упаковке на лотках. В еще одном варианте осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, а продукт представляет собой целую птицу без потрохов (WOG).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выход животного продукта представляет собой выход продукта от отдельного животного. В некоторых вариантах осуществления средний выход животного продукта представляет собой выход, полученный от каждого отдельного животного в популяции животных, усредненный по популяции. В еще одном варианте средний выход животного продукта представляет собой общий выход животного продукта, полученный из популяции животных, деленный на количество отдельных животных в популяции животных.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, выход мяса окорочков из потрошенной тушки птицы составляет по меньшей мере 6%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 12%, от 6 до 12%, от 8 до 12%, от 10 до 18%, от 12 до 16% или от 12 до 14% от живого веса домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления изобретения выход мяса окорочков из потрошеной тушки домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животное представляет собой домашнюю птицу, и средний выход мяса окорочков из тушки потрошеной птицы составляет по меньшей мере 6%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 12%, от 6 до 12%. от 8 до 12%, от 10 до 18%, от 12 до 16% или от 12 до 14% от живого веса домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления средний выход мяса окорочков из тушки потрошеной домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животное представляет собой домашнюю птицу, и выход мяса грудки из потрошеной тушки птицы составляет по меньшей мере 10%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 22%, по меньшей мере 24%, по меньшей мере 28%, от 10 до 18%, от 12 до 16%, от 18 до 29%, от 20 до 27% или от 20 до 25% от живого веса птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных, или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления изобретения выход мяса грудки из потрошенной тушки домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животное представляет собой домашнюю птицу, и средний выход мяса грудки из тушки потрошеной птицы составляет по меньшей мере 10%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 22%, по меньшей мере 24%, по меньшей мере 28%, от 10 до 18%, от 12 до 16%, от 18 до 29%, от 20 до 27% или от 20 до 25% от живого веса домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления средний выход мяса грудки из потрошенной тушки домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10% на 2-8% или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синте-

тический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животное представляет собой домашнюю птицу, и выход мяса голеней из потрошеной тушки птицы составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, при по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, от 5 до 14%, от 7 до 10%, от 7 до 15%, от 9 до 13% или от 9 до 11% от живого веса птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления изобретения выход мяса голеней из тушки потрошеной домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животное представляет собой домашнюю птицу, и средний выход мяса голеней из тушки потрошеной птицы составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, от 5 до 14%, от 7 до 10%, от 7 до 15%, от 9 до 13% или от 9 до 11% от живого веса домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления средний выход мяса голеней из тушки потрошеной домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10% на 2-8% или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животным является домашняя птица, и выход филе грудки из тушки птицы без костей составляет по меньшей мере 14%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 22%, при по меньшей мере 24%, от 14 до 16%, от 18 до 30%, от 20 до 28% или от 20 до 26% от живого веса для домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления изобретения выход филе грудки из тушки домашней птицы без костей, получавшей олигосахаридный препарат, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8%, или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления животным является домашняя птица, и средний выход филе грудки из тушки птицы без костей составляет по меньшей мере 14%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 22%, по меньшей мере 24%, от 14 до 16%, от 18 до 30%, от 20 до 28% или от 20 до 26% от живого веса для домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления средний выход филе грудки из тушки домашней птицы без костей, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животное представляет собой домашнюю птицу, и выход мяса окорочков из тушки птицы без костей составляет по меньшей мере 6%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 18%, от 6 до 18%, от 8 до 16%, от 12 до 21%, от 14 до 19% или от 14 до 17% от живого веса домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления изобретения выход мяса окорочков из тушки домашней птицы без костей, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%,

по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животное представляет собой домашнюю птицу, и средний выход мяса окорочков из тушки птицы без костей составляет по меньшей мере 6%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 18%, от 6 до 18%, от 8 до 16%, от 12 до 21%, от 14 до 19% или от 14 до 17% от живого веса домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления средний выход мяса окорочков из тушки домашней птицы без костей, получавшей олигосахаридный препарат, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8%, или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животным является домашняя птица, и выход жира из потрошеной тушки домашней птицы составляет по меньшей мере 0,1%, по меньшей мере 0,2%, по меньшей мере 0,3%, по меньшей мере 0,4%, по меньшей мере 0,5%, по меньшей мере 0,6%, по меньшей мере 0,7%, по меньшей мере 0,8%, по меньшей мере 0,9%, по меньшей мере 1%, по меньшей мере 1,2%, по меньшей мере 1,4%, по меньшей мере 1,6%, от 0,1 до 2%, от 0,2 до 1%, от 0,5 до 2% или от 0,3 до 0,7% от живого веса домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления выход жира из потрошеной тушки домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животное представляет собой домашнюю птицу, и средний выход жира из тушки потрошеной птицы составляет по меньшей мере 0,1%, по меньшей мере 0,2%, по меньшей мере 0,3%, по меньшей мере 0,4%, по меньшей мере 0,5%, при по меньшей мере 0,6%, по меньшей мере 0,7%, по меньшей мере 0,8%, по меньшей мере 0,9%, по меньшей мере 1%, по меньшей мере 1,2%, по меньшей мере 1,4%, по меньшей мере 1,6%, от 0,1 до 2%, от 0,2 до 1%, от 0,5 до 2% или от 0,3 до 0,7% от живого веса домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления средний выход жира из потрошеной тушки домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, при по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8% или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения животное представляет собой домашнюю птицу, и выход потрошенной тушки домашней птицы составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, от 50 до 95%, от 60 до 85% или от 65 до 75% от живого веса домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления выход потрошеной тушки домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикса для корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8%, или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, и средний выход потрошеной тушки домашней птицы составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей

мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, от 50 до 95%, от 60 до 85% или от 65 до 75% от живого веса домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления средний выход потрошенной тушки домашней птицы, получавшей синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных, как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, на 1-10%, на 2-8%, или на 3-5% больше, чем у домашней птицы, получавшей рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат.

Способы обвалки тушки домашней птицы хорошо известны специалистам в области переработки птицы. Следует понимать, что мясо, полученное из домашней птицы, можно измерять, например, как отношение массы извлеченного мяса к итоговому весу птицы до переработки. В некоторых вариантах осуществления животным является домашняя птица, и возраст домашней птицы составляет по меньшей мере 35 дней, по меньшей мере 42 дней, по меньшей мере 6 недель, по меньшей мере 6,5 недель до того, как домашняя птица будет переработана для производства потрошеной тушки домашней птицы, тушки домашней птицы без костей, белого мяса, филе грудки и мяса грудки, куриного мяса в упаковке на лотках, целой птицы без потрохов (WOG) или мяса, как описано выше.

В других вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, а животный продукт представляет собой яйца. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой свинью, а продукт из свиней представляет собой мясо свиньи (например, которое может продаваться потребителям, обрабатываться для производства пищевых продуктов или потребляться человеком). В некоторых вариантах осуществления выход свиного продукта представляет собой выход, полученный от отдельной свиньи. В некоторых вариантах осуществления средний выход свиного продукта представляет собой выход, полученный от каждой отдельной свиньи в популяции свиней, усредненный по популяции. В еще одном варианте осуществления средний выход свиного продукта представляет собой общий выход продукта из популяции свиней, деленный на количество отдельных особей в популяции свиней.

В некоторых вариантах осуществления животное или популяция животных, получавшая синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или композицию корма для животных, имеет более высокий среднесуточный привес, более высокий средненедельный привес, более высокий итоговый привес, более высокий средний итоговый привес или более высокий средний выход животного продукта, или любые их комбинации, чем у животного или популяции животных, получавших рацион, не включающий синтетический олигосахаридный препарат, но включающий один или несколько антибиотиков, один или несколько ионофоров, растворимое кукурузное волокно, модифицированный пшеничный крахмал или дрожжевой маннан, или любые их комбинации.

Специалист в данной области техники поймет, что максимальный теоретический привес может быть разным для разных типов животных, и может быть разным для разных пород одного и того же типа животных (например, разных типов цыплят-бройлеров или разных видов свиней).

Специалист в данной области техники поймет, что максимальный теоретический привес может быть разным для разных типов животных, и может быть разным для разных пород одного и того же типа животных (например, разных типов цыплят-бройлеров или разных видов свиней).

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления, домашняя птица представляет собой отдельную домашнюю птицу, тогда как в других вариантах осуществления домашняя птица является популяцией домашних птиц. В других вариантах осуществления животное является свиньей. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления, свинья представляет собой отдельную свинью, тогда как в других вариантах осуществления свинья представляет собой популяцию свиней.

G. Потребление корма.

В некоторых вариантах осуществления, предоставление животному синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции, премикса корма для животных или кормовой композиции для животных, как описано в настоящем изобретении, приводит к повышенному среднесуточному потреблению корма по сравнению с кормом для животных, который не включает синтетический олигосахаридный препарат.

Среднесуточное потребление корма (ADFI) относится к средней массе корма, потребляемого животным за определенный период времени. В некоторых вариантах осуществления среднесуточное потребление корма измеряют путем раздачи известной массы корма группе из фиксированного количества животных, что позволяет животным в группе свободно потреблять розданный корм без ограничения в течение определенного количества дней, взвешивания массы неизрасходованного корма в конце периода времени и вычисления среднего суточного потребления корма (ADFI) как разницы между распределенной массой корма за вычетом остаточной массы корма, деленной на количество животных в группе и деленной по количеству дней в периоде. В других вариантах осуществления среднесуточное потребле-

ние корма может быть скорректировано для любых животных, которые умерли или удалены из группы, с использованием способов, известных специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, а кормовая композиция для животных представляет собой корм для домашней птицы, где синтетический олигосахаридный препарат, премикс корма для домашней птицы или кормовая композиция для домашней птицы увеличивают среднесуточное потребление корма примерно на 10%, или примерно 5%, или от 1% до 10%, от 2% до 10%, от 3% до 10%, от 4% до 10%, от 5% до 10%, от 2% до 5%, от 2% до 6%, от 2% до 7%, от 2% до 8%, от 2% до 9% или от 1% до 5% при скармливании домашней птице по сравнению с домашней птицей, получавшей кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления домашняя птица страдает заболеванием или выращивается в неблагоприятной среде, где синтетический олигосахаридный препарат, питательная композиция для домашней птицы, премикс корма для домашней птицы или кормовая композиция для домашней птицы увеличивают среднесуточное потребление корма примерно на 30%, примерно на 25%, примерно на 20%, примерно на 15%, примерно на 10% или примерно на 5%, или от 1% до 30%, от 5% до 30%, от 10% до 30%, от 5% до 20%, от 10% до 20%, от 1% до 20%, от 1% до 15%, от 1% до 10%, от 2% до 10%, от 3% до 10%, от 4% до 10%, от 5% до 10%, от 2% до 5%, от 2% до 6%, от 2% до 7%, от 2% до 8%, от 2% до 9% или от 1% до 5% при скармливании домашней птице по сравнению с домашней птицей, получавшей кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с вышеизложенным, животное представляет собой свинью, а кормовая композиция для животных представляет собой корм для свиней, причем олигосахаридный препарат, питательная композиция для свиней, премикс корма для свиней или кормовая композиция для свиней увеличивают среднесуточное потребление корма примерно на 15%, примерно на 10% или примерно на 5%, или от 1% до 15%, от 2% до 15%, от 3% до 15%, от 4% до 15%, от 5% и 15%, от 10% до 15%, от 1% до 10%, от 2% до 10%, от 3% до 10%, от 4% до 10%, от 5% до 10%, от 2% до 5%, от 2% до 6%, от 2% до 7%, от 2% до 8%, от 2% до 9% или от 1% до 5% при скармливании свиньям, по сравнению со свиньями, получавшими кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления свинья страдает заболеванием или выращивается в неблагоприятной среде, где синтетический олигосахаридный препарат, питательная композиция для свиней, премикс корма для свиней или кормовая композиция для свиней увеличивают среднесуточное потребление корма примерно на 40%, примерно на 35%, примерно на 30%, примерно на 25%, примерно на 20%, примерно на 15%, примерно на 10% или примерно на 5%, или от 1% до 40%, от 5% до 40%, от 10% до 40%, от 15% до 40%, от 20% до 40%, от 25% до 40%, от 30% до 40%, от 1% до 30%, от 5% до 30%, от 10% до 30%, от 5% до 20%, от 10% до 20%, от 1% до 20%, от 1% до 15%, от 1% до 10%, от 2% до 10%, от 3% до 10%, от 4% до 10%, от 5% до 10%, от 2% до 5%, от 2% до 6%, от 2% до 7%, от 2% до 8%, от 2% до 9%, или от 1% до 5% при скармливании свиньям по сравнению со свиньями, получавшими кормовую композицию без синтетического олигосахаридного препарата.

Способы усиления роста животного или популяции животных, описанные в настоящем изобретении, включают предоставление олигосахаридного препарата, премикса корма для животных или корма для животных животному или популяции животных. Олигосахаридный препарат, премикс корма для животных или корм для животных могут быть предоставлены в любой подходящей форме любому подходящему типу животного с использованием любого подходящего режима кормления для ускорения роста животного или популяции животных.

Н. Качество животного продукта.

В некоторых вариантах осуществления животный продукт, такой как мясо животных, имеет повышенное качество. Описанные здесь животные продукты включают немясные продукты, такие как молоко и яйца. К качествам мяса животных относятся, например, цвет, целостность, текстура, вкус, ощущение во рту, аромат и нежность. Для квалифицированного специалиста ясно, что качество мяса животных будет зависеть от типа животного. Стандартные анализы, известные специалисту в данной области техники, можно использовать для оценки качества мяса животных, включая, например, цвет, вкус, нежность и аромат. Мясо животных, описанное в настоящем изобретении, можно оценить с помощью обученных экспертов. Оценка может включать осмотр, осязание, жевание и дегустацию продукта для определения внешнего вида продукта, цвета, целостности, текстуры, аромата, ощущения во рту и т.д. Экспертам могут быть поданы образцы при красном или белом свете. Образцам можно присвоить случайные трехзначные числа и повернуть их в избранном положении для предотвращения предвзятой оценки. Сенсорные оценки можно разделить на "принятие" или "привлекательность", или использовать специальную терминологию. Например, можно использовать буквенные шкалы (A -отлично, B - хорошо, C - плохо) или числовые шкалы (1=неприемлемо, 2= удовлетворительно, 3=хорошо; 4=очень хорошо; 5=отлично). Шкала может быть использована для оценки общей приемлемости или качества мяса животных, или конкретных качественных характеристик, таких как текстура и вкус. Членов экспертной группы можно попросить прополоскать рот водой между взятием образцов, и дать возможность прокомментировать каждый образец.

VIII. Животные.

Синтетический олигосахаридный препарат, питательная композиция, премикс корма для животных или кормовая композиция для животных могут быть предоставлены любому подходящему животному. В некоторых вариантах осуществления животное является моногастрическим. Обычно считается, что моногастрическое животное имеет однокамерный желудок. В других вариантах осуществления животное представляет собой жвачное животное. Принято считать, что у жвачных животных желудок многокамерный. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой жвачное животное в пре-руминантной фазе. Примерами таких жвачных животных в пре-руминантной фазе являются молочные телята.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашний скот. В некоторых вариантах осуществления животное является домашним животным. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой рыбу (например, лосося, тилапию, тропическую рыбу), домашнюю птицу (например, курицу, индейку), морской организме (например, креветку), овцу, корову, крупный рогатый скот, буйвола, бизона, свинью (например, поросят на доращивании, поросят в первой/второй фазе откорма, кошку, собаку, кролика, козу, морскую свинку, осла, верблюда, лошадь, голубя, хорька, песчанку, хомяка, мышь, крысу, птицу или человека.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу. Примеры домашней птицы включают курицу, утку, индейку, гуся, перепела или бойцового корниша. В одном из вариантов осуществления животное представляет собой курицу. В некоторых вариантах осуществления домашняя птица представляет собой курицу-несушку, цыпленка-бройлера или индейку. В других вариантах осуществления животное представляет собой млекопитающее, включая, например, корову, свинью, козу, овцу, оленя, бизона, кролика, альпаку, ламу, мула, лошадь, северного оленя, буйвола, яка, морскую свинку, крысу, мышь, альпаку, собаку, кошку или человека. В одном из вариантов осуществления животное представляет собой корову. В другом варианте осуществления животное представляет собой свинью. Кормовая композиция для животных также может использоваться в аквакультуре. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой водное животное. Примеры водных животных могут включать форель, лосося, окуня, тилапию, креветку, устрицу, мидию, моллюска, омара или рака. В одном варианте осуществления животное представляет собой рыбу.

IX. Применение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения применение включает предоставление синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции или кормовой композиции для животных, описанной в настоящем изобретении, животному, так чтобы животное могло потреблять синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию или кормовую композицию для животных по желанию. В таких вариантах осуществления животное потребляет некоторую часть синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции или кормовой композиции для животных.

Синтетический олигосахаридный препарат, питательная композиция, премикс корма для животных или кормовая композиция для животных могут быть предоставлены животному по любому подходящему графику. В некоторых вариантах осуществления животному предоставляют синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных ежедневно, еженедельно, ежемесячно, через день, в течение не менее трех дней в неделю или не менее семи дней в месяц. В некоторых вариантах осуществления у животного применяют олигосахаридный препарат, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных во время определенных фаз рациона.

Например, некоторым животным дают стартовый рацион в возрасте от 0 до 14 дней. В других вариантах осуществления животному дают ростовой рацион в возрасте от 15 до 28 дней, от 15 до 35 дней или от 15 до 39 дней. В других вариантах осуществления животному дают завершающий рацион в возрасте от 29 до 35 дней, от 36 до 42 дней или от 40 до 46 дней.

В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных предоставляют животному во время стартовой фазы рациона, ростовой фазы рациона или завершающей фазы рациона, или любых комбинаций из них.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, и домашняя птица получает стартовый рацион в возрасте от 0 до 15 дней, ростовой рацион в возрасте от 16 до 28 дней, и завершающий рацион в возрасте от 29 до 35 дней. В других вариантах осуществления животным является домашняя птица, и домашняя птица получает стартовый рацион в возрасте от 0 до 14 дней, ростовой рацион в возрасте от 15 до 35 дней, и завершающий рацион в возрасте от 36 до 42 дней. В других вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, и домашняя птица получает стартовый рацион в возрасте от 0 до 14 дней, ростовой рацион в возрасте от 15 до 39 дней, и завершающий рацион в возрасте от 20 до 46 дней.

В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, премикс корма для животных или кормовую композицию для животных предоставляют домашней птице во время стартовой фазы рациона, ростовой фазы рациона, или завершающей фазы ра-

циона, или любых комбинаций из них.

Описанные в настоящем изобретении олигосахаридные препараты можно скармливать отдельным животным или популяции животных. Например, в одном варианте, где животным является домашняя птица, олигосахаридные препараты можно скармливать отдельной домашней птице или группе домашних птиц.

Синтетический олигосахаридный препарат, питательная композиция, премикс корма для животных или кормовая композиция для животных могут быть предоставлены животному в любой подходящей форме, в то числе, например, в твердой форме, в жидкой форме или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат или кормовая композиция для животных представляет собой жидкость, такую как сироп или раствор. В других вариантах осуществления олигосахаридный препарат, премикс корма для животных или кормовая композиция для животных представляет собой твердое вещество, такое как гранулы или порошок. В еще одних вариантах осуществления олигосахаридный препарат, премикс корма для животных или кормовая композиция для животных могут быть предоставлены животному как в жидких, так и в твердых компонентах, например, в виде мешанки.

Примеры

Пример 1. Синтез глюко-галакто-олигосахаридного препарата.

Синтез глюко-галакто-олигосахаридного препарата проводили в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температуры реакции, которые были выбраны для обеспечения подходящего производства в килограммовом масштабе.

D-глюкозы моногидрат (825,16 г), D-лактозы моногидрат (263,48 г) и 2-пиридинсульфоновую кислоту (1,0079 г, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) добавляли в трехлитровую трехгорлую колбу с круглым дном и центральной горловиной из шлифованного стекла 29/42 и двумя боковыми горловинами из шлифованного стекла 24/40. Тефлоновая лопасть 133 мм для перемешивания была прикреплена к стеклянному стержню для перемешивания с помощью ленты из ПТФЭ. Шток мешалки закрепляли через центральную точку с помощью тефлонового несущего адаптера и прикрепляли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была закреплена внутри полусферического электронагревательного кожуха, управляемого блоком контроля температуры через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в одном из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько мм над смесительным элементом. Вторичный температурный зонд, подключенный к вспомогательному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об/мин. Когда реакционная смесь достигала 120°C, дефлегматор переводили в конфигурацию для перегонки, при этом дистиллированный продукт собирали в круглодонной колбе объемом 250 мл, помещенной на ледяную баню. Смесь выдерживали при 130°C при непрерывном перемешивании в течение 6 ч, после чего блок термопары отключали. Дистилляционный аппарат удаляли, и в трехгорлую колбу постепенно добавляли 390 г дистиллированной воды с температурой 60°C. Полученную смесь оставляли перемешиваться при 40 об/мин в течение 10 ч. Было собрано примерно 1250 г вязкого материала светло-янтарного цвета, и его концентрация составила 71,6° Брикса по показателю преломления.

Конечное содержание воды в продукте реактора измеряли титрованием по Карлу Фишеру для типичной аликвоты содержимого реактора, взятой в конце реакции. При температуре реакции 130°C содержание воды в продукте реакции было определено как 5,8 мас.% воды без пересчета на сухое вещество.

Пример 2. Синтез глюко-олигосахаридного препарата.

Синтез глюко-олигосахаридного препарата проводили в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температуры реакции, которые были выбраны для обеспечения подходящего производства в килограммовом масштабе.

D-глюкозы моногидрат (1150 г) добавляли в трехлитровую трехгорлую круглодонную колбу с одной центральной горловиной из шлифованного стекла 29/42 и двумя боковыми горловинами из шлифованного стекла 24/40. 133 мм тефлоновая лопасть для перемешивания была прикреплена к стеклянному стержню для перемешивания с помощью ленты из ПТФЭ. Шток мешалки закрепляли через центральную точку с помощью тефлонового несущего адаптера и прикрепляли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была закреплена внутри полусферического электронагревательного кожуха, управляемого устройством контроля температуры, через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в одном из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько мм над смесительным элементом. Вторичный температурный зонд, подключенный к дополнительному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об/мин. Когда температура реакции повышалась до 120-130°C, в трехгорлую колбу добавляли (+)-камфор-10-сульфоновую кислоту (1,16 г, Sigma-Aldrich, Сент-Луис), и прибор переключали с обратного холодильника на конфигурацию перегонки с круглодонной колбой для сбора, помещенной в ледяную баню. Эту установку поддерживали в течение 1,5 ч, после чего отключали блок термопары, удаляли дистилляционный аппарат, и в трехгорлую колбу постепенно добавляли 390 г дистиллированной воды с температурой 23°C. Полученную смесь оставляли перемешиваться при 40 об/мин в течение 10 ч до момента сбора. Было собрано примерно 1300 г вязкого материала темно-янтарного цвета, и его концентрация составила 72,6° по Бриксу.

Пример 3. Синтез глюко-галакто-манно-олигосахаридного препарата.

Синтез глюко-галакто-манно-олигосахаридного препарата проводили в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температуры реакции, которые были выбраны для обеспечения подходящего производства в килограммном масштабе.

Глюко-галакто-манно-олигосахаридный препарат получали в виде двух отдельных компонентов, синтезированных в отдельных реакционных сосудах, которые собирали независимо. В каждом синтезе использовали разные исходные реагенты, но следовали тем же процедурам и методам до завершения. Конечный глюко-галакто-манно-олигосахаридный препарат представлял собой гомогенный сироп, полученный в результате смешивания обоих продуктов синтеза.

Для синтеза первого компонента в трехлитровую трехгорлую круглодонную колбу с центральной шлифованной горловиной 29/42 и боковыми шлифованными горловинами 24/40 добавляли 990,54 г глюкозы моногидрата, 105,58 г лактозы моногидрата и 1,00 г 2-пиридинсульфоновой кислоты. 133-миллиметровую тефлоновую лопасть для перемешивания прикрепляли к стеклянной мешалке диаметром 440 мм с помощью ленты из ПТФЭ. Шток мешалки закрепляли через центральную точку с помощью тефлонового несущего адаптера и прикрепляли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была помещена в полусферический электронагревательный кожух, управляемый устройством контроля температуры через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в один из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько мм над смесительным элементом. Вторичный температурный зонд, подключенный к вспомогательному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об/мин. После того, как в камере контроля температуры достигалось значение от 120°C до 130°C, устройство переключали с обратного холодильника на конфигурацию дистилляции с круглодонной колбой для сбора, помещенной в ледяную баню. Эту установку поддерживали в течение примерно 6 ч и 10 мин, после чего нагревательный кожух отключали, дистилляционный аппарат удаляли, и 390 г дистиллированной воды с температурой 60°C постепенно добавляли в трехгорлую колбу. Полученную смесь оставляли перемешиваться при 40 об/мин в течение 10 ч до момента сбора. Было собрано примерно 1250 г вязкого материала светло-янтарного цвета, и при измерении по показателю преломления его концентрация составила 73,1° по шкале Брикса.

Для синтеза второго компонента 825,04 г глюкозы моногидрата, 251,16 г чистой маннозы из древесины, 25,10 г дистиллированной воды и 1,00 г 2-пиридинсульфоновой кислоты добавляли в трехлитровую трехгорлую круглодонную колбу с одной центральной шлифованной горловиной 29/42, по бокам которой расположены две шлифованных горловины 24/40. Остальную часть синтеза второго компонента проводили по той же процедуре и способам, что и для первого компонента, до момента сбора. Было собрано примерно 1250 г вязкого материала темно-янтарного цвета, и его концентрация составила 72,3° по шкале Брикса.

Первый и второй компоненты полностью переносили в контейнер из ПЭВП подходящего размера и тщательно перемешивали вручную до гомогенного состояния. Конечная смесь сиропа имела массу примерно 2,5 кг, темно-янтарный цвет, была вязкой и имела концентрацию приблизительно 72° по шкале Брикса.

Пример 4. Синтез глюко-манно-олигосахаридного препарата.

Синтез глюко-олигосахаридного препарата проводили в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температуры реакции, которые были выбраны для обеспечения подходящего производства в килограммовом масштабе.

Глюко-манно-олигосахаридный препарат получали в виде двух отдельных компонентов, синтезированных в отдельных реакционных сосудах, которые собирали независимо. В каждом синтезе использовали разные исходные реагенты, но до завершения использовали одни и те же процедуры и способы. Конечный глюко-манно-олигосахаридный препарат представлял собой гомогенный сироп, полученный в результате смешивания обоих продуктов синтеза.

Для синтеза первого компонента 1264,80 г глюкозы моногидрата добавляли в трехлитровую трех-

горлую круглодонную колбу с одной центральной шлифованной горловиной 29/42, окруженной двумя шлифованными горловинами 24/40. 133-миллиметровую тефлоновую лопасть для перемешивания прикрепляли к стеклянной мешалке диаметром 440 мм с помощью ленты из ПТФЭ. Шток мешалки закрепляли через центральную точку с помощью тефлонового несущего адаптера и прикрепляли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была помещена в полусферический электрический нагревательный кожух, управляемый устройством контроля температуры через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в одном из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько мм над смесительным элементом. Вторичный температурный зонд, подключенный к вспомогательному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об/мин. После того, как в камере контроля температуры достигалось значение от 120°C до 130°C, в трехгорлую колбу добавляли 1,15 г (+)-камфор-10-сульфоновой кислоты, и устройство переключали с обратного холодильника на конфигурацию перегонки с круглодонной колбой для сбора, помещенной в ледяную баню. Эту установку поддерживали в течение примерно 1 ч, после чего отключали блок термопары, удаляли дистилляционный аппарат, и 390 г дистиллированной воды с температурой 23°C постепенно добавляли в трехгорлую колбу. Полученную смесь оставляли перемешиваться при 40 об/мин в течение 10 ч до момента сбора. Было собрано приблизительно 1350 г вязкого материала светло-янтарного цвета, и его концентрация составила 71,8° по шкале Брикса.

Для синтеза второго компонента 949,00 г глюкозы моногидрата, 288,00 г чистой маннозы из древесины, 27,94 г дистиллированной воды и 1,15 г 2-пиридинсульфоновой кислоты добавляли в трехлитровую трехгорлую колбу с одной центральной шлифованной горловиной 29/42, по бокам которой расположены две шлифованных горловины 24/40. Остальную часть синтеза второго компонента проводили по той же процедуре и способам, что и для первого компонента, до момента сбора, за исключением того, что (+)-камфор-10-сульфоновую кислоту не добавляли, поскольку дефлегматор был переключен на конфигурацию перегонки, и полученную установку поддерживали примерно 6 ч. Было собрано примерно 1350 г вязкого материала темно-янтарного цвета, и его концентрация составила 72,0° по шкале Брикса.

Первый и второй компоненты полностью переносили в контейнер из ПЭВП подходящего размера и тщательно перемешивали вручную до гомогенного состояния. Конечная смесь сиропа имела массу примерно 2,7 кг, темно-янтарный цвет, была вязкой и, как было определено по показателю преломления, имела концентрацию примерно 72° по шкале Брикса.

Пример 5. Синтез глюко-манно-олигосахаридного препарата.

Получение олигосахаридного препарата в килограммовом масштабе осуществляли в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температуры реакции, которые оказались подходящими для производства в масштабе 1 кг.

Глюко-манно-олигосахаридный препарат получали в виде двух отдельных компонентов, синтезированных в отдельных реакционных сосудах, которые собирали независимо. В каждом синтезе использовали разные исходные реагенты, но до завершения применяли одни и те же процедуры и способы. Конечный глюко-манно-олигосахаридный препарат представлял собой гомогенный сироп, полученный в результате смешивания обоих продуктов синтеза.

Для синтеза первого компонента 1261,00 г глюкозы моногидрата и 1,15 г 2-пиридинсульфоновой кислоты добавляли в трехлитровую трехгорлую круглодонную колбу с одной центральной шлифованной горловиной 29/42, окруженной двумя шлифованными горловинами 24/40. 133-миллиметровую тефлоновую лопасть для перемешивания прикрепляли к стеклянной мешалке диаметром 440 мм с помощью ленты из ПТФЭ. Шток мешалки закрепляли через центральную точку с помощью тефлонового несущего адаптера и прикрепляли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была закреплена внутри полусферического электронагревательного кожуха, управляемого устройством контроля температуры через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в одном из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько мм над смесительным элементом. Вторичный температурный зонд, подключенный к вспомогательному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об/мин. После того, как показания блока контроля температуры достигали от 120°C до 130°C, аппарат переключали с обратного холодильника на дистилляционную конфигурацию с круглодонной колбой для сбора, помещенной в ледяную баню. Эту установку поддерживали в течение примерно 6 ч, после чего блок термопары отключали, дистилляционный аппарат удаляли, и 390 г дистиллированной воды с температурой 23°C постепенно добавляли в трехгорлую колбу. Полученную смесь

оставляли перемешиваться при 40 об/мин в течение 10 ч до момента сбора. Было собрано примерно 1250 г вязкого материала светло-желтого цвета, и его концентрация составила 73,5° по шкале Брикса.

Для синтеза второго компонента 949,00 г глюкозы моногидрата, 288,00 г чистой маннозы из древесины, 28,94 г дистиллированной воды и 1,15 г 2-пиридинсульфоновой кислоты добавляли в трехлитровую трехгорлую колбу с одной центральной шлифованной горловиной 29/42, по бокам которой расположены две шлифованных горловины 24/40. Остальную часть синтеза второго компонента проводили по той же процедуре и методам, что и для первого компонента, до момента сбора. Было собрано примерно 1250 г вязкого материала темно-янтарного цвета, и его концентрация составила 73,3° по шкале Брикса.

Первый и второй компоненты полностью переносили в контейнер из ПЭВП подходящего размера и тщательно перемешивали вручную до гомогенного состояния. Конечная смесь сиропа имела массу примерно 2,5 кг, была темно-янтарного цвета, вязкой и имела концентрацию приблизительно 73° по шкале Брикса.

Пример 6. Синтез глюко-галакто-олигосахаридного препарата.

Производство олигосахаридного препарата в килограммовом масштабе проводили в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температур реакции, которые оказались подходящими для производства в масштабе 1 кг.

Трехгорлую колбу объемом 3 л оборудовали подвесным смесителем, соединенным через стеклянную мешалку диаметром 10 мм с 14 см серповидным смесительным элементом. Смесительный элемент располагали на расстоянии примерно 5 мм от стенок колбы. Колбу нагревали с помощью полусферического электронагревательного кожуха, управляемого блоком контроля температуры, подключенным к жезловидному зонду термопары, вставленному в реакционную колбу. Зонд термопары размещали так, чтобы над смесительным элементом оставался зазор 5-10 мм. В колбу загружали 576 г декстрозы моногидрата пищевого качества и 577 г D-галактозы моногидрата пищевого качества, и нагревали примерно до 115°C с получением расплавленного сахарного сиропа. После получения сиропа колбу снабжали обратным холодильником с кожухом, охлаждаемым до 4°C за счет циркуляции охлажденного гликоля/воды и температуры. К смеси добавляли 31 г смолы Dowex Marathon C (содержание влаги 0,48 г H_2O/г смолы) с получением перемешиваемой суспензии. Конденсатор переводили в конфигурацию для перегонки, и суспензию нагревали до 145°C.

Скорость перемешивания примерно 80 об/мин и температуру 145°C поддерживали в течение 3,8 ч, после чего температуру на блоке контроля температуры снижали до 80°C, и в колбу постепенно добавляли 119 мл деионизированной воды с температурой 60°C, чтобы получить темно-янтарный сироп, содержащий остаточную смолу Dowex. Полученную суспензию дополнительно разбавляли до 60° Брикса, охлаждали до комнатной температуры и фильтровали под вакуумом через фильтр 0,45 микрон для удаления смолы. Было получено 1200 г сиропа светло-янтарного цвета с концентрацией 60° Брикса.

Пример 7. Синтез глюко-олигосахаридного препарата.

Производство олигосахаридного препарата в килограммовом масштабе осуществляли в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температур реакции, которые оказались подходящими для производства в масштабе 1 кг.

Трехгорлую колбу вместимостью 3 л оборудовали подвесным смесителем, соединенным через стеклянную мешалку диаметром 10 мм с серповидным смесительным элементом размером 14 см. Смесительный элемент размещали на расстоянии примерно 5 мм от стенок колбы. Колбу нагревали с помощью полусферического электронагревательного кожуха, управляемого блоком контроля температуры, подключенным к жезловидному зонду термопары, вставленному в реакционную колбу. Зонд термопары размещали так, чтобы над смесительным элементом оставался зазор 5-10 мм. В колбу постепенно загружали 1148 г декстрозы моногидрата пищевого качества и нагревали примерно до 115°C с получением расплавленного сахарного сиропа. После получения сиропа колбу снабжали дистилляционным конденсатором с кожухом, охлаждаемым до 4°C путем циркуляции охлажденного гликоля/воды. Температуру реакции постепенно повышали до 145°C. После достижения и стабилизации температуры к смеси добавляли 31 грамм смолы Dowex Marathon C (содержание влаги 0,48 г H_2O/г смолы) и поддерживали скорость перемешивания примерно 80 об/мин и температуру 145°C в течение 3,8 ч.

Через 3,8 ч установку на блоке контроля температуры снижали до 80°C, и в колбу постепенно добавляли 119 мл деионизированной воды с температурой 60°C для получения сиропа темно-янтарного цвета, содержащего остаточную смолу Dowex. Полученную суспензию дополнительно разбавляли до 60° Брикса, охлаждали до комнатной температуры и фильтровали под вакуумом через фильтр 0,45 микрон для удаления смолы. Было получено 1113 г сиропа глюко-олигосахарида темно-янтарного цвета с концентрацией 60° Брикса.

Пример 8. Синтез олигосахаридных препаратов в одном резервуаре.

Однореакторный (однокомпонентный) синтез олигосахарида из примера 3 был продемонстрирован в масштабе 300 г в реакционном сосуде объемом один литр с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температур реакции, которые оказались подходящими для реакции в одном резервуаре.

30 г D-глюкозы моногидрата пищевого качества из кукурузы, 37,50 г D-маннозы пищевого качества из древесины, 15,60 г D-лактозы моногидрата пищевого качества, 3,96 г дистиллированной воды и

0,270 г 2-пиридинсульфоновой кислоты (Sigma-Aldrich, Сент-Луис) добавляли в однолитровую трехгорлую круглодонную колбу с одной центральной шлифованной горловиной 29/42, окруженной двумя шлифованными горловинами 24/40. Тефлоновую лопасть для перемешивания прикрепляли к 220-миллиметровому стеклянному валу для перемешивания с помощью ленты из ПТФЭ. Шток мешалки закрепляли через центральную точку с помощью тефлонового несущего адаптера и прикрепляли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была закреплена внутри полусферического электронагревательного кожуха, управляемого устройством контроля температуры через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в одном из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько мм над смесительным элементом. Вторичный температурный зонд, подключенный к вспомогательному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об/мин. После того, как в камере контроля температуры достигалось значение от 120°C до 130°C, устройство переключали с обратного холодильника на конфигурацию дистилляции с круглодонной колбой для сбора, помещенной в ледяную баню. Смесь поддерживали при 130°C при непрерывном перемешивании в течение примерно 5 ч 40 мин, после чего нагревательный кожух и устройство для перегонки удаляли. В трехгорлую колбу постепенно добавляли примерно 40 г дистиллированной воды с температурой 23°C. Полученную смесь оставляли перемешиваться при 40 об/мин в течение 10 ч до момента сбора. Было собрано примерно 389 г вязкого материала темно-янтарного цвета, и его концентрация составила 67,0° Брикса. Соответствие олигосахаридному препарату из примера 3 подтверждали хроматографией SEC и 2D HSQC ЯМР-спектроскопией.

Пример 9. Характеристика олигосахаридных препаратов.

Способы и процедуры из примеров 1-8 использовали для приготовления повторяющихся партий и смесей олигосахаридов из примеров 1-7. При приготовлении различных партий из примеров 9.1-9.7 применяли как многореакторные (многокомпонентные), так и однореакторные варианты соответствующих схем синтеза. Полученные материалы анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии ВЭЖХ (SEC) для характеристики распределения молекулярной массы, ЖХ-МС/МС анализа для количественного определения содержания ангидро-сахаров DP2, и 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР для определения молекулярной структуры соответствующих олигосахаридных препаратов.

Материалы готовили следующим образом.

Пример 9.1: были приготовлены одиннадцать партий олигосахаридного препарата из примера 1 и смешаны в четыре отдельные серии для получения олигосахаридного препарата 9.1.

Пример 9.2: были приготовлены семь партий олигосахаридного препарата из примера 2 и смешаны в две отдельные серии для получения олигосахаридного препарата 9.2.

Пример 9.3: были приготовлены двенадцать партий олигосахаридного препарата из примера 3 и смешаны в пять отдельных серий для получения олигосахаридного препарата 9.3.

Пример 9.4: были приготовлены четыре партии олигосахаридного препарата из примера 4 и смешаны в одну серию для получения олигосахаридного препарата 9.4.

Пример 9.5: были приготовлены четыре партии олигосахаридного препарата из примера 5 и смешаны в одну серию для получения олигосахаридного препарата 9.5.

Пример 9.6: были приготовлены две партии олигосахаридного препарата из примера 6 и смешаны в одну серию для получения олигосахаридного препарата 9.6.

Пример 9.7: были приготовлены две партии олигосахаридного препарата из примера 7 и смешаны в одну серию для получения олигосахаридного препарата 9.7.

Дополнительные структурные варианты олигосахаридных препаратов из примеров 1-7 были синтезированы в масштабе 300 граммов с использованием способов из примеров 1-7, но с вариациями исходных сахарных композиций, кислоты, кислотной нагрузки, времени и температуры реакции.

Олигосахаридные препараты были синтезированы следующим образом.

Пример 9.8: 300 г сахарозы, 3 г фосфорной кислоты и 27 г воды подвергали взаимодействию при 125°C в течение примерно одного часа с получением темно-коричневого олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° по Бриксу дистиллированной водой.

Пример 9.9: Проводили реакцию 270 г глюкозы, 30 г сахарозы, 0,3 г фенилфосфоновой кислоты и 27 г воды при 130°C в течение от одного до четырех часов с получением темно-коричневого олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Пример 9.10: 225 г глюкозы, 75 г лактозы, 3 г бутилфосфоновой кислоты и 27 г воды подвергали реакции при 130°C в течение от одного до четырех часов с получением темно-янтарного олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° Брикса с дистиллированной водой.

Пример 9.11: 225 г глюкозы, 75 г лактозы, 3 г фенилфосфоновой кислоты и 27 г воды подвергали реакции при 130°C в течение от одного до пяти часов с получением темно-янтарного олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Пример 9.12: Проводили реакцию 270 г глюкозы, 30 г лактозы, 3 г фенилфосфиновой кислоты и 27 г воды при 130°C в течение от трех до пяти часов с получением темно-коричневого олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Пример 9.13: 300 г глюкозы, 3 г фенилфосфиновой кислоты и 27 г воды подвергали реакции при 130°C в течение от одного до трех часов с получением темно-янтарного сиропа олигосахарида, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Пример 9.14: 300 г глюкозы, 2 г пропионовой кислоты и 27 г воды подвергали реакции при 130°C в течение от одного до четырех часов с получением янтарного олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Пример 9.15: 300 г глюкозы, 0,15 г 8-гидрокси-5-хинолинсульфоновой кислоты гидрата и 27 г воды подвергали реакции при 130°C в течение двух-четырех часов с получением янтарного олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

В вышеуказанных реакциях все массы относятся к массам чистых компонентов, и общая масса реагирующей воды включала любую дополнительную воду, обеспеченную влагосодержанием и/или водой от гидратации реагирующих сахаров.

Пример 9.16: 10 г глюкозы, 0,01 г 8-гидрокси-5-хинолинсульфоновой кислоты гидрата и 1 г воды подвергали реакции при 130°C для получения янтарного олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Пример 9.17: Примерно 8 г глюкозы, примерно 2 г лактозы, 0,01 г 2-пиридинсульфоновой кислоты и 1 г воды подвергали реакции при 130°C для получения янтарного олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Характеристика олигосахаридных препаратов.

Полученные материалы анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии ВЭЖХ (SEC) для характеристики распределения молекулярной массы, анализа ЖХ-МС/МС для количественного определения содержания ангидро-сахаров DP2, и 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР для определения молекулярной структуры соответствующих олигосахаридных препаратов.

Анализ молекулярной массы полимеров с помощью ВЭЖХ.

Среднечисленную молекулярную массу (MWn) и средневесовую молекулярную массу (MWw) олигосахаридных препаратов из примеров 9.1-9.7 определяли с помощью ВЭЖХ. SEC-анализ выполняли на ВЭЖХ Agilent серии 1100 с определением показателя преломления с использованием колонки Agilent PL aquagel-OH 20 при 40°C с дистиллированной водой в качестве подвижной фазы при 0,45 мл/мин. Калибровку времени удерживания до MW проводили с использованием стандартных растворов с известной молекулярной массой, и стандартные методы из уровня техники были использованы для определения различных свойств распределения по хроматограмме SEC. Значения MWn и MWw олигосахаридных препаратов из множества серий показана ниже в табл. 1.

Таблица 1

MWn и MWw олигосахаридных препаратов

Олигосахаридный препарат	**MWn (г/моль)**	**MWw (г/моль)**
9.1	719 ± 11	1,063 ± 23
9.2	808 ± 30	1,336 ± 122
9.3	757 ± 15	1,186 ± 49
9.4	761	1,196
9.5	755	1,177
9.6	505	709
9.7	762 ± 12	1,154 ± 14

Анализ содержания ангидро-DP2 с помощью ЖХ-МС/МС.

Содержание ангидро-олигосахаридов DP2 в олигосахаридных препаратах определяли с помощью ЖХ-МС/МС с использованием колонки Capcell Pak NH_2 (Shiseido; 250×4,6 мм, 5 мкм) при скорости потока 1 мл/мин в изократических условиях вода/ацетонитрил 35/65. Перед МС поток разделяли 1:4 и добавляли подпитывающий поток 50 мкл 0,05% NH_4OH для усиления ионизации. Для детекции МС использовали зонд ESI в отрицательном режиме, а метод множественного мониторинга реакций (MRM) позволял проводить целенаправленный анализ.

Содержание ангидро-DP2 в препаратах олигосахаридов сначала определяли относительно содержания в олигосахаридном препарате из примера 9.7 в качестве эталонной композиции. Абсолютное содержание ангидро-DP2 в эталонном олигосахаридном препарате из примера 9.7 было затем определено с помощью ВЭЖХ-МС/МС и составило примерно 10%, и затем было рассчитано содержание ангидро-DP2 в олигосахаридных препаратах из примеров 9.1-9.6. Относительное и абсолютное содержание DP2 определяли, как описано в табл. 2.

Таблица 2

Содержание ангидро-DP2 в олигосахаридных препаратах с несколькими сериями

Олигосахаридный препарат	Относительное содержание ангидро-DP2, в % по сравнению с Примером 9.7	Содержание ангидро-DP2 (грамм ангидро-DP2/ грамм общих DP2)
9.1	53%	5,3%
9.2	14%	1,4%
9.3	57%	5,7%
9.4	53%	5,3%
9.5	33%	3,3%
9.6	50%	5,0%
9.7	100%	10,0%

Молекулярный фингерпринтинг методом 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР.

Молекулярные структуры олигосахаридных препаратов из примера 9 были охарактеризованы с помощью 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР спектроскопии. Образцы получали путем сушки 125 мг (на основе сухого вещества) олигосахаридного препарата при 40°C и повторного растворения в D_2O, содержащей 0.1% ацетона. Спектры ЯМР получали при 300 К либо на ЯМР-спектрометре Bruker Avance, работающем с частотой протонов 400 МГц, либо на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III, работающем с частотой протонов 600 МГц, оборудованном криогенно охлаждаемым 5-миллиметровым зондом TCI. На фиг. 1 представлен иллюстративный 2D ^{1}H, ^{13}C HSQC ЯМР-спектр олигосахаридного препарата из олигосахаридного препарата 9.7.

Аномерная область спектра ^{1}H, ^{13}C-HSQC, F2 (^{1}H)=4,2-6,0 м.д. и F1 (^{13}C)=90-120 м.д. была использована для фингерпринтинга распределения связей олигосахаридных препаратов. Каждый пик в аномерной области был интегрирован, и его относительное содержание было определено по отношению к таковому всей аномерной области. 2D ^{1}H, ^{13}C HSQC фингерпринтинг проводили на четырех сериях олигосахаридного препарата 9.1.

Таблица 3

Относительная распространенность пиков F1 и F2 из олигосахаридного препарата 9.1

F2 (м.д.)	F1 (м.д.)	AUC (Среднее ± SEM)
5,43	92,42	0,4% ± 0,3%
5,44	102,07	0,4% ± 0,1%
5,43	90,05	0,5% ± 0,2%
5,40	100,22	1,6% ± 0,4%
5,37	98,33	0,7% ± 0,4%
5,35	99,70	2,7% ± 0,6%
5,33	96,53	0,3% ± 0,2%
5,24	100,86	0,5% ± 0,2%
5,22	92,71	20,2% ± 3,9%
5,21	102,45	0,5% ± 0,4%
5,18	93,86	0,9% ± 0,4%
5,17	96,01	0,4% ± 0,1%
5,09	96,88	0,6% ± 0,3%
5,03	108,49	0,4% ± 0,2%
5,02	109,16	0,4% ± 0,4%
4,98	99,19	0,6% ± 0,3%
4,95	98,51	30,6% ± 4,1%
4,86	98,53	0,7% ± 0,5%
4,79	96,84	0,6% ± 0,3%
4,71	103,48	2,5% ± 0,7%
4,64	103,56	0,8% ± 0,4%
4,63	102,49	0,7% ± 0,5%
4,62	104,56	1,4% ± 0,4%
4,57	97,07	1,6% ± 0,3%

4,50	103,30	25,9% ± 2,2%
4,45	103,56	2,4% ± 1,3%

Пример 10. Определение ангидро-субъединиц сахаров в олигосахаридном препарате.

Относительную распространенность ангидро-субъединиц сахаров в олигосахаридных препаратах из примера 9 определяли с помощью MALDI-MS на приборе Bruker Ultraflex. Образцы растворяли в воде до концентрации 10 мг/мл, из которых 5 мкл смешивали с раствором матрицы (30 мг/мл DHB в 80% этаноле и воде в соотношении 1:10). Пластины готовили путем нанесения 1 мкл раствора анализируемого вещества на целевую пластину, и сушили на окружающем воздухе. В некоторых случаях образцы подвергали перекристаллизации, применяя 1 мкл этанола перед анализом МС.

Фиг. 2 представляет иллюстративный спектр MALDI олигосахаридного препарата из примера 9. Ангидро-субъединицы сахара четко наблюдаются в виде смещенных пиков, сдвинутых на -18 г/моль относительно его соответствующей основной исходной DP. Смещенные пики наблюдаются при всех значениях DP, указывая на то, что ангидро-субъединицы сахара обнаруживаются при всех размерах олигосахаридов. Относительная интенсивность пика ангидро-субъединиц при определении составила примерно 10% от общей интенсивности пика для каждого значения DP, из чего относительная распространенность всех ангидро-субъединиц составила при определении примерно 10%. Фиг. 32A и фиг. 32B иллюстрируют спектры MALDI олигосахаридного препарата из примера 2. Ангидро-субъединицы сахаров наблюдаются на каждом уровне DP с относительной интенсивностью в диапазоне 5-10%.

Пример 11. Характеристика ангидро-субъединиц олигосахаридного препарата.

Ангидросахарные субъединицы олигосахаридных препаратов из примера 9 были охарактеризованы с использованием комбинации методов ЖХ-МС, ГХ-МС, ЖХ-МС/МС и ЯМР.

Характеристика ангидро-DP1 компонентов.

Ангидро-компонент DP1 из олигосахаридного препарата из примера 9 выделяли с помощью препаративной жидкостной хроматографии. Выделенный ангидро-DP1 компонент получали для ЯМР растворением его в 0,75 мл D_2O. На фиг. 3 представлен иллюстративный 1D ^{1}H-ЯМР-спектр фракции ангидро DP1, выделенной из олигосахарида из примера 9, а на фиг. 4 представлен иллюстративный спектр APT ^{13}C-ЯМР той же выделенной фракции ангидро DP1.

С использованием следующих назначений пиков в табл. 4, отношение 1,6-ангидро-бета-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-бета-D-глюкопиранозе при определении посредством ЯМР составило 2:1.

Таблица 4

Назначения пиков ЯМР

	1,6-ангидро-бета-D-глюкофураноза		1,6-ангидро-бета-D-глюкопираноза	
#	^{1}H (м.д.)	^{13}C (м.д.)	^{1}H (м.д.)	^{13}C (м.д.)
1	5,33	101,9	5,01	104,4
	3,40	70,6	4,37	79,8
	3,56 (ov)[a]	73,0	4,27	78,3
	3,56 (ov)[a]	71,3	4,38	80,6
	4,50	76,7	3,74	64,1
	3,97; 3,64	65,7	4,14; 3,72	66,7

[a]Ov означает перекрывающийся сигнал

Характеристика ангидро-DP2 компонентов.

Содержание ангидро-DP2 в олигосахаридных препаратах из примера 9 определяли с использованием комбинации методов ЖХ-МС, ГХ-МС, ЖХ-МС/МС и ЯМР. Содержание ангидро-DP2 в олигосахаридных препаратах из примера 9 определяли с помощью ГХ-МС и ЖХ-МС/МС анализов. Газовую хроматографию выполняли с использованием колонки из плавленого диоксида кремния 30 м×0,25 мм, содержащей неподвижную фазу HP-5MS, с гелием при постоянном давлении 21,57 фунт/кв.дюйм в качестве газа-носителя. Аликвоты предварительно дериватизировали ацетилированием путем растворения 20 мг образца в 0,5 мл пиридина с 0,5 мл уксусного ангидрида в течение 30 мин при 60°C. Образцы объемом 1 мкл вводили при 300°C с температурной программой печи, начиная с 70°C и постепенно повышая на 10°C/мин до 315°C. Детекцию проводили на МСД Agilent 5975C с энергией электронов 70 эВ.

Фиг. 5 показывает увеличение хроматограммы ГХ-МС для олигосахаридного препарата 9.7. Графики TIC и XIC (m/z 229) демонстрируют, что компоненты DP2 и ангидро-DP2 четко разделены. Фиг. 37A-37B, 38A-38B, 39A-39B и 40A-4B иллюстрируют присутствие фракций DP1, ангидро-DP1, DP2 и ангидро-DP2, при определении с помощью ГХ-МС в олигосахаридном препарате из примера 1, примера 3, примера 4, и примера 7, соответственно. Как показано на фиг. 37A-37B, 38A-38B, 39A-39B и 40A-40B, фракции ангидро-DP1 и DP1 имеют время удерживания примерно 12-17 мин, а фракции ангидро- DP2 и

DP2 имеют время удерживания примерно 2-25 мин.

Фиг. 43 иллюстрирует спектры MALDI-MS, сравнивающие олигосахаридный препарат из примера 9 при различных энергиях лазера. Относительная распространенность сигналов практически не изменилась, что свидетельствует о том, что лазерная ионизация не приводит к потере воды. Следовательно, доказано наличие ангидро-сахарных субъединиц в олигосахаридном препарате.

Пример 12. Наблюдение субъединиц от карамелизации в олигосахаридном препарате.

Олигосахаридный препарат, включающий субъединицу 5-гидроксиметилфурфурола от карамелизации, был продемонстрирован комбинацией анализов ВЭЖХ и 2D ^{1}H, ^{13}C HSQC ЯМР. Аликвоту 50 мг олигосахаридного препарата из примера 9 растворяли в 0,8 мл D_2O. Полученный в результате спектр 2D ^{1}H, ^{13}C HSQC анализировали на наличие гликозидной связи между 5-hmf и аномерным углеродом глюкозы со следующими назначениями пиков: ^{1}H-ЯМР: 8=9,39 м.д. (CHO, m); 7,44 м.д. (Ar-H, м); 6,68 м.д. (Ar-H, m); 4,60 м.д. (CH2, m); и ^{13}C-ЯМР: -180,0; 150,6; 126,2; 112,7; 159,9; 64,5. Отсутствие свободного 5-hmf было подтверждено с помощью ВЭЖХ с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1100, оснащенной 3000 мм Bio-Rad Aminex 87H, с использованием 25 мМ водного раствора серной кислоты при изократическом элюировании 0,65 мл/мин и УФ-детекции. 5-hmf определяли количественно по сравнению с аутентичным образцом. Пик 5-hmf не наблюдался в олигосахаридном препарате из примера 9, но наблюдался после низкотемпературного кислотного гидролиза олигосахаридного препарата в условиях, не предполагающих образования свободного 5-hmf в гидролизате. Фиг. 6 представляет иллюстративный 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР-спектр олигосахаридного препарата, который включает субъединицу от карамелизации.

Пример 13. Сравнительный пример.

Коммерческий 5 кДа декстран анализировали с помощью MALDI-MS на присутствие ангидро-сахарных субъединиц. Фиг. 7 иллюстрирует явное присутствие смещенного пика со сдвигом на -18 г/моль от основного пика DP (аддукт Na+ при 851,268 г/моль). В отличие от этого было обнаружено, что образец декстрана практически не содержит ангидро-сахарных субъединиц.

Пример 14. Количественное определение ангидро-DP компонента с помощью ЖХ-МС/МС.

Фракцию DP2 олигосахаридного препарата выделяли путем жидкостной хроматографии. Образцы растворяли в воде и разделяли с использованием колонки Capcell Pak NH_2 (Shiseido; 250×4,6 мм, 5 мкм) при скорости потока 1 мл/мин в изократических условиях вода/ацетонитрил 35/65. В некоторых случаях после хроматографического разделения добавляли 50 мкл 0,05% NH_4OH для усиления ионизации. Содержание ангидро-DP2 определяли путем МС/МС детекции. Для детекции МС использовали зонд ESI в отрицательном режиме, а метод MRM позволял проводить целенаправленный анализ. Фиг. 8A иллюстрирует детекцию олигосахаридного препарата из примера 9 в диапазоне концентраций 1-80 мкг/мл в воде с линейной калибровочной кривой (показанной на фиг. 8B) от площади под хроматограммой ЖХ-МС/МС по концентрации.

Фиг. 33A-33C, 34A-34C, 35A-35C и 36A-36C иллюстрируют присутствие разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2, обнаруженных с помощью ЖХ-МС/МС в олигосахаридном препарате из примера 1, примера 3, примера 4 и пример 7, соответственно.

Пример 15. Приготовление корма, содержащего олигосахаридные препараты.

Рационы домашней птицы и свиней были приготовлены для демонстрации включения олигосахаридных препаратов в рацион. Контрольные корма, демонстрирующие различные составы ингредиентов, и соответствующие обработанные корма, полученные путем обогащения соответствующих контрольных кормов препаратами олигосахаридов из примера 9, были приготовлены следующим образом.

Примерный корм 15.1. Контрольный корм 15.1 (CTR) был приготовлен с использованием 62% кукурузной муки и 32% соевой муки. Обработанный корм 15.1 (TRT) был приготовлен путем добавления в контрольный корм 15.1 (CTR) 500 мг/кг олигосахаридного препарата из примера 9. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был обеспечен в форме порошка путем сушки олигосахарида на молотой рисовой шелухе в качестве носителя и добавления порошка в смеситель с использованием весов для микро-ингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.2. Контрольный корм 15.2 (CTR) был приготовлен с использованием 62% кукурузной муки, 3% соевого концентрата и 26% соевой муки. Обработанный корм 15.2 (TRT) был приготовлен путем добавления в контрольный корм 15.2 (CTR) 500 мг/кг олигосахаридного препарата из примера 9. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был предоставлен в форме порошка путем сушки олигосахарида на молотой рисовой шелухе в качестве носителя и добавления порошка в смеситель с использованием весов для микро-ингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.3. Контрольный корм 15,3 (CTR) был приготовлен с использованием 52% кукурузной муки, 6% кукурузного крахмала, 5% концентрата соевых бобов, 26% соевой муки и микро-индикатора оксида титана. Обработанный корм 15.3 (TRT) получали путем добавления в контрольный корм 15.3 (CTR) 500 мг/кг олигосахаридного препарата. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был обеспечен в форме порошка путем сушки олигосахарида на измельченной рисовой шелухе в качестве носителя и добавления порошка в смеситель с использованием весов для микро-ингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.4. Контрольный корм 15.4 (CTR) был приготовлен с использованием 55% ку-

курузной муки и 39% соевой муки. Обработанный корм 15.4 (TRT) получали путем добавления в контрольный корм 15.4 (CTR) 1000 мг/кг олигосахаридного препарата. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был обеспечен в форме порошка путем сушки олигосахарида на измельченной рисовой шелухе в качестве носителя и добавления порошка в смеситель с использованием весов для микроингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.5. Контрольный корм 15.5 (CTR) был приготовлен с использованием 62% кукурузной муки, 3% соевого концентрата и 26% соевой муки. Обработанный корм 15.5 (TRT) был приготовлен путем добавления в контрольный корм 15.5 (CTR) 500 мг/кг олигосахаридного препарата из примера 9. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был обеспечен в форме порошка, с добавлением порошка в миксер с использованием весов для микро-ингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.6. Контрольный корм 15.6 (CTR) представлял собой коммерческий кукурузно-соевый стартовый корм для птицы из США. Обработанный корм 15.6 (TRT) представлял собой коммерческий стартовый корм для птицы из кукурузы и сои в США, содержащий 500 ч/млн. олигосахаридного препарата. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был обеспечен в форме порошка, и порошок добавляли в смеситель с использованием весов для микро-ингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.7. Контрольный корм 15.7 (CTR) представлял собой исследуемый кукурузно-соевый корм для птицы со следующим составом рациона: кукурузная мука 62,39%, соевая мука 31,80%, карбонат кальция 0,15%, дикальций-фосфат 2,2%, хлорид натрия 0,15%, DL-метионин 0,15%, L-лизин 0,10%, соевое масло 2,00%, витаминно-минеральный премикс 1,00% и кокцидиостатик 0,06%. Обработанный корм 15.7 (TRT) получали путем добавления в контрольный корм 15.7 (CTR) 1000 ч/млн. олигосахаридного препарата из примера 9.1. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат обеспечивали в виде 60% сиропа в воде и наносили путем распыления сиропа на корм после гранулирования.

Примерный корм 15.8. Контрольный корм 15.8 (CTR) представлял собой исследуемый кукурузно-соевый корм для домашней птицы со следующим составом: пшеничная мука 48,45%, соевая мука 32,00%, рожь 12%, карбонат кальция 0,20%, бикальций-фосфат 2,00%, хлорид натрия 0,20%, DL-метионин 0,15%, соевое масло 4,00%, витаминно-минеральный премикс 1,00%. Обработанный корм 15.7 (TRT) получали путем добавления в контрольный корм 15.7 (CTR) 1000 ч/млн. олигосахаридного препарата из примера 9.3. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат обеспечивали в виде 60% сиропа в воде и наносили путем распыления сиропа на корм после гранулирования.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, 15.1-15.6 также содержат стандартные отраслевые уровни жиров, витаминов, минералов, аминокислот, других микроэлементов и кормовых ферментов. В некоторых случаях корма содержали кокцидиостатик, но во всех случаях не содержали антибиотиков - стимуляторов роста. В соответствии со стандартной практикой корма обеспечивали в виде пюре, гранул или крошек.

Пример 16. Экстракция образцов корма.

Рационы, приготовленные в соответствии с процедурами из примера 15, обрабатывали экстракцией. Образцы корма измельчали на мельнице. Готовили навеску из пяти граммов полученного измельченного корма в мерной колбе вместимостью 50 мл и добавляли горячую воду (примерно 80°C). После встряхивания смесь инкубировали на ультразвуковой водяной бане при 80°C в течение 30 мин. После охлаждения раствор центрифугировали в течение 20 мин при 3000 g, и надосадочную жидкость фильтровали через фильтр 1,2 мкм, а затем фильтр 0,45 мкм (и в некоторых случаях фильтр 0,22 мкм). Полученные отфильтрованные растворы упаривали досуха на роторном испарителе.

В некоторых случаях экстракцию проводили с использованием 50 мас.% этанола в воде в качестве альтернативного экстракционного растворителя. В некоторых случаях стадию фильтрации выполняли с использованием мембранного фильтра с отсечкой по молекулярной массе 5000 Дальтон.

Пример 17. Ферментативная обработка кормовых экстрактов.

Кормовые экстракты из примера 16 подвергали одной или нескольким стадиям ферментативного гидролиза для расщепления олигосахаридов, естественно присутствующих в корме. Смесь α-амилазы и амилогликозидаз использовали для расщепления α-(1,4) связей глюко-олигосахаридов и крахмала. Инвертазу и α-галактозидазу использовали для удаления сахарозы, рафинозы и других распространенных сахаридов клетчатки.

Растворы ферментов готовили следующим образом: амилоглюкозидаза (A. niger) 36000 Ед./г, раствор 800 Ед./мл в ацетат-аммонийном буфере (ацетат аммония 0,2 М, pH 5, содержащий 0,5 мМ $MgCl_2$ и 200 мМ $CaCl_2$), α-амилаза (из поджелудочной железы свиньи) 100000 Ед./г, Megazyme: раствор 800 Ед./мл в ацетате аммония, инвертаза из хлебопекарных дрожжей (S. cerevisiae) 300 Ед./мг, Sigma: раствор 600 Ед./мл в ацетат-аммонийном буфере; α-галактозидаза из A. Niger, Megazyme 1000 Ед/мл.

Сухие кормовые экстракты из примера 16 ресуспендировали в 10 мл буфера из ацетата аммония. Добавляли 50 мкл α-амилазы (конечная концентрация 4 Ед./мл), 50 мкл амилоглюкозидазы (конечная концентрация 4 Ед./мл), 50 мкл инвертазы (конечная концентрация 3 Ед./мл). При необходимости добавляли 20 мкл α-галактозидазы (конечная концентрация 2 Ед./мл). Раствор инкубировали 4 ч при 60°C. Затем расщепленный экстракт фильтровали через ультрафильтрационный фильтр (Vivaspin Turbo 4, 5000

MWCO, Sartorius) перед выпариванием досуха в азотной испарительной системе. В вариантах ферментативного расщепления один или несколько из вышеуказанных ферментов использовали в комбинациях, и период расщепления варьировали от 4 ч до расщепления в течение ночи. Концентрации фермента изменяли до двухкратных по сравнению с вышеуказанными загрузками, и процедуру полного ферментативного расщепления повторяли несколько раз подряд на одном и том же корме.

Таблица 5

Список образцов кормов для экстракции и расщепления

Матрикс		**Растворитель для экстракции**	**Фильтрация**	**Ферментативное расщепление**
1	Контрольный корм	Вода	0,22 мкМ	_
2	Ангидро-олигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,22 мкМ	_
3	Контрольный корм	Этанол/Вода 50/50	0,22 мкМ	_
	Ангидро-олигомерный корм 1000 мг/кг	Этанол/Вода 50/50	0,22 мкМ	_
	Ангидро-олигомеры	Вода	0,22 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
	Контрольный корм	Вода	0,22 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
	Ангидро-олигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,22 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
10	Контрольный корм	Этанол/Вода 50/50	0,22 мкМ	_
11	Ангидро-олигомерный корм 1000 мг/кг	Этанол/Вода 50/50	0,22 мкМ	_
12	Ангидро-олигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,45 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
13	Ангидро-олигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,22 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
14	Контрольный стартовый корм A	Вода	0,45 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
15	Ангидро-олигомерный стартовый корм B 2000 мг/кг	Вода	0,45 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
16	Контрольный корм	Вода	0,45 мкМ	a + b + c (4 ч 60°C)
17	Ангидро-олигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,45 мкМ	a + b + c (4 ч 60°C)
18	Рис и спельта/ Ангидро-олигомеры	Вода	0,45 мкМ	_
19	Рис и спельта/ Ангидро-олигомеры	Этанол/Вода 50/50	0,45 мкМ	_

20	Контрольный корм	Вода	0,45 мкМ	a + b + c (4 ч 60°C)
21	Ангидро-олигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,45 мкМ	a + b + c (4 ч 60°C)
22	Ростовой корм C (контроль)	Вода	0,45 мкМ	
23	Ростовой корм D (ангидро-олигомеры 2000 мг/кг)	Вода	0,45 мкМ	
24	Предстартовый корм A (контроль)	Вода	0,45 мкМ	
25	Предстартовый корм D (Ангидро-олигомеры 1000 мг/кг)	Вода	0,45 мкМ	
26	Ростовой корм C (контроль)	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
27	Ростовой корм D (Ангидро-олигомеры 2000 мг/кг)	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
28	Предстартовый корм A (контроль)	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
29	Предстартовый корм D (Ангидро-олигомеры 1000 мг/кг)	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
30	Кукуруза	Вода	0,45 мкМ	_
31	Пшеница	Вода	0,45 мкМ	_
32	Соя	Вода	0,45 мкМ	_
33	Кукуруза	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
34	Пшеница	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
35	Соя	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
41	Контрольный корм	Вода	0,45 мкМ	
42	Ангидро-олигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,45 мкМ	
43	Контрольный корм	Вода	ультра 5000 MWCO	a + b + c X2 (в течение ночи при 60°C)
44	Ангидро-олигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	ультра 5000 MWCO	a + b + c X2 (в течение ночи при 60°C)

Ангидро-олигомеры относятся к олигосахаридам, содержащим ангидро-субъединицы.

Контрольные корма относятся к питательным композициям без добавленных ангидроолигомеров.

Фермент a=амилоглюкозидаза (A. niger) 36000 Ед./г Megazyme.

Фермент b=α-амилаза (из поджелудочной железы свиньи) 100000 Ед./г Megazyme.

Фермент c=инвертаза из пекарских дрожжей (S. cerevisiae) 300 Ед./мг Sigma.

Фермент d=α-галактозидаза из A. niger 620 Ед./г Megazyme.

Пример 18. Детекция олигосахаридных препаратов в корме.

Контрольный и обработанный рационы в соответствии с примером 15 анализировали для детекции отсутствия или наличия олигосахаридных препаратов. После изготовления корма из конечного корма брали пробы массой 1 кг. Содержание экстрагируемых твердых веществ в корме получали путем водной экстракции с использованием процедуры из примера 16. Полученные экстракты анализировали на присутствие ангидро-DP с помощью ЖХ-МС/МС в соответствии с процедурой из примера 14.

Фиг. 9 показывает отсутствие ангидро-DP2 видов в контрольном корме из примеров 15.1 (CTR) - 15.6 (CTR) по сравнению с присутствием ангидро-DP2 видов в обработанном корме из примеров 15.1 (TRT) - 15.6 (TRT). Интеграцию полученных хроматограмм ЖХ-МС/МС использовали для определения присутствия олигосахаридных композиций из примера 9 в конечном сырье. В частности, было определено, что корма содержали соответствующий олигосахаридный препарат, если площадь под пиком ангидро-DP2 превышала предел детекции (или любой другой подходящий порог, установленный в методе).

Пример 19. Количественная оценка олигосахаридных препаратов в кормах.

Контрольный и обработанный рационы согласно примеру 15 анализировали для определения концентрации олигосахаридных препаратов в конечном корме. После изготовления корма из конечного корма брали пробы массой 1 кг. Содержание экстрагируемых твердых веществ в сырье было получено путем водной экстракции с использованием процедуры из примера 16. Полученные экстракты были проанализированы на присутствие ангидро-DP с помощью ЖХ-МС/МС в соответствии с процедурой из примера 14, и площади пика ангидро-DP2 сравнивали со стандартной калибровочной кривой для определения концентрации олигосахаридного препарата в корме (табл. 6).

Таблица 6

Концентрация олигосахаридного препарата в корме

Корм	Содержание олигосахаридов (ч./млн.) в контрольном корме	Содержание олигосахаридов (ч./млн.) в обработанном корме
Пример 15.1	Не обнаружено	1642
Пример 15.2	Не обнаружено	953
Пример 15.3	Не обнаружено	1912
Пример 15.4	Не обнаружено	549
Пример 15.5	Не обнаружено	406
Пример 15.6	Следовое количество	401

Пример 20. ЯМР-характеристика глюко-олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы.

Глюко-олигосахаридные препараты, содержащие ангидро-субъединицы, характеризовали по (i) степени полимеризации и (ii) распределению гликозидных связей из глюкозных единиц.

Относительную молярную распространенность α-(1,1)-α, α-(1,1)-β, β-(1,1)-β, α-(1,2), β-(1,2), α-(1,3), β-(1,3), α-(1,4), β-(1,4), α-(1,6), и β-(1,6) связей идентифицировали методом ЯМР-спектроскопии. Химические сдвиги ^{1}H- ЯМР для аномерных протонов определяли следующим образом: рассматривали область d=4,5-5,5 м.д. с резонансами от C-2 до C-6 ковалентно связанных кластеров при ~d 3,2 и 3,9 м.д. Из-за связи с атомом H в C-2, аномерный протон появляется как дублет, и аксиальное положение проявляется в более высоком поле, чем экваториальное положение. Конформация сахара была выяснена из константы связывания соседних протонов: экваториально-экваториальной, экваториально-аксиальной (малые константы связывания) или аксиально-аксиальной (большие константы связывания).

Выяснение гликозидных связей также осуществляли с помощью ^{13}C ЯМР. Первичные, вторичные, третичные и четвертичные атомы углерода различаются по протонной нерезонансной развязке или переносу поляризации. Углероды, присоединенные к метоксигруппам, резонируют в более низком поле, чем соответствующие атомы углерода со свободными гидроксигруппами, а кольцевые атомы углерода с аксиальными гидроксигруппами обычно поглощают в более высоком поле, чем соответствующие атомы углерода с экваториальными гидроксигруппами. Таким образом, следуя этим рекомендациям и сравнивая с описанными в литературе химическими сдвигами для ^{1}H и ^{13}C аналогичных сахаров, было определено назначение большинства сигналов.

Для определения распределения связывания использовали J-RES и ^{1}H, ^{13}C-HSQC. Для некоторых образцов метод HSQC показал превосходные характеристики. Для каждого анализа приблизительно 50 мг лиофилизированного продукта растворяли в D_2O и переносили в 5-миллиметровую пробирку для ЯМР. Любой остаточный катализатор или твердые вещества удаляли фильтрацией. ЯМР-эксперименты проводили на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III, работающем на протонах 600 МГц, соответствующем частоте Лармора углерода 150 МГц. Инструмент был снабжен криогенно охлаждаемым датчиком TCI размером 5 мм. Все эксперименты проводили при 298 K. Спектры ^{1}H-ЯМР регистрировали и калибровали в дейтерированной воде (4,75 ч/млн). Спектры ^{13}C-ЯМР калибровали ацетоном (30,9 ч/млн). Данные были получены с помощью TopSpin 3.5 и обработаны с помощью ACD/Labs на персональном компьютере.

Фиг. 10 представляет типичный 2D-1H JRES ЯМР спектр образца глюко-олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, с предварительным насыщением растворителем. Назначения различных гликозидных связей выполнены в соответствии с табл. 7.

Таблица 7

Относительная молярная распространенность гликозидных связей в образце глюко-олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы (метод 2D-1H JRES ЯМР)

Связь	Относительная молярная распространенность, тестированная в лаборатории I	Относительная молярная распространенность, тестированная в лаборатории II
α(1,2)	10,1%	9,2%
α(1,4)	2,0%	17,0%
α(1,3)	4,5%	1,3%
α(1,6)	28,9%	33,6%
β(1,2)	5,7%	6,5%
β(1,3)	13,3%	6,3%
β(1,4)	17,9%	10,7%
β(1,6)	18,9%	14,5%

Как показано в табл. 7, для некоторых образцов наблюдались расхождения между экспериментами, выполненными в разных лабораториях с использованием разных инструментов для анализа 2D-1H JRES ЯМР.

Фиг. 11 показывает типичный спектр ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР образца глюкоолигосахаридов, содержа-

щих ангидро-субъединицы, с соответствующими резонансами и назначениями, используемыми для распределения связей. Напротив, определение с помощью ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР оказалось согласованным между двумя разными лабораториями и инструментами, как показано в табл. 8.

Таблица 8

Относительная молярная распространенность гликозидных связей в четырех образцах глюко-олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы (метод ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР)

Связь	Образец 1		Образец 2		Образец 3		Образец 4	
	Лаб I	Лаб II	Лаб I	Лаб II	Лаб I	Лаб II	Лаб I	Лаб II
α(1,2)	9,2%	9,2%	9,0%	9,5%	9,1%	9,9%	9,1%	-
α(1,4)	1,4%	1,3%	1,2%	1,3%	1,3%	1,3%	0,0%	-
α(1,3)	17,7%	17,0%	17%	17,7%	17,5%	16,7%	21,9%	-
α(1,6)	33,9%	33,6%	33,6%	30,9%	36,0%	31,6%	34,4%	-
β(1,2)	5,7%	6,5%	5,7%	7,6%	5,2%	7,6%	5,2%	-
β(1,3)	4,1%	6,3%	4,2%	6,2%	4,4%	6,1%	5,6%	-
β(1,4)	8,5%	10,7%	8,9%	10,7%	7,6%	10,7%	8,3%	-
β(1,6)	12,3%	14,5%	12,6%	11,6%	11,7%	11,6%	11,0%	-

Диффузионно-упорядоченную ЯМР-спектроскопию (DOSY) выполняли для разделения сигналов ЯМР различных видов в соответствии с коэффициентом диффузии и, следовательно, MW. Сигналы в верхней части спектров DOSY на фиг. 12 соответствуют видам с высоким значением DP, а виды с более низким значением DP показаны ниже. Фиг. 12 иллюстрирует наложение спектров ^{1}H DOSY трех олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в табл. 8.

Пример 21. Полупрепаративное выделение фракций DP1 и DP2.

Препаративное выделение фракции DP1 проводили посредством препаративной ВЭЖХ с использованием колонки Waters BEH Amide 19×150 мм. Для подвижной фазы использовали воду в качестве растворителя A и ацетонитрил в качестве растворителя B, где каждый растворитель содержал 0,1% аммиака. Применяемый градиент показан в табл. 19. Собранные фракции DP1 от 8 разделений объединяли, сушили и повторно растворяли в D_2O для ЯМР-анализа, как описано выше.

Для характеристики фракции DP2 проводили двухэтапную очистку Первый этап проводили в системе флэш-хроматографии, с применением ELSD (детектора испарительного светорассеяния). 2 мл (2,65 г) олигосахаридного препарата разбавляли в 1 мл ДМСО, 0,5 мл воды и 0,5 мл ацетонитрила. Раствор перемешивали и обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин. 1 мл раствора вводили на колонку YMC DispoPackAT, NH_2, сферические гранулы, 25 мкм, 120 г. Олигосахаридный препарат разделяли с применением изократического градиентного метода с 75% ацетонитрилом в воде при скорости 40 мл/мин. Полученную фракцию DP2 сушили азотом и повторно растворяли в ДМС/воде (80:20, о/о).

Для 2 этапа очистки использовали аналитическую систему УВЭЖХ с колонкой YMC NH_2 4,6×250 мм (5 мкм) при 40°C. Фракцию DP2 очищали с изократическим градиентом (табл. 10) и скоростью потока 1 мл/мин. Использовали деление потока 1:5 после колонки для запуска сбора посредством ELSD. Фракцию DP2 от 12 сеансов хроматографии собирали, удаляли ацетонитрил нагретым азотом, а остаточную воду путем лиофилизации. Сухую фракцию повторно растворяли для последующего анализа ЖХ-МС/МС и ЯМР.

Таблица 9

Градиентный метод

Время (мин)	**Скорость потока (мл/мин)**	**Растворитель A**	**Растворитель B**
0	25	10	90
2,5	25	10	90
23	25	25	75
23,1	25	10	90
47	25	10	90

Таблица 10

Изократический метод

Время (мин)	**Скорость потока (мл/мин)**	**Вода (%)**	**Ацетонитрил (%)**
0	1	25	75
15	1	25	75

Пример 22. Синтез олигосахаридного препарата с монотонно убывающим распределением DP.

330 г D-глюкозы моногидрата и 0,3 г (+)-камфор-10-сульфоновой кислоты добавляли в трехгорлую колбу вместимостью 1 л с механическим перемешиванием, обеспечиваемым подвесным механическим смесителем с высоким крутящим моментом, соединенным через гибкий соединитель. Колба была закреплена внутри полусферического электронагревательного кожуха, управляемого устройством контроля температуры через стержневую термопару, введенную в реакционную смесь. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько мм над смеси-

тельным элементом. Колба была оборудована обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, температуру которой поддерживали ниже 4°C с помощью охлаждающей бани с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об/мин. Когда температура реакции повышалась до 120-130°C, аппарат переключали с обратного холодильника на дистилляционную конфигурацию с круглодонной приемной колбой, помещенной в ледяную баню. Реакцию поддерживали при 130°C со скоростью перемешивания 120 об/мин в течение 60 мин, и массу конденсата, собранного в собирающей колбе, регистрировали по времени с 10-минутными интервалами. Реакцию останавливали добавлением дистиллированной воды и прекращением нагревания. После охлаждения смеси продуктов до комнатной температуры аликвоту сиропа продукта разбавляли примерно до 1° Брикса, при определении по показателю преломления. Разбавленную аликвоту подвергали микрофильтрации с использованием шприц-фильтра 0,2 микрон и анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии ВЭЖХ (SEC). SEC-анализ выполняли на ВЭЖХ Agilent серии 1100 с определением показателя преломления с использованием колонки Agilent PL aquagel-OH 20 при 40°C с дистиллированной водой в качестве подвижной фазы со скоростью 0,45 мл/мин. Калибровку времени удерживания по MW проводили с использованием стандартных растворов с известной молекулярной массой. Константа равновесия DP была определена как K=3,3, и было обнаружено, что распределение DP монотонно убывает. Фиг. 15 и фиг. 16 иллюстрируют форму распределения DP различных олигосахаридных препаратов из примера 9, при определении с помощью ВЭЖХ-SEC.

Пример 23. Синтез олигосахаридного препарата с не-монотонным распределением DP.

330 г D-глюкозы моногидрата и 0,3 г (+)-камфор-10-сульфоновой кислоты добавляли в трехгорлую колбу вместимостью 1 л с механическим перемешиванием, обеспечиваемым подвесным механическим смесителем с высоким крутящим моментом, прикрепленным через гибкий соединитель. Колба была закреплена внутри полусферического электронагревательного кожуха, управляемого устройством контроля температуры через стержневую термопару, введенную в реакционную смесь. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько мм над смесительным элементом. Колба была оборудована обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, температуру которой поддерживали ниже 4°C с помощью охлаждающей бани с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 135°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об/мин. Когда температура реакции повышалась до 130°C, аппарат переключали с обратного холодильника на дистилляционную конфигурацию с круглодонной собирающей колбой, помещенной в ледяную баню. Реакцию поддерживали при 135°C при перемешивании при 120 об/мин в течение 35 мин. Реакцию останавливали добавлением дистиллированной воды и прекращением нагревания. После охлаждения смеси продуктов до комнатной температуры аликвоту сиропа продукта разбавляли примерно до 1° Брикса, как было определено по показателю преломления. Разбавленную аликвоту подвергали микрофильтрации с использованием шприц-фильтра 0,2 микрон и анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии ВЭЖХ (SEC). SEC-анализ выполняли на ВЭЖХ Agilent серии 1100 с определением показателя преломления с использованием колонки Agilent PL aquagel-OH 20 при 40°C с дистиллированной водой в качестве подвижной фазы со скоростью 0,45 мл/мин. Калибровку времени удерживания по MW проводили с использованием стандартных растворов с известной молекулярной массой. Распределение DP оказалось не-монотонно убывающим. Фиг. 16 показывает, что содержание DP3 больше, чем содержание DP2, и что содержание DP4 и DP5 по существу равно.

Пример 24. Периодический синтез с подпиткой олигосахаридного препарата.

330 г D-глюкозы моногидрата и 0,3 г 2-пиридинсульфоновой кислоты добавляли в литровую трехгорлую колбу с механическим перемешиванием, обеспечиваемым подвесным механическим смесителем с высоким крутящим моментом, прикрепленным через гибкий соединитель. Колба была закреплена внутри полусферического электронагревательного кожуха, управляемого устройством контроля температуры через стержневую термопару, введенную в реакционную смесь. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько мм над смесительным элементом. Колба была оборудована обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, температуру которой поддерживали ниже 4°C с помощью охлаждающей бани с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об/мин. Когда температура реакции повышалась до 120-130°C, аппарат переключали с обратного холодильника на дистилляционную конфигурацию с круглодонной собирающей колбой, помещенной в ледяную баню. Реакцию поддерживали при 130°C со скоростью 120 об/мин, и массу конденсата, собранного в приемной колбе, регистрировали по времени с 20-минутными интервалами. Через 210 мин к реакционной смеси добавляли еще 110 г D-глюкозы моногидрата. Через 420 мин реакцию останавливали добавлением дистиллированной воды и прекращением нагревания. После охлаждения смеси продуктов до комнатной температуры аликвоту сиропа продукта разбавляли примерно до 1° Брикса, при определении по показателю преломления. Разбавленную аликвоту подвергали микрофильтрации с использованием шприц-фильтра 0,2 микрон и анализировали с помощью эксклюзионной

хроматографии ВЭЖХ (SEC). SEC-анализ выполняли на ВЭЖХ Agilent 1100 с определением показателя преломления с использованием колонки Agilent PL aquagel-OH 20 при 40°C с дистиллированной водой в качестве подвижной фазы со скоростью 0,45 мл/мин. Калибровку времени удерживания по MW проводили с использованием стандартных растворов с известной молекулярной массой. Константа равновесия DP была определена как K=0,8, и было обнаружено, что распределение DP монотонно снижается.

Пример 25. Показатели роста коммерческих цыплят-бройлеров, получавших олигосахаридный препарат.

Цыплят-бройлеров выращивали на рационах из примера 15.6, чтобы определить влияние олигосахаридного препарата на показатели роста животных. В частности, коммерческие корма для птицы из кукурузной и соевой муки, содержащие раствор остатка после ферментации зерна (DDGS), кокцидиостатик и стандартную смесь питательных микроэлементов, производили в соответствии с отраслевыми практиками и трехфазной программой кормления. Путем предварительного анализа составы кормов были определены, как показано в табл. 11.

Таблица 11

Питательная композиция

Компонент	Стартовый корм	Ростовой корм	Корм для отвыкания	Метод
Влажность	13,0%	13,0%	12,9%	AOAC 930,15 (вытяжная печь)
Неочищенный белок (CP)	24,1%	21,5%	19,6%	AOAC 992,15; AOAC 990,03
Жир (EE)	3,2%	3,8%	3,9%	AOAC 920,39 (экстракция эфиром)
Неочищенные волокна (CF)	2,7%	2,4%	2,4%	AOAC 962,09 (гидролиз)
Минеральный остаток (AR)	5,2%	4,3%	4,3%	AOAC 942,05 (муфельная печь)
NFE, по разнице	51,9%	55,1%	56,9%	Рассчитано: 1-CP-EE-CF-AR
Всего	100,0%	100,0%	100,0%	

Контрольный (CTR) и обработанный (TRT) рационы готовили для каждой фазы, как описано в примере 15.6, где обработанные рационы готовили путем обогащения контрольного рациона одним фунтом на обработанную американскую тонну с использованием олигосахаридного препарата из примера 9.7. Всего было изготовлено примерно 50 американских тонн каждого рациона.

Цыплят Hubbard M99×Cobb 500 в день вывода получали из коммерческого инкубатория и случайным образом размещали в загоны 36 футов×40 футов, построенные в туннельно вентилируемом птичнике с земляным полом. Всего было размещено примерно 30000 птиц, причем в каждом загоне было одинаковое количество птиц. Подстилка в помещении состояла из насыпной подстилки, засыпанной свежей древесной стружкой. Использовали стандартную коммерческую программу по окружающей среде и освещению. Животных и жилые помещения проверяли ежедневно, включая регистрацию общего состояния здоровья, потребления корма, подачи воды и температуры в помещении. Летальные исходы регистрировали ежедневно.

Птиц в загонах с нечетными номерами кормили обработанным рационом (т.е. содержащим кормовую добавку в количестве 2 фунта/т), а птицы в загонах с четными номерами получали контрольный рацион. Все рационы обеспечивали без ограничения через автоматические кормушки в каждом загоне и загрузочные лотки с первого по 7-й день. Воду подавали без ограничения из ниппельной линии поения.

Стартовая фаза проходила с 0 дня по 13 день, фаза выращивания с 14 дня по 27 день и фаза прекращения выращивания с 28 дня до конца исследования, день 31. Вес птицы в загоне регистрировали по дням 0 и 31. Для каждого загона регистрировали общую массу израсходованного корма. Затем для каждого загона определяли прибавку в весе и FCR в соответствии со стандартной отраслевой практикой.

На 31 день из каждого загона случайным образом выбирали шесть самцов птиц для отбора проб крови и слепой кишки. Регистрировали живую массу каждой отобранной птицы. Образец крови собирали путем прокола крыла в пробирки Vacutainer и замораживали после коагуляции и отделения сыворотки. Затем каждую отобранную птицу умерщвляли путем цервикальной дислокации с последующим извлечением слепой кишки стандартными ветеринарными методами. После рассечения содержимое слепой кишки переносили в конические пробирки на 15 мл, регистрировали массу содержимого слепой кишки, и содержимое мгновенно замораживали до -80°C.

Исходя из массы отобранных птиц, экспериментальная группа показала увеличение на 11 пунктов по массе тела, значимое при $P<0,05$ (по ANOVA).

Пример 26. Секвенирование микробиоты слепой кишки птицы методом дробовика.

Относительная численность идентифицированных таксонов была определена для 96 отобранных птиц, взятых из исследования примера 25. Для каждого образца микробиоты, полученного в примере 25,

содержимое слепой кишки размораживали и экстрагировали ДНК с использованием стандартных методов. Экстрагированную ДНК анализировали на приборе Illumina HiSeq-X со считыванием 2×150 пар оснований. Для обработки исходных данных секвенирования были выполнены стандартные анализы, в том числе: обрезка (адаптер, BBDuk), энтропийная фильтрация (k=5, окно=20, мин=50, BBDuk), качественная фильтрация (среднее значение Q20, BBDuk), фильтрация Gallus (Bowtie2). Таксономические назначения были определены по базе данных MetaPhlAn2 (db_v20).

Пример 27. Микробная конверсия непереваренного корма и олигосахаридных препаратов.

Влияние олигосахаридных препаратов на профиль метаболитов, продуцируемых микробной ферментацией непереваренного корма, оценивали ex vivo на микробиоте слепой кишки домашней птицы, полученной от отобранных птиц из примера 25.

Аликвоты тестируемых олигосахаридных препаратов разбавляли до 20 мас.% олигосахарида в воде, подвергали микрофильтрации через шприц-фильтр с размером пор 0,22 мкм и дегазировали в анаэробных условиях. Готовили гидролизат корма для домашней птицы (имитирующий пищеварение слепой кишки) и одновременно стерилизовали его путем суспендирования 10 г образца коммерческого корма для кукурузы и сои для бройлеров в 50 мл воды, с последующей обработкой двумя циклами автоклавирования при 120°C в течение 5 мин, с последующей водной экстракцией и ресуспендированием. Полученный гидролизат корма дегазировали в анаэробных условиях.

Экстрагированные образцы содержимого слепой кишки размораживали в анаэробных условиях и использовали для приготовления 20% суспензии в фосфатно-солевом буфере (ФБР) с pH 7,4, содержащей 15% глицерина. Полученную суспензию содержимого слепой кишки анализировали, чтобы подтвердить, что его филогенетический состав точно соответствует составу первоначально отобранной микробиоты (секвенированной в примере 24). Суспензию содержимого слепой кишки оценивали с помощью анализа 16S рРНК (16Sv4 ПЦР/ секвенирование Illumina MiSeq при 2s250 п.н.) в соответствии со стандартным конвейером 16S рРНК (USEARCH и SILVA(v4) DB) с отсечкой разрежения 12 230 чтений на образец. По количеству типов суспензия содержимого слепой кишки включала примерно 70% Firmicutes, 20% Bacteroidetes, 7% Tenericutes, и остальное в виде Proteobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria и Verrucomicrobia.

При работе в анаэробных условиях, аликвоту суспензии центрифугировали при 2000 g, надосадочную жидкость удаляли пипеткой и осадок ресуспендировали с образованием 1% суспензии содержимого слепой кишки в минимальной ростовой среде, состоящей из стерильной водной смеси 900 мг/л натрия хлорида, 26 мг/л кальция хлорида дигидрата, 20 мг/л магния хлорида гексагидрата, 10 мг/л марганца хлорида тетрагидрата, 40 мг/л аммония сульфата, 4 мг/л железа сульфата гептагидрата, 1 мг/л кобальта хлорида гексагидрата, 300 мг/л двухосновного калия фосфата, 1,5 г/л двухосновного натрия фосфата, 5 г/л натрия бикарбоната, 0,125 мг/л биотина, 1 мг/л пиридоксина, 1 мг/л пантотената, 75 мг/л гистидина, 75 мг/л глицина, 75 мг/л триптофана, 150 мг/л аргинина, 150 мг/л метионина, 150 мг/л треонина, 225 мг/л валина, 225 мг/л изолейцина, 300 мг/л лейцина, 400 мг/л цистеина и 450 мг/л пролина.

Для каждого олигосахаридного препарата в примере 9 аликвоту 25 мкл 20 мас.% раствора олигосахарида, аликвоту 225 мкл гидролизата корма и 250 мкл 1% суспензии содержимого слепой кишки загружали в трех экземплярах в лунки 96 луночного планшета для микротитрования с глубокими лунками (например, планшетов Costar 3958). Каждый планшет содержал набор пустых лунок, приготовленных объединением 25 мкл воды, 225 мкл гидролизата корма и 250 мкл 1% суспензии содержимого слепой кишки. Затем загруженный планшет инкубировали при 37°C в течение 45 ч в анаэробных условиях. После инкубации содержимое лунок переносили в пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл, микроцентрифугировали при 2000 g в течение минимум 5 мин и собирали полученную надосадочную жидкость.

Пример 28. Стимуляция пролиферации бокаловидных клеток олигосахаридными препаратами.

Пролиферацию бокаловидных клеток в присутствии олигосахаридных препаратов из примера 9 оценивали in vitro. Лунки в 96 луночном планшете Falcon засевали 200 мкл ростовой среды и 40000 бокаловидных клеток, и выращивали в течение трех дней. Олигосахаридные препараты из примера 9 тестировали повторно (n=6 лунок на олигосахарид) при концентрации 0,1 мг/мл по сравнению с контролем (только питательная среда). Клетки выдерживали для дифференцировки в течение четырех дней с полной заменой питательной среды через два дня. Затем планшеты промывали фосфатно-солевым буфером (ФБР) и фиксировали, обрабатывая клетки 4% параформальдегидом (Cellomics # 28906, разбавленный 1:4 ФБР) в течение 30 мин. Затем планшеты дважды промывали ФБР и окрашивали муциновым красителем альциановым синим (Abcam ab150662 pH 2,5). Окрашивание проводили путем инкубации клеток в растворе уксусной кислоты в течение 3 мин с последующей инкубацией клеток в растворе альцианового синего в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем промыванием в течение 2 мин водой и двух заключительных промываний дистиллированной водой.

Ядра количественно оценивали окрашиванием красителем Hoechst и автоматической микроскопией (объектив 10×, 49 полей) с размером поля 641×641 микрон. При концентрации 0,1 мг/мл различные препараты олигосахаридов обеспечивали увеличение пролиферации бокаловидных клеток примерно от 1% до 5% (табл. 12).

Таблица 12

Количество бокаловидных клеток

Олигосахаридный препарат	Повышение числа клеток по сравнению с контролем	Р-значение	
Пример 9.1	3,2%	0,003	***
Пример 9.3	2,3%	0,007	***
Пример 9.4	3,1%	0,002	***
Пример 9.5	3,6%	0,001	***
Пример 9.6	2,7%	0,007	***
Пример 9.7	1,2%	0,115	
Пример 9.16	3,5%	0,001	***
Пример 9.17	4,9%	0,001	***

Пример 29. Стимуляция выработки слизи олигосахаридными препаратами.

Влияние олигосахаридных препаратов на продукцию слизи бокаловидными клетками оценивали in vitro. Лунки в 96-луночном планшете Falcon засевали 200 мкл ростовой среды и 40000 бокаловидных клеток, и выращивали в течение трех дней. Олигосахаридные препараты тестировали повторно (n=6 лунок на олигосахарид) путем добавления в среду для роста клеток надосадочной жидкости, полученной ферментацией ex vivo олигосахаридных препаратов в примере 27. Для каждого олигосахаридного препарата соответствующую надосадочную жидкость из примера 27 разбавляли 1:20 питательной средой и подвергали микрофильтрации. Контроль получали разбавлением ферментационной среды 1:20. Клетки выдерживали для дифференцировки в течение четырех дней с полной заменой питательной среды через два дня. Затем планшеты промывали фосфатно-солевым буфером (ФБР) и фиксировали обработкой 4% параформальдегидом (Cellomics # 28906, разбавленным 1:4 ФБР) в течение 30 мин.

Затем планшеты дважды промывали ФБР и окрашивали муциновым красителем альциановым синим (Abcam ab150662 pH 2,5). Окрашивание проводили путем инкубации клеток в растворе уксусной кислоты в течение 3 минут с последующей инкубацией клеток в растворе альцианового синего в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем промыванием в течение 2 мин водой и двумя заключительными промываниями дистиллированной водой. Ядра были количественно определены окрашиванием красителем Hoechst и автоматической микроскопией (объектив 10×, 49 полей) с размером поля 641×641 микрон.

Продукцию муцина определяли количественно по поглощению при 600 нм на ридере планшетов Spectramax. Чтобы учесть различия в количестве клеток между лунками, оптическую плотность нормализовали до ОП600 на 100000 клеток. Наблюдался четкий и статистически значимый эффект в отношении продукции слизи бокаловидными клетками, как показано в табл. 13.

Таблица 13

Продукция слизи

Олигосахаридный препарат	Повышение продукции муцина	SEM	Р-значение	
Пример 9.2	7,9%	0,2%	7,21E-05	***
Пример 9.1	11,1%	0,4%	2,4E-05	***
Пример 9.6	9,1%	0,3%	0,00013	***
Пример 9.4	-0,8%	0,0%	0,561442	
Пример 9.7	9,7%	0,4%	0,000192	***
Пример 9.17	9,0%	0,4%	0,00112	***
Пример 9.5	9,1%	0,3%	2,34E-05	***
Пример 9.3	-4,1%	0,1%	0,002309	***

Пример 30. Стимуляция целостности здорового кишечного барьера.

Действие олигосахаридных препаратов на здоровую барьерную функцию кишечника оценивали in vitro. Клетки Caco-2 совместно культивировали с бокаловидными клетками на полупроницаемой мембране, дифференцировали и затем обрабатывали надосадочной жидкостью микробиома из примера 27, полученной с использованием образцов микробиоты слепой кишки из примера 25. Изменение трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭЭС) проводили относительно контроля. В частности, Caco-2 и бокаловидные клетки высевали на полупроницаемую вставку и помещали в камеру, содержащую подходящую среду для выращивания, как показано на фиг. 18. Клетки выращивали в течение 13 дней для получения дифференцированного монослоя с плотными контактами, что подтверждается выполнением основного измерения ТЭЭС.

Множественные олигосахаридные препараты из примера 9 анализировали с n=6 повторами. Для каждого олигосахаридного препарата соответствующую надосадочную жидкость из примера 27 разбавляли 1:20 средой для выращивания, подвергали микрофильтрации через фильтр 0,2 микрона и наносили

на апикальную сторону камеры. Контроль обеспечивали применением питательной среды в разведении 1:20. Через 24 ч для каждого олигосахаридного препарата проводили измерение ТЭЭС. Для каждого препарата было определено изменение ТЭЭС после обработки по сравнению со значением до обработки. Изменение ТЭЭС для контроля было нормализовано до 100%.

Статистически значимые улучшения барьерной функции здорового кишечника, измеренные с помощью ТЭЭС, наблюдались для некоторых олигосахаридных препаратов. Улучшение ТЭЭС для различных олигосахаридных препаратов варьировало примерно от 0% до 15% относительно контроля. В частности, олигосахаридный препарат из примера 9.2 обеспечил увеличение ТЭЭС на 14% по сравнению с контролем. Результаты представлены в табл. 14.

Таблица 14

Увеличение ТЭЭС по сравнению с контролем для синтетических олигосахаридных препаратов

Олигосахаридный препарат	**Повышение ТЭЭС по сравнению с контролем**
Пример 9.1	8% ± 2%
Пример 9.2	14% ± 1%
Пример 9.3	2% ± 1%
Пример 9.4	9% ± 2%
Пример 9.6	15% ± 1%
Пример 9.7	2% ± 1%

Пример 31. Стимуляция неспецифической иммунной функции.

Действие олигосахаридных препаратов на неспецифический фагоцитоз определяли in vitro. Гранулоциты поросят анализировали с помощью проточной цитометрии на предмет поглощения опсонизированных клеток E. coli в присутствии олигосахаридного препарата из примера 9.3 при двух разностных концентрациях: 1 мг/мл и 2 мг/мл. Количество гранулоцитов с поглощенными патогенами сравнивали с количеством гранулоцитов, которые поглотили патоген, для определения фагоцитарного индекса.

В присутствии 1 мг/мл олигосахаридного препарата из примера 9.3 фагоцитарный индекс был определен как 82, в то время как при концентрации 2 мг/мл фагоцитарный индекс был определен как 106, что отражает увеличение поглощения патогена на 29%. Фиг. 19 представляет собой примерную поточную цитограмму, иллюстрирующую идентификацию гранулоцитов с поглощенными патогенами и без них.

Влияние олигосахаридных препаратов на иммунный и воспалительный ответ определяли in vivo у цыплят-бройлеров, подвергшихся действию обычных патогенов.

Птиц кормили в экспериментальных группах с использованием двух типов фонового рациона, как описано в табл. 15. Рационы, содержащие олигосахаридные препараты, давали в экспериментальных группах, описанных в табл. 16.

Таблица 15

Типы фоновых рационов

Ингредиент	**Тип 1 (масс.%)**	**Тип 2 (масс.%)**
Кукуруза	62,39	-
Соевая мука	31,80	32,00
Пшеница	-	48,45
Кальция карбонат	-	12
Карбонат кальция	0,15	0,20
Дикальция фосфат	2,2	2,00
NaCl	0,15	0,20
DL-метионин	0,15	0,15
L-лизин	0,10	-
Соевое масло	2,00	4,00
Витаминный и минеральный премикс	1,00	1,00
Кокцидиостатик	0,06	-

Таблица 16

Экспериментальные группы

Экспериментальные группы	Фоновый рацион	Олигосахаридный препарат	Доза (ч./млн)
Контроль 1	Тип 1	Нет	
Контроль 2	Тип 2	Нет	
Опыт 1	Тип 2	Пример 9.17	1,000
Опыт 2	Тип 2	Пример 9.6	1,000
Опыт 3	Тип 2	Пример 9.1	1,000
Опыт 4	Тип 2	Пример 9.4	1,000
Опыт 5	Тип 2	Пример 9.8	1,000
Опыт 6	Тип 2	Пример 9.3	1,000

Суточные цыплята-бройлеры Cobb 500 были получены из коммерческого инкубатория. В день прибытия (день -8) цыплят помещали группами по 50 особей на вводный период 8 дней. Во время вводного периода животные получали контрольный рацион. В день 0 животные были разделены по массе на группы по 8 птиц в каждой и получали 10-кратную дозу аттенуированной пероральной кокцидийной вакцины Paracox-5 (MSD Animal Health) (смесь E. acervulina, E. maxima, E. mitis и E. tenella) путем введения через желудочный зонд всем птицам на рационе типа 2. Каждую группу затем помещали в клеточную батарею и случайным образом распределяли по экспериментальным группам, каждая с двумя повторностями на группу.

Животных содержали в помещении с контролируемой средой и температурой, адаптированной к возрасту птиц. Вода и все рационы были предоставлены без ограничений. На 7 и 14 дни птиц из каждой повторности отбирали случайным образом и умерщвляли. Отобранные птицы были немедленно препарированы. Использовали стандартные методики для получения образцов содержимого подвздошной кишки, содержимого слепой кишки, ткани подвздошной кишки и ткани пейеровой бляшки. Образцы ткани анализировали с помощью матрицы ПЦР на экспрессию генов, соответствующих воспалению и цитокинам и хемокинам иммунной системы.

На день 7 экспрессия IL12β, IL18, IFNγ, IL10, IL22, IL1β, IL21 и IL6 в пейеровых бляшках у птиц в контрольной группе 2 (рацион типа 2) увеличилась по меньшей мере в 1,5 раза по сравнению с птицами в контрольной группе 1 (рацион типа 1), как показано на фиг. 20. Илеальная экспрессия IL12β, IFNγ, IL17α, IL16, IL21, IL8L1 и TNFSF13β также увеличивалась по меньшей мере в 1,5 раза в контрольной группе 2. Данные по экспрессии цитокинов и хемокинов свидетельствовали о воспалительном и иммунном ответе у птиц, получавших рацион типа 2, подвергшихся воздействию патогенов Eimeria.

Улучшенный иммунный ответ наблюдался у птиц в опытных группах 3 и 6, которым давали олигосахаридные препараты из примеров 9.1 и 9.3, соответственно. По данным экспрессии цитокинов и хемокинов, на 7-й день наблюдали повышенную активность адаптивной иммунной системы, соответствующую Т-хелперам типа 2, а также стимуляцию гранулоцитов и стволовых клеток. Данные по экспрессии соответствовали повышенной дифференцировке мультипотентных гемопоэтических стволовых клеток в миелоидные клетки-предшественники, повышенной пролиферации гранулоцитов и общей активации Т-клеток, В-клеток и тучных клеток.

К 14 дню данные по экспрессии интерлейкинов свидетельствовали о регуляции иммунной системы и противовоспалительных путей, включая передачу сигнала IL9 от регуляторных Т-клеток и противовоспалительную миокиновую активность IL6. Данные по экспрессии свидетельствовали об усилении адаптивного иммунного ответа на патогены, ассоциированные с рационом 2 типа, с последующим более быстрым возвращением к гомеостазу по сравнению с птицами контрольной группы 2, которые подвергались воздействию патогенного стиммула, но не получали олигосахаридные препараты.

Пример 32. Восстановление нарушенной целостности кишечного барьера.

Множественные олигосахаридные препараты из примера 9 анализировали в n=6 повторностях. Для каждого олигосахаридного препарата соответствующую надосадочную жидкость из примера 27 разбавляли 1:20 средой для выращивания, подвергали микрофильтрации через фильтр 0,2 микрона и наносили на апикальную сторону камеры. Контроль обеспечивали применением питательной среды в разведении 1:20. Через 24 ч для каждого олигосахаридного препарата проводили измерение ТЭЭС. Для каждого было определено изменение ТЭЭС после применения препарата по сравнению с ТЭЭС до применения препарата. Изменение ТЭЭС для контроля было нормализовано до 100%.

Влияние олигосахаридов на барьерную функцию негерметичного кишечника оценивали in vitro. Оценивали как прямое действие самих олигосахаридных препаратов, так и косвенное действие продуктов микробиома, полученных из олигосахаридных препаратов. Caco-2 и бокаловидные клетки высевали на полупроницаемую вставку и вставляли в камеру, содержащую подходящую среду для выращивания, и обрабатывали различными олигосахаридными препаратами из примера 2 или соответствующей надосадочной жидкостью из примера 3. Целостность барьера оценивали с использованием трансэндотелиального электрического сопротивления и путем измерения проницаемости флуоресцентного красителя.

Caco-2 и бокаловидные клетки высевали на полупроницаемую вставку и помещали в камеру, содержащую подходящую среду для выращивания, как показано на фиг. 21. Олигосахаридные препараты, отрицательный контроль, содержащий только среду, и положительный контроль, содержащий только среду, оценивали в n=6 повторностях. Для каждого из них клетки выращивали в течение 13 дней, до получения дифференцированного монослоя. Клетки промывали и проводили измерение ТЭЭС, чтобы установить исходное значение. Контроль был нормализован до 100%.

Множественные олигосахаридные препараты из примера 9 анализировали в n=6 повторностях. Для каждого тестируемого олигосахаридного препарата соответствующий сироп из примера 9 разбавляли до 5% дистиллированной водой, затем дополнительно разбавляли 1:20 дистиллированной водой, подвергали микрофидьтрации через фильтр 0,2 микрона и наносили на апикальную сторону камеры. Для оценки косвенного эффекта для каждого тестируемого олигосахаридного препарата соответствующую надосадочную жидкость из примера 25 разбавляли 1:20 дистиллированной водой, подвергали микрофильтрации через фильтр 0,2 микрона и наносили на апикальную сторону камеры. Контроль обеспечивали применением питательной среды в разведении 1:20.

После определения основного значения ТЭЭС, рамнолипидный апикальный стрессор применяли к апикальной камере для каждого из олигосахаридных препаратов и положительного контроля. Флуоресцентный краситель Lucifer Yellow наносили в апикальную камеру для каждого из олигосахаридных препаратов, положительного контроля и отрицательного контроля. Через три часа в присутствии апикального стрессора и красителя Lucifer Yellow было выполнено второе измерение ТЭЭС для оценки воздействия стрессора на целостность барьера. Проницаемость барьера оценивали путем измерения степени проникновения Lucifer Yellow от апикальной до базолатеральной стороны клеточного слоя и мембраны.

Статистически значимые улучшения нарушенной барьерной функции кишечника, измеренные с помощью ТЭЭС, и проницаемости красителя, наблюдались для некоторых олигосахаридных препаратов. Улучшение ТЭЭС для различных олигосахаридных препаратов варьировало примерно от 0% до 30% относительно контроля. Наблюдались как прямые, так и косвенные эффекты олигосахаридных препаратов.

В частности, олигосахаридный препарат из примера 9.3 обеспечил значительное прямое снижение проницаемости для красителя по сравнению с контролем, в то время как олигосахарид из примера 9.2 обеспечил значительное косвенное снижение проницаемости для красителя по сравнению с контролем. Олигосахарид из примера 9.7 не обеспечил ни прямого, ни косвенного снижения проницаемости для красителя, а прямое нанесение олигосахарида из примера 9.6 усугубило нарушение барьерной функции из-за апикального стрессора.

Пример 33. Мета-анализ исследований показателей живого роста цыплят-бройлеров.

Влияние олигосахаридных препаратов на показатели живого роста коммерческих цыплят-бройлеров оценивали in vivo с помощью серии независимых исследований, проведенных для различных регионов, времен года, типах основного рациона, генетики птиц и методов управления, включая обработку подстилки и программы борьбы с кокцидиозом. В каждом исследовании птиц распределяли по экспериментальным группам, включая одну контрольную группу и одну или несколько опытных групп. Контрольную группу кормили только фоновым рационом. Опытным группам давали фоновый рацион с добавлением определенной дозы олигосахаридных препаратов из примера 9. В отдельные исследования в качестве сравнительного примера была включена коммерческая кормовая добавка, используемая в птицеводстве.

Для каждого исследования птиц содержали в загонах, расположенных в типичном птичнике для бройлеров с определенным количеством (Hd/Rep) птиц в каждом загоне. Статистические повторности осуществляли путем случайного распределения загонов по экспериментальным группам с определенным количеством (Reps/Trt) повторностей на эксперимент. В табл. 17 приведены подробные сведения о протоколах каждого исследования, включенного в анализ.

Таблица 17

Детали протокола для каждого исследования

Исследование	Страна	Сезон	Продолжительность	Тип рациона	Повторность/эксперимент	Количество/повторность	Генетика	Пол	Подстилка	Программа против кокцидиоза
Пр. 36.1	США	Весна	35	Кукуруза/Соя	6	14	Cobb 500	М/Ж	Использ.	Saccox
Пр. 36.2	США	Зима	49	Кукуруза/Соя	12	60	Cobb 500	М/Ж	Использ.	Maxiban
Пр. 36.3	Канада	Зима	35	Кукуруза/Соя	8	60	Ross 708	М	Использ.	Saccox
Пр. 36.4	США	Зима	49	Кукуруза/Соя	12	60	Cobb 500	М/Ж	Использ.	Maxiban
Пр. 36.5	Соед. Королевство	Н/П	Н/П	Пшеница/Соя	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Чистая	Нет
Пр. 36.6	США	Зима	33	Кукуруза/Соя	12	100	Cobb 500	М/Ж	Использ.	Amprol
Пр. 36.7	США	Лето	49	Кукуруза/Соя	12	18	Hubbard M99	М	Использ.	Нет
Пр. 36.8	Канада	Зима	42	Кукуруза/Соя	12	17	Ross308	М	Использ.	Вакцина
Пр. 36.9	Великобритания	Осень	42	Пшеница/Соя	16	35	Ross308	М	Свежая	Нет
Пр. 36.10	Франция	Осень	42	Пшеница/Соя	17	30	Ross308	М	Свежая	Нет
Пр. 36.11	США	Осень	42	Кукуруза/Соя	21	40	Cobb500	М	Использ.	Вакцина
Пр. 36.12	Франция	Лето	36	Кукуруза/Соя	12	18	Cobb500	М	Свежая	Вакцина
Пр. 36.13	Канада	Весна	42	Кукуруза/Соя	10	20	Ross708	М	Использ.	Вакцина
Пр. 36.14	США	Весна	42	Кукуруза/Соя	14	40	Cobb500	М	Использ.	Вакцина
Пр. 36.15	Новая Зеландия	Весна	35	Пшеница/Соя	12	20	Ross308	М	Свежая	Вакцина

Результаты исследования включали вес птицы (BW), потребление корма (FI), коэффициент конверсии корма (FCR), процент смертности (по головам) и долю смертности. Загон был статистической единицей. По возможности применяли пространственную блокировку, а экспериментальные группы случайным образом распределяли по блокам.

Фоновые рационы.

Птицам давали фазы рационов в соответствии с местными промышленными методами в течение общей продолжительности исследования от 35 до 49 дней. Рационы стартовой фазы обычно давали в виде крошки с момента размещения птицы до 15 дня исследования. Все рационы не содержали антибиотиков, стимулирующих рост. Конструкции стартового контрольного рациона описаны в табл. 18 (NA=данные не доступны с сайта).

Таблица 18

Составы стартового контрольного рациона

Исследование	Кукурузная мука, %	Пшеничная мука, %	Соевая мука, %	Раствор остатка после ферментации кукурузы, %	Неочищенный белок	Неочищенный жир	Истинная метаболическая ценность (ккал/кг)	Лизин (SID)	Метионин (SID)
Пр. 36,1	63,5	Н/П	27,4	Н/П	22,1	Н/П	2988	1,35	Н/П
Пр. 36,2	0	Н/П	0	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр. 36,3	63,4	Н/П	28,3	Н/П	20,9	Н/П	2940	1,14	Н/П
Пр. 36,4	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр. 36,5	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр. 36,6	0	Н/П	0	Н/П	Н/П	Н/П	3011	Н/П	Н/П
Пр. 36,7	0	Н/П	0	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр. 36,8	54,52	0	34,38	5	22,23	2,81	2900	1,24	0,63
Пр. 36,9	0	51,78	30,5	0	21,31	5,74	2899	1,251	0,622
Пр. 36,10	0	55,1	28	0	22,49	5,42	2899	1,237	Н/П
Пр. 36,11	58,353	2,377	29,992	5	20,3	Н/П	2900	1,33	Н/П
Пр. 36,12	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	22	Н/П	3011	Н/П	Н/П
Пр. 36,13	56,08	0	34,1	5	22,23	2,31	2900	1,24	0,63
Пр. 36,14	58,353	0	29,992	5	20,3	Н/П	2900	1,33	Н/П
Пр. 36,15	0	54,92	28,31	5	Н/П	6,9	2900	1,24	Н/П

Рационы в ростовой фазе были предоставлены в виде гранул с 16 по 24 день. Составы контрольных ростовых рационов подробно описаны в табл. 19 (Н/П=данные не доступны с сайта).

Таблица 19

Составы контрольного рациона для ростовой фазы

Исследование	Кукурузная мука, %	Пшеничная мука, %	Соевая мука, %	Раствор остатка после ферментации кукурузы, %	Неочищенный белок	Неочищенный жир	Истинная метаболическая ценность (ккал/кг)	Лизин (SID)	Метионин (SID)
Пр.36.1	68,6	Н/П	22	Н/П	19,95	Н/П	3059	1,2	Н/П
Пр.36.2	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр.36.3	65,6	Н/П	26,3	Н/П	19,9	Н/П	2988	1,06	Н/П
Пр.36.4	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П

Пр.36.5	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр.36.6	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	3102	Н/П	Н/П
Пр.36.7	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр.36.8	54,95	0	28,31	10	20,8	3,88	3000	1,11	0,56
Пр.36.9	0	57,135	26	0	19,01	6,55	2997	1,08	0,533
Пр.36.10	0	55,77	24	0	20,94	7,4	2998	1,11	Н/П
Пр.36.11	65,383	0,344	20,404	10	17,5	Н/П	3040	1,33	Н/П
Пр.36.12	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	19	Н/П	3035	Н/П	Н/П
Пр.36.13	56,53	0	28,02	10	20,8	3,39	3000	1,11	0,56
Пр.36.14	65,383	0	20,404	5	17,5	Н/П	3040	1,14	Н/П
Пр.36.15	0	57,3	23,05	6	Н/П	6,27	3000	1,11	Н/П

Рационы в завершающей фазе предоставляли в виде гранул с 16 по 24 день. Составы контрольных рационов завершающей фазы подробно описаны в табл. 20 (Н/П=данные недоступны с сайта).

Таблица 20

Составы контрольного рациона завершающей фазы

Исследование	Кукурузная мука, %	Пшеничная мука, %	Соевая мука, %	Раствор остатка после ферментации кукурузы, %	Неочищенный белок	Неочищенный жир	Истинная метаболическая ценность (ккал/кг)	Лизин (SID)	Метионин (SID)
Пр. 36.1	74,3	Н/П	27,4	Н/П	Н/П	Н/П	3155	1,06	Н/П
Пр. 36.2	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр. 36.3	70,8	Н/П	28,3	Н/П	Н/П	Н/П	3059	0,94	Н/П
Пр. 36.4	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр. 36.5	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр. 36.6	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	3203	Н/П	Н/П
Пр. 36.7	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр. 36.8	57,37	0	24,85	10	19,4	5,16	3100	1,03	0,55
Пр. 36.9	0	59,94	23	0	17,53	7,71	3097	1,003	0,503
Пр. 36.10	0	87,67	21	0	19,53	8,88	3099	0,994	Н/П
Пр. 36.11	69,41	0,12	16,879	10	16	Н/П	3084	1,01	Н/П
Пр. 36.12	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Пр. 36.13	58,95	0	24,56	10	19,4	4,66	3100	1,03	0,55
Пр. 36.14	69,41	0	16,879	5	16	Н/П	3084	1,01	Н/П
Пр. 36.15	0	62,02	17,62	6	Н/П	7,25	3100	0,99	Н/П

Экспериментальные группы.

Для каждого исследования экспериментальные группы были созданы для сравнения эффекта олигосахаридных препаратов с контрольным рационом. Для избранных исследований экспериментальные группы были созданы для оценки кривой доза-ответ для олигосахаридных препаратов. Обработанные рационы получали смешиванием достаточного количества соответствующего олигосахаридного препарата из примера 9 таким образом, чтобы конечное содержание олигосахаридов достигало заданной дозы (единиц ч/млн в пересчете на сухие твердые вещества). В отдельных исследованиях сравнительный пример (сравн. пр. 36) был предоставлен коммерческим цельнодрожжевым продуктом (Diamond V XPC Original). Эксперимент осуществляли в соответствии с табл. 21.

Таблица 21

Распределение экспериментальных групп

Исследование	Экспериментальная группа 1	Экспериментальная группа 2	Экспериментальная группа 3	Экспериментальная группа 4	Экспериментальная группа 5	Экспериментальная группа 6	Экспериментальная группа 7
Пр. 36.1	Контроль	Пр. 9.7 (500 ч./млн)					
Пр. 36.2	Контроль	Пр. 9.7 (500 ч./млн)					
Пр. 36.3	Контроль	Пр. 9.7 (500 ч./млн)					
Пр. 36.4	Контроль	Пр. 9.7 (500 ч./млн)					
Пр. 36.5	Контроль	Пр. 9.7 (100 ч./млн)	Пр. 9.7 (500 ч./млн)	Сравн. Пр.36 (1500 ч./млн)			
Пр. 36.6	Контроль	Пр. 9.7 (500 ч./млн)					
Пр. 36.7	Контроль	Пр. 9.7 (500 ч./млн)					
Пр. 36.8	Контроль	Пр. 9.7 (500 ч./млн)	Пр. 9.3 (500 ч./млн)				
Пр. 36.9	Контроль	Пр. 9.7 (500 ч./млн)					
Пр. 36.10	Контроль	Пр. 9.7 (500 ч./млн)	Пр. 9.2 (500 ч./млн)	Пр. 9.3 (500 ч./млн)	Сравн. Пр. 36 (1250 ч./млн)		
Пр. 36.11	Контроль	Пр. 9.7 (500 ч./млн)	Пр. 9.2 (500 ч./млн)	Пр. 9.3 (500 ч./млн)	Пр. 9.4 (500 ч./млн)	Пр. 9.5 (500 ч./млн)	Сравн. Пр. 36 (1250 ч./млн)
Пр. 36.12	Контроль	Пр. 9.7 (500 ч./млн)	Пр. 9.3 (500 ч./млн)				
Пр. 36.13	Контроль	Пр. 9.2 (100 ч./млн)	Пр. 9.2 (250 ч./млн)	Пр. 9.2 (500 ч./млн)	Пр. 9.2 (750 ч./млн)	Пр. 9.2 (1000 ч./млн)	
Пр. 36.14	Контроль	Пр. 9.3 (100 ч./млн)	Пр. 9.3 (250 ч./млн)	Пр. 9.3 (500 ч./млн)	Пр. 9.3 (750 ч./млн)	Пр. 9.3 (1000 ч./млн)	Пр. 9.7 (500 ч./млн)
	(continued, 8 – 13)	Пр. 9.2 (100 ч./млн)	Пр. 9.2 (250 ч./млн)	Пр. 9.2 (500 ч./млн)	Пр. 9.2 (750 ч./млн)	Пр. 9.2 (1000 ч./млн)	Сравн. Пр. 36 (1250 ч./млн)
Пр. 36.15	Контроль	Пр. 9.2 (100 ч./млн)	Пр. 9.2 (250 ч./млн)	Пр. 9.2 (500 ч./млн)	Пр. 9.3 (100 ч./млн)	Пр. 9.3 (250 ч./млн)	Пр. 9.3 (500 ч./млн)

Стандартное оборудование и способы, известные в данной области техники, были использованы для приготовления как фонового, так и обработанного рациона. Для обработанных рационов олигосахаридные препараты и сравнительные продукты были приготовлены поверх фонового рациона и добавлены в смеситель для предварительного гранулирования. Включение олигосахаридов подтверждали анализом кормления.

Фаза живого роста и отбор образцов.

Корм и воду предоставляли без ограничений. Программы коммерческого освещения и температуры были реализованы в каждом исследовании в соответствии с местной отраслевой практикой соответствующего региона. Загоны проверяли ежедневно, и количество и процент любых смертей регистрировали в журнале исследования. Ветеринарного вмешательства не потребовалось.

Для каждой фазы рациона измеряли общий привес в загоне, начальное и конечное количество птиц и общее потребление корма для каждого загона. Для каждого загона рассчитывали средний вес птицы (BW) путем деления общего веса в загоне на количество птиц в загоне во время взвешивания. Для каждого загона коэффициент конверсии корма (FCR) был рассчитан путем деления общего потребления

корма за интервал на общий привес соответствующего загона. FCR были скорректированы с учетом смертности (FCRma) путем добавления общего процента смертности за период. Чтобы учесть различия в весе пера, FCRma корректировали с учетом общей массы тела, чтобы получить скорректированный FCR (cFCR) для каждого загона с использованием методов, известных в данной области техники. Поправочный коэффициент определяли для различной генетики птиц с использованием опубликованных целевых показателей BW и FCR в зависимости от дня роста для соответствующей генетики.

В выбранных исследованиях случайным образом отбирали по одной птице из каждого загона для отбора проб либо на 15 день, либо в последний день исследования. Для каждой отобранной птицы из вены крыла отбирали 5 мл крови в вакуумные контейнеры для сыворотки. После коагуляции сыворотку отделяли центрифугированием, извлекали и замораживали на сухом льду для последующей обработки. Затем каждую отобранную птицу подвергали эвтаназии в соответствии с местными этическими процедурами и вскрывали. Содержимое слепой кишки отбирали в конические пробирки объемом 5 мл и немедленно замораживали для секвенирования всего генома микробиома и метаболомики слепой кишки. Выполняли небольшую резекцию ткани подвздошной кишки, ткань обрабатывали для дезактивации РНК и замораживали для последующего анализа экспрессии генов.

Пример 34. Мета-анализ исследования.

Статистический мета-анализ исследований in vivo из примера 36 был выполнен для оценки влияния олигосахаридных кормовых добавок и сравнительных продуктов на продуктивность птицы по сравнению с птицами, получавшими контрольные рационы. В анализе использовали смешанную линейную модель с экспериментальной группой в качестве фиксированного эффекта и случайными эффектами для исследования, вложенного в блок. Статистический анализ проводили в R версии 3.4.4 (2018-03-15). Результаты оценивали методом наименьших квадратов со статистической значимостью $P<0,05$. Попарные сравнения проводили по методу Тьюки с присвоением буквенных обозначений: a, b, c, d,... Обработки без общей буквы в их группировке по Тьюки значительно различались при попарном сравнении при $P<0,05$.

Коэффициент конверсии корма.

Эффекты исследования для cFCR были значительными при $P<0,05$. Обработка олигосахаридами обеспечила улучшение cFCR по меньшей мере на 2,7% при включении 500 ч/млн против контрольного рациона, по сравнению со сравнительным примером, который обеспечил улучшение cFCR на 2,2 единиц при включении 1250 ч/млн. Олигосахарид из примера 9.4 обеспечил улучшение cFCR на 6,4 единиц при включении 500 ч/млн. Результаты мета-анализа для cFCR представлены в табл. 22.

Таблица 22

Мета-анализ cFCR

Экспериментальная группа	**cFCR (ls среднее)**	**SE**	**df**	**Группировка по Тьюки**	**D cFCR (по сравнению с контролем)**
Контроль	1,6511	0,043	14	d	
Пр. 9.2 (500 ч./млн)	1,6019	0,044	14	a	-4,9
Пр. 9.3 (500 ч./млн)	1,6106	0,044	14	abc	-4,1
Пр. 9.4 (500 ч./млн)	1,5876	0,044	14	a	-6,4
Пр. 9.5 (500 ч./млн)	1,5948	0,044	14	ab	-5,6
Пр. 9.7 (500 ч./млн)	1,6246	0,043	14	bc	-2,7
Сравн. Пр. 36 (1250 ч./млн)	1,6293	0,044	14	c	-2,2

Группы лечения олигосахаридами показали более высокую стабильность эффекта по сравнению со Сравнительным примером 36. Для каждого олигосахарида, включенного в несколько исследований, последовательность его воздействия на cFCR оценивали путем определения доли исследований, в которых наблюдалось данное значение улучшения cFCR по сравнению с контролем. Например, олигосахарид из примера 9.2 при включении 500 ч/млн обеспечивал по меньшей мере 3 единицы улучшения cFCR в 80% исследований, по меньшей мере 4 единицы улучшения cFCR в 60% исследований, по меньшей мере 5 единиц улучшения cFCR в 40% исследований, и по меньшей мере 6 единиц улучшения cFCR в 40% исследований. Сравнительный пример при включении 1250 ч/млн обеспечил улучшение cFCR на 3 единицы только в 25% исследований и не обеспечил улучшения cFCR на 4 единицы или выше ни в одном из исследований.

Таблица 23

Согласованность эффекта экспериментальной группы на cFCR

Экспериментальная группа	1 единица улучшения	2 единицы улучшения	3 единицы улучшения	4 единицы улучшения	5 единиц улучше-ния	6 единиц улучшения
Пр. 9.2 (500 ч./млн)	100%	80%	80%	60%	40%	40%
Пр. 9.3 (500 ч./млн)	100%	83%	67%	67%	50%	33%
Пр. 9.7 (500 ч./млн)	85%	85%	38%	23%	15%	0%
Сравн. Пр. 36 (1250 ч./млн)	100%	100%	25%	0%	0%	0%

Наблюдалась четкая дозозависимая реакция между cFCR и степенью включения олигосахаридов в рацион. Для олигосахарида из примера 9.2 улучшение cFCR на 2,4 единицы наблюдалось при включении 100 ч/млн ($P>0,05$), улучшение cFCR на 3,7 единицы наблюдалось при включении 250 ч/млн ($P<0,05$), улучшение cFCR на 6,4 единицы наблюдалось при включении 1000 ч/млн ($P<0,05$).

Вес птицы.

Эффекты исследования для BW были значимыми при $P<0,05$. Применение олигосахаридов обеспечивало увеличение массы тела по меньшей мере на 48,9 граммов по сравнению с контрольным рационом при включении 500 ч/млн, по сравнению со сравнительным примером, который обеспечивал увеличение массы тела на 39,6 г при включении 1250 ч/млн. Олигосахарид из примера 9.5 обеспечивал увеличение массы тела на 81,8 г по сравнению с контролем при включении 500 ч/млн. Результаты мета-анализа веса птицы представлены в табл. 24.

Таблица 24

Мета-анализ веса птицы

Экспериментальная группа	BW (lsmean)	SE	df	Группирование по Тьюки	Δ BW (г против контроля)
Контроль	2,755	113	14	a	0
Пр. 9.2 (500 ч./млн)	2,817	113	14	b	62,6
Пр. 9.3 (500 ч./млн)	2,807	113	14	b	52,6
Пр. 9.4 (500 ч./млн)	2,838	114	14	b	83,3
Пр. 9.5 (500 ч./млн)	2,837	114	14	b	81,8
Пр. 9.7 (500 ч./млн)	2,804	113	14	b	48,9
Сравн. Пр. 36 (1250 ч./млн)	2,794	113	14	b	39,6

Однородность группы.

Птицы, получавшие олигосахаридные препараты с включением 500 ч/млн, показали улучшенную однородность группы по сравнению с птицами, получавшими контрольный рацион. Для каждой экспериментальной группы однородность группы оценивали путем расчета доли веса птицы, который находился в диапазоне ±5% от среднего веса птицы для соответствующего исследования. В среднем по всем исследованиям 36.1-36.15, 81,7% птиц, получавших контрольный рацион, имели вес в пределах ±5% от среднего веса птицы, в то время как 91,3% птиц, получавших рационы с добавлением олигосахарида из примера 9.2, находится в пределах ±5% от среднего веса птицы. Эффект однородности был значительным при $P<0,01$, как измерено непараметрическим тестом Ансари-Брэдли.

Пример 35. Снижение воспаления и улучшенная абсорбция питательных веществ у бройлеров, получающих олигосахариды.

Влияние олигосахаридов на воспалительный ответ и абсорбцию питательных веществ оценивали in vivo на коммерческих цыплятах-бройлерах. Суточные цыплята-бройлеры (Cobb 500) были получены из коммерческого инкубатория (Joseph Grelier S.A., Elevage avicole de la Bohadière, F-49290 Saint-Laurent de la Plaine, Франция).

Лечение и рационы.

Птиц кормили стандартными коммерческими рационами из кукурузной/соевой муки, содержащими сухой остаток от ферментации зерна, но не содержащими антибиотиков, стимулирующих рост, и кокцидиостатиков. Рацион скармливали в две фазы питания: рационы стартовой фазы применяли с 1 по 22 дни, и их состав был таким, чтобы обеспечивать 210 г/кг неочищенного белка и 12,5 МДж/кг МЕ. Рационы в ростовой фазе давали с 23 по 36 дни, и они были такими, чтобы обеспечивать 190 г/кг неочищенного белка и 12,9 МДж/кг МЕ. Все рационы дополняли кормовыми ферментами фитазой (Ronozyme HiPhos) в

стандартной дозе 100 мг на кг корма.

В день принятия в исследование (день 1) птиц помещали в напольные загоны по 18 голов на загон и подстилку из древесной стружки. Загоны были случайным образом распределены в одну из четырех групп обработки с 12 повторами на обработку. Контрольную группу кормили рационами, не содержащими добавленных олигосахаридов, в то время как опытные группы кормили рационами, полученными путем добавления олигосахаридов в контрольный рацион. Различные экспериментальные группы представлены в табл. 25.

Таблица 25

Описание экспериментальных групп

Экспериментальная группа	**Применение олигосахаридов**
A (Контроль)	Нет
B	Пример 9.1 (500 ч./млн)
C	Пример 9.3 (500 ч./млн)
D	Пример 9.7 (500 ч./млн)

Выращивание и отбор образцов.

Птиц содержали в помещении с контролируемой средой с температурой и освещением, адаптированными к возрасту птиц. В течение первых нескольких дней исследования в каждый загон помещали инфракрасную электрическую лампу. Корм и воду давали без ограничений, причем корм предоставляли в виде измельченных гранул в течение первых десяти дней исследования и в виде гранулированного корма в течение оставшейся части периода выращивания. Вес загона и потребление корма регистрировали в дни 1, 22 и 26. Смертность регистрировали ежедневно.

На 36 день из каждого загона случайным образом выбирали по одной птице, умерщвляли и вскрывали. Содержимое подвздошной кишки и слепой кишки собирали и немедленно замораживали для анализа. Ткань подвздошной кишки площадью примерно 1 $см^2$ примерно на 10 см ниже начала тощей кишки и обрабатывали для сохранения РНК и генетического материала для анализа экспрессии генов.

Анализ экспрессии генов.

Ткань подвздошной кишки анализировали с использованием массива здоровья кишечника для количественной оценки уровней экспрессии 18 генов, связанных с воспалительным ответом и иммунитетом, 5 генов, связанных с целостностью кишечника, и 4 генов, связанных с абсорбцией питательных веществ. Уровни экспрессии генов сравнивали между птицами, получавшими рационы, содержащие олигосахариды, и птицами, получавшими контрольный рацион. Статистически значимые эффекты наблюдались для четырех генов у птиц, получавших рационы, содержащие 500 ч/млн олигосахарида из примера 9.3, как показано на фиг. 22. Наблюдалось 1,5-2-кратное увеличение экспрессии генов иммунитета и противовоспалительных генов IL1B, IL4, IL10. Наблюдалось двукратное увеличение гена переносчика углеводов SLC5A10. Эти данные указывают на уменьшение воспаления подвздошной кишки и улучшенную абсорбцию питательных веществ у птиц, получавших олигосахарид из примера 9.3, по сравнению с птицами, получавшими контрольный рацион. Напротив, птицы, получавшие рационы, содержащие олигосахарид из примера 9.1, демонстрировали увеличение экспрессии генов IFNG и IL17B, которые связаны с провоспалительным ответом.

Пример 36. Влияние олигосахаридов на птиц, подвергнутых воздействию воспалительного стимула.

Влияние олигосахаридов на местный и системный иммунный ответ, воспалительный ответ, здоровье органов и морфологию кишечника оценивали in vivo у цыплят-бройлеров.

Лечение, рационы и воспалительный стимул.

Суточных птиц-самцов (Cobb 500) помещали в клеточные батареи по десять птиц в клетке. В течение первых восьми дней исследования все птицы получали один и тот же контрольный рацион, состоящий из обычного кукурузно-соевого рациона домашней птицы с добавлением фитазы (Ronozyme HiPhos) в стандартной дозе 100 мг на кг корма, но без антибиотиков, стимулирующих рост, и кокцидиостатиков.

Начиная с 9-го дня, клетки были распределены по четырем экспериментальным группам, по две клетки на экспериментальную группу. Подробная информация о каждой экспериментальной группе представлена в табл. 26.

Таблица 26

Состав экспериментальных групп

Экспериментальная группа	**Рацион (дни 1–8)**	**Рацион (дни 9–28)**	**Воспалительный стимул**	**Применение олигосахаридов**
A (Контроль)	Контроль	Контроль	Нет	Нет
B (Стимул)	Контроль	Со стимулом	cocci-vac (10x)	Нет
C (Лечение 1)	Контроль	Со стимулом	cocci-vac (10x)	Пример 9.3 (500 ч./млн)
D (Лечение 2)	Контроль	Со стимулом	cocci-vac (10x)	Пример 9.2 (500 ч./млн)

Экспериментальная группа A (контрольная группа) продолжала получать тот же рацион, что и до дня 8. Экспериментальная группа B (группа со стимулом) получала контрольный рацион с добавлением

1% картофельного белка, чтобы вызвать умеренный питательной стресс для пищеварительного тракта. Экспериментальная группа C получала рацион со стимулом, с добавлением 500 ч/млн олигосахарида из примера 9.3.

Экспериментальная группа D получала рацион со стимулом с добавлением 500 ч/млн олигосахарида из примера 9.2.

Птиц содержали в помещении с контролируемой окружающей средой, где корм и воду давали без ограничения. На 14 день все птицы в экспериментальных группах B, C и D получали 10-кратную дозу кокцидийной вакцины (Paracox®-5, MSD Animal Health), чтобы вызвать воспалительную реакцию кишечника на воздействие спорулированных ооцист аттенуированных Eimeria acervulina, E. maxima, E. mitis и E. tenella.

Отбор биологических образцов.

В каждый из 21 и 28 дней удаляли по одной клетке из каждой экспериментальной группы. Птиц из каждой клетки подвергали эвтаназии и вскрывали для отбора биологических образцов и анализа. Ткань подвздошной кишки и пейеровские бляшки собирали и обрабатывали для экспрессии генов и гистологического анализа. Образцы крови были взяты для анализа местного иммунного ответа посредством фенотипирования лимфоцитов (пейеровских бляшек) и системного иммунного и воспалительного ответа посредством измерения иммуноглобулина (IgA) и альфа-гликопротеина (белка острой фазы ответа, продуцируемого печенью). Кровь также анализировали на уровни диаминоксидазы (DAO), и ткань печени собирали для гистологии.

Выполнение анализа как через одну, так и через две недели после применения воспалительного стимула обеспечило оценку влияния олигосахаридов как на амплитуду, так и на временную зависимость иммунного и воспалительного ответа животного.

Абсорбция питательных веществ подвздошной кишкой.

Анализ экспрессии гена подвздошной кишки показал, что воспалительный стимул в Экспериментальной группе B значительно ухудшал абсорбцию в подвздошной кишке углеводов, белков и питательных веществ, содержащих фосфор. Наблюдали 2-3-кратное снижение экспрессии транспортных генов SI, SLC34A2 и SCL15A1 в Экспериментальной группе B с воспалительным стимулом, по сравнению с контрольной группой A на 21 день.

Напротив, экспериментальные группы C и D, получавшие олигосахариды из примеров 9.3 и 9.2, соответственно, показали снижение абсорбции в подвздошной кишке менее, чем на 0,5. На 28 день абсорбция фосфора, показанная по экспрессии SLC34A2 для Экспериментальных групп C и D, была статистически подобна контролю и улучшилась, как показано на фиг. 23.

Качество ворсинок подвздошной кишки и количество бокаловидных клеток.

Изображения ткани подвздошной кишки, взятой у птиц в Экспериментальной группе D, в сравнении с изображениями в Экспериментальной группе B показаны на фиг. 24. Птицы в экспериментальной группе D показали значительно увеличенную длину ворсинок и меньшее воспалительное повреждение, как показала гистология подвздошной кишки. Таким образом, птицы, получавшие определенные олигосахариды из примера 9, проявляли повышенную устойчивость к повреждению ткани подвздошной кишки в результате острого воспалительного стимула, по сравнению с птицами, не получавшими олигосахариды из примера 9.

Значительное ($P<0,05$) увеличение количества бокаловидных клеток подвздошной кишки наблюдалось в группе D по сравнению с получавшими воспалительный стимул птицами в группе B (фиг. 25). Бокаловидные клетки отвечают за выработку муцина среди других ключевых функций подвздошной кишки. Следовательно, птицы, которых кормили олигосахаридами, получавшие определенные олигосахариды из примера 9, демонстрировали улучшенную способность поддерживать здоровую функцию подвздошной кишки при остром воспалительном стимуле, по сравнению с птицами, не получавшими олигосахариды из примера 9.

Дифференциировка Т-клеток.

Как показано на фиг. 26, птицы в экспериментальных группах C и D демонстрировали повышенную пролиферацию Т-хелперных клеток по сравнению с птицами в группе B, получавшими воспалительный стимул. Птицы в группе D демонстрировали уровень Т-хелперных клеток, измеренный как процент от общего количества лимфоцитов пейеровой бляшки, который был статистически неотличимым от процента для не получавших стимула птиц в группе A. Кроме того, птицы групп C и D показали более низкий процент лимфоцитов, дифференцированных как Т-цитотоксические клетки, по сравнению с птицами в группе B, получавшими воспалительный стимул.

Гистология печени и острофазовые белки печени.

Гистология печени и анализ крови показали, что птицы в экспериментальной группе C проявляли меньшее воспалительное повреждение по сравнению с птицами в группе B, что указывает на то, что олигосахарид из примера 9.3 обеспечивает защиту от повреждения печени (фиг. 27A). Гистологическую оценку проводили, как показано на фиг. 27B. Птицы в группе C показали примерно на 50% меньшее увеличение повреждения печени, чем птицы в группе B, по сравнению с контрольной группой A без воспалительного стимула. Птицы в группе B продемонстрировали значительное увеличение циркулирующего

острофазового печеночного альфа-гликопротеина (AGP) (фиг. 27C). К 28 дню исследования птицы, получавшие олигосахарид из примера 9.3, демонстрировали уровни AGP в крови, которые были статистически неотличимы от контрольных птиц в группе A, не получавших воспалительного стимула.

Повышенный выход иммуноглобулина и уровней диаминоксидазы. Уровни иммуноглобулина A (IgA) в сыворотке измеряли, чтобы наблюдать влияние олигосахаридных препаратов на иммунный ответ и скорость выздоровления птиц, подвергшихся воспалительному воздействию. IgA является антителом, участвующим в иммунной функции и воспалительной реакции, особенно мембран. На 21 день, через одну неделю после применения воспалительного стимула, птицы в группе B демонстрировали увеличение сывороточной концентрации IgA примерно на 2,25 мг/мл по сравнению с примерно 1,85 мг/мл у не получавших стимула контрольных птиц в группе A. Напротив, птицы в группе D, получавший олигосахаридный препарат из примера 9.2, показали повышенный ответ IgA примерно на 4,4 мг/мл. На 28 день, через две недели после применения воспалительного стимула, птицы в группе B показали сывороточную концентрацию IgA примерно 4,35 мг/мл, тогда как птицы в группе D показали сывороточную концентрацию IgA, которая снизилась примерно до 2,1 мг/мл. Был сделан вывод, что птицы, получавшие олигосахаридный препарат из примера 9.2, проявляли более быстрый иммунный ответ и более быстрое восстановление после воспалительного стимула. Уровни IgA в сыворотке повышались быстрее и снова снижались до исходного контрольного уровня в группе A быстрее, чем у подвергнутых воздействию стимула птиц в группе B, которым не давали олигосахаридный препарат.

Уровни диаминоксидазы (DAO) в сыворотке измеряли для наблюдения влияния олигосахаридных препаратов на воспалительную реакцию и скорость выздоровления птиц, подвергшихся воздействию воспалительного стимула. DAO участвует в регуляции гистамина и в путях воспаления. На 21 день, через одну неделю после применения воспалительного стимула, птицы в группах B и D продемонстрировали снижение концентрации DAO в сыворотке крови примерно на 25-30% по сравнению с концентрацией примерно 28,5 мкг/мл для не получавших стимула контрольных птиц в группе A. Уменьшение концентрации DAO у птиц группы D, получавших олигосахарид из примера 9.2, было более выражено, чем у птиц группы B, которым не давали олигосахаридный препарат. На 28 день, через две недели после применения воспалительного стимула, с точностью до экспериментальной ошибки, птицы в группе D продемонстрировали возврат к исходной концентрации DAO, как это наблюдалось у не получавших стимула птиц группы A. Был сделан вывод, что птицы, получавшие олигосахаридный препарат из примера 9.2, проявляли подобную воспалительную реакцию и более быстрое восстановление гомеостаза по сравнению с птицами, не получавшими олигосахарид.

Пример 37. Микроматричный анализ экспрессии генов.

Экспрессию всех известных генов в подвздошной кишке цыплят-бройлеров проводили с помощью микроматричного анализа. Ткань подвздошной кишки бройлеров из примера 36.4 анализировали для определения влияния препаратов и доз олигосахаридов на экспрессию генов в подвздошной кишке по сравнению с таковой у контрольных птиц, которым не давали олигосахаридный препарат. Образцы тканей получали согласно методикам из примеров 33 и 36.

Для подготовки к микроматричному анализу образцы РНК амплифицировали и метили в реакции на основе РНК-полимеразы T7. Набор для маркировки Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit, одноцветный использовали для создания флуоресцентной кРНК (комплементарной РНК) с входной РНК образца 100 нг общей РНК для одноцветной обработки. В методе использовали смесь РНК-полимеразы T7, которая одновременно амплифицировала целевой материал и включала цианин 3-CTP. Обычно амплификация была не менее 100-кратной от общей РНК к кРНК.

Двухцепочечная кДНК была получена обратной транскрипцией, выполняемой в присутствии меченых рибонуклеотидов, с получением микрограммовых количеств меченой РНК для гибридизации массива. Меченую кРНК гибридизовали на предметных стеклах микроматриц в течение ночи при концентрации 1,65 мкг на образец. После гибридизации (не менее 17 ч) слайды промывали и сканировали на сканере Agilent SureScan Mircroarray. Данные были проанализированы с помощью пакета Partek Genomics. Механистическая и онтологическая группировка была выполнена, как показано в табл. 27.

Таблица 27

Механистическая и онтологическая группировка

Режим действия	**Ассоциация генов**
Целостность кишечника	CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN5, ZO1, ZO2, MUC2, FOXP1, MUC, OCLN, TFF2, TJP1
Воспаление/ Иммунитет	ALPI, C5, CCL1, CCL20, CRP, CSF1, CSF2, FASLG, GATA3, IFNG, IL10, IL12A, IL16, IL17A, IL17B, IL18, IL1B, IL2, IL21, IL22, IL3, IL4, IL4, IL5, IL6, IL8L1, LYZ, NoD1, NoS2, TBX21, TGFB2, TLR21, TLR4, TNFSF10, TNFSF13B
Абсорбция питательных веществ	SCL15A1, SI, SLC34A2, SLC5A10, MGAM, SLC6A19, SLC6A14, SLC7A9, SLC6A20, SLC6A6, SLC1A1, SLC1A5, SLC38A3, SLC36A1, SLC3A1, SLC38A5

Кроме того, нецелевой анализ был выполнен с использованием следующего многоэтапного подхо-

да. Были идентифицированы десять аннотированных генов с наибольшим кратным изменением, наблюдаемым между животными, получавшими олигосахарид, по сравнению с контрольной группой. Также были идентифицированы десять аннотированных генов с наименьшим кратным изменением, наблюдаемым между животными, получавшими олигосахарид, по сравнению с контрольной группой. Наконец, были проанализированы десять аннотированных генов с наивысшей статистической достоверностью различий между животными, получавшими олигосахарид, и контрольной группой. Анализ пути был выполнен против путей Gallus gallus KEGG с использованием программного обеспечения для анализа генома и экспрессии генов (Partek, Сент-Луис).

Пример 38. Способ стимуляции выздоровления от кокцидиоза.

Кокцидиоз представляет собой паразитарное заболевание кишечного тракта животных, вызываемое воздействием простейших кокцидий, включая, например, Eimeria acervuline, Eimeria maxima, Eimeria mitis, Eimeria tenella, Toxoplasma gondii, Hammondia spp. Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium muris, Cryptosporidium hominis, Isospora canis, Isospora ohioensis, Isospora burrosi, Isospora felis и других.

Цыплята-бройлеров из примера 36 подвергали воздействию следующих уровней спорулированных ооцист, полученных из ранних линий кокцидий: 5000-6000 ооцист Eimeria acervuline HP, 2000-2300 ооцист Eimeria maxima CP, 1000-1300 ооцист Eimeria maxima MFP, 10 000 - 13 000 ооцист Eimeria mitis HP и 5 000 - 6 500 ооцист Eimeria tenella HP. Птицы, подвергшиеся воздействию, проявляли сильную воспалительную реакцию, о чем свидетельствовала продукция сывороточного IgA, сывороточной DAO, гистология печени и гистология просвета кишечника из примера 36.

Птицы в группе D из примера 36, которым давали 500 ч/млн олигосахаридного препарата из примера 9.2, демонстрировали значительно меньшее повреждение кишечника и печени и более быстрое восстановление гомеостаза по сравнению с не получавшими олигосахарида птицами. Птицы, получавшие олигосахариды, также показали улучшенную абсорбцию питательных веществ и улучшенную дифференцировку Т-клеток по сравнению с не получавшими олигосахарида птицами группы B со стимуляцией воспаления.

Пример 39. Способ повышения толерантности к вакцинам против кокцидиоза.

Птицы из примера 35 продемонстрировали уменьшенное повреждение печени, улучшенную гистологию кишечника, улучшенную абсорбцию питательных веществ и более быстрое выздоровление при воспалительном процессе при воздействии 10-кратной дозы коммерческой вакцины против кокцидиоза, используемой в производстве бройлеров.

Пример 40. Масштабирование повторных партий для производства.

Производственные масштабы олигосахаридных препаратов были увеличены до корпусного реактора с подвесной мешалкой вместимостью 720 л. Двенадцать периодических реакций с использованием масштабированной процедуры, полученной из примера 9.2, были выполнены в масштабе 720 л. Полученные олигосахаридные препараты были охарактеризованы в соответствии с предварительно определенными критериями приемлемости для контроля качества, чтобы выполнить аттестацию партии и оценить стабильность процесса. Остаточный катализатор в конечном продукте определяли для партий, используя процедуру из примера 26.

Для двенадцати партий условия процесса, такие как температура, время реакции и давление реакции, намеренно варьировали в диапазоне от номинальных условий из примера 9.2 для оценки чувствительности полученного продукта к разумным изменениям условий процесса, которые могли можно ожидать в типичной производственной среде. Для выбранных партий использовали зонд вязкости на месте реакции для мониторинга зависимости вязкости содержимого реактора от времени. В некоторых партиях время остановки реакции использовали для производственного контроля (IPC), основанного на непрерывном измерении вязкости. Количества материалов, включая дозированные количества реагентов, дистилляционную воду и выделившийся конденсат, измеряли либо по массе с помощью датчиков нагрузки на реакторе и вспомогательных баках, либо по объемному расходу и времени.

Итоговое содержание воды в продукте реактора измеряли титрованием по Карлу Фишеру для типичной аликвоты содержимого реактора, взятой в конце реакции, т.е. перед нейтрализацией pH и разбавлением. При температуре реакции 120°C содержание воды в продукте реакции составило при определении 8 и 9 мас.% воды, без пересчета на сухое вещество. При температуре реакции 130°C содержание воды в продукте реакции составило при определении от 5 до 7 мас.% воды без пересчета на сухое вещество.

Внешний вид полученного олигосахаридного сиропа всех партий был определен визуальным осмотром как карамельный сироп. Общее содержание растворенных твердых веществ определяли титрованием по Карлу Фишеру, остаточное содержание мономера, MWn и MWw определяли хроматографией ВЭЖХ/ГПХ, pH определяли калиброванным pH-метром, а содержание ангидро-DP2 определяли посредством ЖХ-МС/МС. Как показано в табл. 28, были получены следующие данные характеристики партии (N/R="данные не представлены").

Таблица 28

Характеристика олигосахаридных препаратов

Партия	Раств. тверд. вещ-ва, масс.%	pH	Остаточный катализатор	DP1, масс.%	MWn	MWw	Содержание ангидро-DP2 (г ангидро-DP2/ г всех DP2)
27.1	66,4	N/D	Н/П	17,5	777	1218	0,84%
27.2	68,8	3,3	N/R	17,9	735	1091	0,91%
27.3	69,4	3,1	0,095	14,8	807	1276	N/R
27.4	71,0	N/D	0,068	15,5	793	1241	1,04%
27.5	70,9	3,2	0,057	15,8	777	1196	1,15%
27.6	70,9	3,3	Н/П	16,3	773	1170	Н/П
27.7	70,7	3,0	Н/П	15,7	783	1226	1,13%
27.8	70,5	3,9	Н/П	16,1	785	1182	1,09%
27.9	71,1	4,1	Н/П	17,1	761	1169	1,09%
27.10	70,4	4,1	Н/П	16,3	778	1193	1,15%
27.11	70,5	4,7	Н/П	18,6	696	995	1,33%
27.12	70,9	3,9	Н/П	16,7	769	1194	1,12%

Пример 41. Регуляция pH олигосахаридного препарата.

Значение pH олигосахаридного препарата из примера 9.2 при содержании твердых веществ 50 мас.% определяли в трех повторностях путем разбавления 5,00±0,05 г аликвот олигосахаридного препарата в 1,80±0,02 мл деионизированной воды и перемешивания на вихревой мешалке для получения равномерной концентрации. Значение pH каждой аликвоты измеряли с помощью калиброванного pH-метра (VWR, Symphony B30PCI), чтобы получить среднее значение pH 2,4.

К 1,2 кг олигосахаридного препарата из примера 9.2 добавляли 6,53 мл 1,0 М водного раствора гидроксида натрия. Полученную смесь энергично перемешивали до получения однородного сиропа с установленным pH. Затем определяли pH полученного отрегулированного сиропа при содержании твердых веществ 50 мас.% в трех повторностях, как описано выше, для получения среднего значения pH 4,1.

Процедуру регуляции pH повторяли для синтезов повторных партий в различных масштабах, но с некоторыми вариациями в процедуре, с помощью которых было обеспечено основание для состава олигосахаридного продукта. Для одной партии регуляцию pH выполняли как заключительную стадию реакции перед разбавлением реакционной воды. В другой партии корректировку pH проводили одновременно со стадией разбавления, сначала растворяя необходимое количество основания в разбавляющей воде; таким образом, основание и разбавляющую воду добавляли вместе для остановки реакции в одну стадию с получением конечного сиропа с необходимым pH. В другой партии основа была представлена в виде гранул гидроксида натрия пищевого качества. В другой партии 10 ч/млн силиконовой эмульсии пищевого качества (Dow Xiameter AFE-0100) добавляли в реакционную смесь перед разбавлением и регуляцией pH.

Пример 42. Приготовление стеклоподобной порошковой композиции из олигосахаридного препарата.

Приблизительно 50 г олигосахаридного препарата из примера 9.1 распределяли на сушильном лотке и помещали в нагреватель с принудительной конвекцией при 60°C для получения хрупкого стекла карамельного цвета. Стекло вынимали из сушильного лотка и измельчали с помощью ротационной мельницы со сдвигом, получая текучий порошок светло-оранжевого цвета. Размер частиц порошка был определен путем просеивания и составлял от 100 до 2000 микрон, при 90% массы менее 1350 микрон. Истинная плотность крупнозернистого измельченного порошка, определенная гелиевым пинкнометром, составила 1,3063 г/мл. Полученный порошок был сыпучим.

Процедуру формирования повторяли с использованием молотковой мельницы для получения тонкодисперсного порошка с 90% массы порошка с размером частиц менее 196 микрон. Истинная плотность тонко измельченного порошка составила 1,5263 г/мл. Полученный порошок не был ни стабильным, ни сыпучим.

Измерения ДСК проводили на порошках с использованием двух программ температурного цикла. В первой программе температуру сдвигали до 160°C от 0°C со скоростью 5°C/мин, затем снова отжигали до 0°C со скоростью -5°C/мин с последующим окончательным обратным нагревом до 160°C. Во второй программе температуру сдвигали до 50°C от -50°C со скоростью 5°C/мин, отжигали до -60°C со скоро-

стью -5°С/мин, а затем нагревали до 60°С со скоростью 5°С/мин. Было обнаружено, что порошок имеет температуру стеклования от 20 до 40°С, в зависимости от остаточного содержания воды в твердом веществе от 5 до 10 мас.% влаги.

Процесс измельчения композиции повторяли для каждого из олигосахаридных препаратов из примера 9.2, примера 9.3, примера 9.4 и примера 9.5. Порошки легко повторно растворялись в воде и водно-спиртовых смесях, но не растворялись в ацетоне, метаноле и безводном этаноле.

Пример 43. Приготовление порошковой композиции, загруженной на носитель.

Равные массы 70 мас.% водного сиропа олигосахаридного препарата из примера 9.2 и диатомовой земли объединяли при комнатной температуре с получением стабильного сыпучего порошка. Полученный порошок содержал примерно 35 мас.% адсорбированного олигосахарида (в пересчете на сухие твердые вещества) и примерно 50 мас.% носителя. Распределение по размеру частиц порошка измеряли просеиванием. 10% по массе порошка имело размер частиц менее 290 мкм, 50% по массе порошка имело размер частиц менее 511 мкм, и 90% по массе порошка имело размер частиц менее 886 мкм. Порошок был устойчив к расслоению и когезии, что было определено с помощью стандартных тестов на аэрацию и сжимаемость. Истинная плотность полученного порошка, измеренная гелиевым пикнометром, составила 1,8541 г/мл.

Формирование с загрузкой носителя повторяли с использованием диоксида кремния кормового качества с получением стабильного сыпучего порошка с содержанием олигосахаридного препарата по меньшей мере 50 мас.% (в пересчете на сухие твердые вещества) по отношению к конечному порошку. Истинная плотность полученного порошка составила 1,5562 г/мл.

Пример 44. Получение экструдированной твердой формы.

Твердый экструдированный продукт получали смешиванием 20% олигосахаридного препарата из примера 9.2 с пшеничной крупой грубого помола, и готовили смесь через двухшнековый экструдер для сухого вещества с кожухом, с получением сыпучего порошка с размером частиц от 0,2 до 3,0 мм, с 90% по массе размером менее 2 мм. Полученный порошок был сыпучим и стабильным.

Пример 45. Приготовление стабильных порошковых композиций.

Твердые композиции, включая композиции из примеров 42-44, оценивали для определения их стабильности и гигроскопичности. Порошки из примеров 43 и 44 оказались устойчивыми к сегрегации и агломерации, в то время как порошок из примера 42 был нестабильным в отношении сегрегации.

Образцы каждой исследуемой порошковой композиции помещали в герметичные климатические камеры при относительной влажности 50% и относительной влажности 65% на срок до двух недель при 25°С. Из протестированных форм некоторые показали незначительный прирост массы или его отсутствие при воздействии влажности, и оставались сыпучими после двухнедельного периода воздействия. Было обнаружено, что тонкоизмельченный порошок из примера 23 нестабилен при воздействии влаги.

Пример 46. Определение остаточного катализатора в олигосахаридных препаратах.

Остаточное содержание кислотного катализатора в олигосахаридных препаратах определяли ионной хроматографией. От 80 до 100 мг порошкового состава олигосахаридного препарата (полученного, например, как описано в примере 42) растворяли точно в 1,00 мл и центрифугировали для удаления частиц, если это необходимо. Полученный раствор анализировали с помощью ионной хроматографии при 30°С с использованием системы Thermo Dionex ICS-3000, оснащенной детектором проводимости, колонки Ion Pac AS19A 4x250 мм, предварительной колонки Ion Pac AS19G 50 4×50 мм и непрерывно регенерируемой анионной предколонки CR-ATC с использованием КОН в воде в качестве элюента. Элюирование проводили при 10 мМ КОН в течение первых десяти минут после введения с последующим градиентным элюированием, с линейным увеличением до 55 мМ КОН через 25 мин, затем снижением до 10 мМ КОН через 26 мин, и сохранением уровня 10 мМ КОН до конца программы.

Для олигосахаридного препарата из примера 9.2 концентрацию остаточного катализатора определяли по стандартной калибровочной кривой, построенной с использованием аутентичного образца (+)-камфор-10-сульфоновой кислоты. Анализировали типичную партию олигосахаридного препарата из примера 9.2, и было определено, что остаточная концентрация катализатора составляет 0,62 мг/г 70 мас.% сиропа.

Пример 47. Количественный анализ остаточной концентрации катализатора для приемки партии.

Определение остаточного количества катализатора в примере 46 сравнивали с критерием приемки партии, чтобы определить пригодность партии для дальнейшего использования. Предел приемлемости для концентрации остаточного катализатора в препарате олигосахаридного продукта был предварительно установлен и составлял <1,0 мг на грамм сиропного продукта. Измеренное значение остаточного катализатора составляло 0,62 мг на грамм сиропного продукта. Таким образом, критерий приемки был соблюден для испытанной партии, и партия была принята для дальнейшего использования.

Пример 48. Получение продукта в форме сиропа.

В олигосахаридном препарате из примера 9.7 значение pH доводили до 4,2 гидроксидом натрия пищевого качества в соответствии с процедурой из примера 41. Полученный сироп был упакован в 20-литровую бутыль с крышкой, устойчивой к несанкционированному доступу. Непосредственно перед герметизацией контейнера был взят образец массой 500 г, который подвергали проверке качества. Было

подтверждено, что общее содержание твердых веществ в сиропе превышает 70 мас.% согласно методам FCC, ПРИЛОЖЕНИЕ X: Углеводы (крахмалы, сахара и родственные вещества): Общее содержание твердых веществ. Было подтверждено, что содержание восстанавливающих сахаров составляет менее 50% в виде D-глюкозы в пересчете на массу сухого вещества в соответствии с методом FCC, ПРИЛОЖЕНИЕ X: Углеводы (крахмалы, сахара и родственные вещества): Анализ восстанавливающих сахаров. Было подтверждено, что содержание сульфатной золы составляет менее 1% от массы сухого вещества с использованием метода FCC, ПРИЛОЖЕНИЕ II: Физические испытания и определения: C. ДРУГОЕ: Остаток при минерализации (сульфатная зола), Метод II (для жидкостей). Содержание диоксида серы составило менее 40 мг/кг при использовании оптимизированного метода Монье-Вильямса. Содержание свинца составило менее 1 мг/кг при использовании официального международного метода AOAC 2013.06. Было подтверждено, что общее количество аэробных микроорганизмов при анализе чашечным способом ниже 1000 КОЕ/г, с использованием методов, описанных в главе 7 CMMEF. Общее количество дрожжевых и плесневых грибов составило менее 100 КОЕ/г при использовании международного метода, утвержденного AACC 42-50. Было подтверждено, что содержание колиформных бактерий составляет менее 10 MPN/г, при использовании метода, описанного в главе 4 FDA BAM. Было подтверждено, что содержание E. coli составляет менее 3 MPN/г, при использовании метода из главы 4 FDA BAM. Было подтверждено, что сальмонелла не обнаруживается в 25-граммовой пробе в соответствии с методом, указанным в Главе 5 FDA BAM. Содержание Staphylococcus aureus было ниже 10 КОЕ/г при использовании метода FDA BAM, глава 12. Окраска при визуальном анализе была определена как карамельная. Контейнер герметизировали, оставшийся для хранения образец замораживали и сохраняли для дальнейшего использования, и на полученную партию был выдан сертификат анализа.

Пример 49. Приготовление обработанной питьевой воды.

Питьевая вода, содержащая 250 ч/млн. олигосахаридного препарата из примера 9.7, была приготовлена следующим образом. 37 мл олигосахаридного сиропа из примера 33 и 40 г сорбата калия постепенно добавляли к 50 галлонам питьевой водопроводной воды в 55-галлонной бочке из синего полимера. Раствор перемешивали вручную с помощью лопастной мешалки в течение 10 мин при комнатной температуре.

Способ повторяли без включения калия сорбата.

Хотя здесь были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, для специалистов в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Не предполагается, что изобретение ограничивается конкретными примерами, представленные в описании. Хотя изобретение было описано со ссылкой на вышеупомянутую спецификацию, описания и иллюстрации вариантов осуществления в данном документе не предназначены для толкования в ограничивающем смысле. Многочисленные вариации, изменения и замены будут понятны для специалистов в данной области техники без отделения от изобретения. Кроме того, следует понимать, что все аспекты изобретения не ограничиваются конкретными изображениями, конфигурациями или относительными пропорциями, изложенными в настоящем изобретении, которые зависят от множества условий и переменных. Необходимо понять, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем изобретении, могут быть использованы при практическом применении изобретения. Следовательно, предполагается, что изобретение также будет охватывать любые такие альтернативы, модификации, вариации или эквиваленты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или профилактики дисфункции желудочно-кишечного барьера у животного, нуждающегося в этом, включающий введение питательной композиции, содержащей основную питательную композицию и синтетический олигосахаридный препарат, указанному животному, где указанный синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn), где n является целым числом более 3; и где каждая из фракций DP1 и DP2 независимо включает от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, определяемой масс-спектрометрией.

2. Способ лечения или профилактики инфекции у животного, нуждающегося в этом, включающий введение питательной композиции, содержащей основную питательную композицию и синтетический олигосахаридный препарат, указанному животному, где указанный синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn), где n является целым числом больше 3; и где каждая из фракций DP1 и DP2 независимо включает от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, определяемой масс-спектрометрией.

3. Применение питательной композиции, содержащей основную питательную композицию и синтетический олигосахаридный препарат, у животного, где указанный синтетический олигосахаридный пре-

парат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn), где n является целым числом более 3; и где каждая из фракций DP1 и DP2 независимо включает от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, определяемой масс-спектрометрией, для лечения или профилактики дисфункции желудочно-кишечного барьера у животного, нуждающегося в этом.

4. Применение по п.3, где проницаемость желудочно-кишечного барьера указанного животного снижается по сравнению с проницаемостью указанного желудочно-кишечного барьера указанного животного перед указанным применением указанного синтетического олигосахаридного препарата.

5. Применение по п.4, где указанное уменьшение является уменьшением по меньшей мере на 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% относительно указанной проницаемости указанного желудочно-кишечного барьера указанного животного перед указанным применением указанного синтетического олигосахаридного препарата.

6. Применение по п.5, где указанную проницаемость указанного желудочно-кишечного барьера определяют по образцу крови, фекалий или мочи указанного животного.

7. Применение по п.6, где указанную проницаемость измеряют путем определения уровня по меньшей мере одного вида микробов в указанном образце крови, фекалий или мочи.

8. Применение по любому из пп.3-7, где указанная дисфункция желудочно-кишечного барьера связана с инфекцией или вызвана ею.

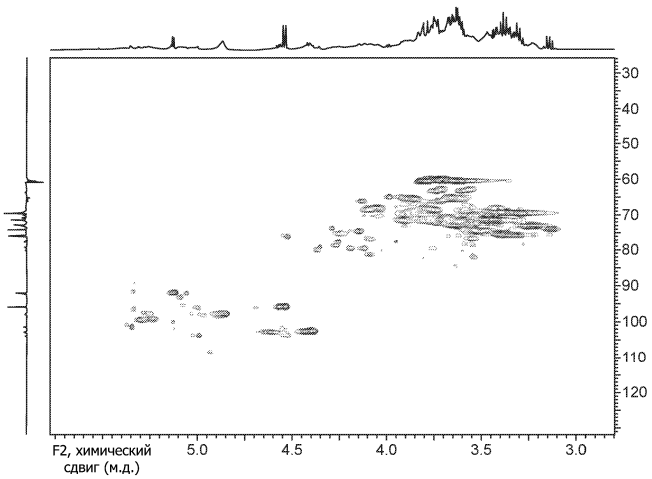
9. Применение питательной композиции, содержащей основную питательную композицию и синтетический олигосахаридный препарат, у животного, где указанный синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn), где n является целым числом больше 3; и где каждая из фракций DP1 и DP2 независимо включает от 0,5 до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, определяемой масс-спектрометрией, для лечения или профилактики инфекции у животного, нуждающегося в этом.

10. Применение по п.9, где уровень по меньшей мере одной иммунной клетки в образце от указанного животного повышен относительно уровня указанной по меньшей мере одной иммунной клетки в образце от указанного животного до применения указанной питательной композиции, которая содержит указанный синтетический олигосахаридный препарат.

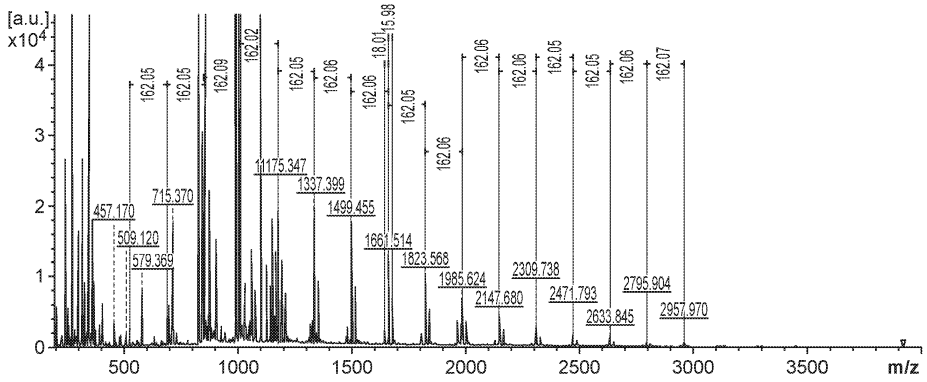
11. Применение по п.10, где указанное увеличение является увеличением по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% или 10% относительно указанного уровня указанной по меньшей мере одной иммунной клетки до применения указанной питательной композиции, содержащей указанный синтетический олигосахаридный препарат.

12. Применение по п.11, где уровень по меньшей мере одного провоспалительного цитокина в образце от указанного животного повышен относительно уровня указанного по меньшей мере одного провоспалительного цитокина в образце от указанного животного до применения указанной питательной композиции, содержащей указанный синтетический олигосахаридный препарат.

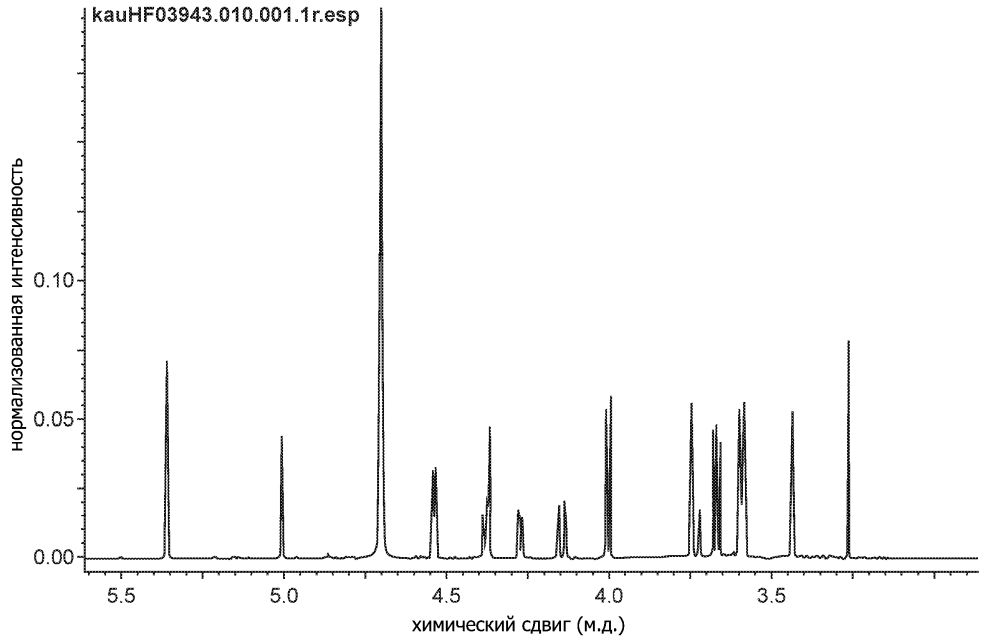
13. Применение по любому из пп.9-12, где указанная дисфункция желудочно-кишечного барьера связана с инфекцией или вызвана ею.



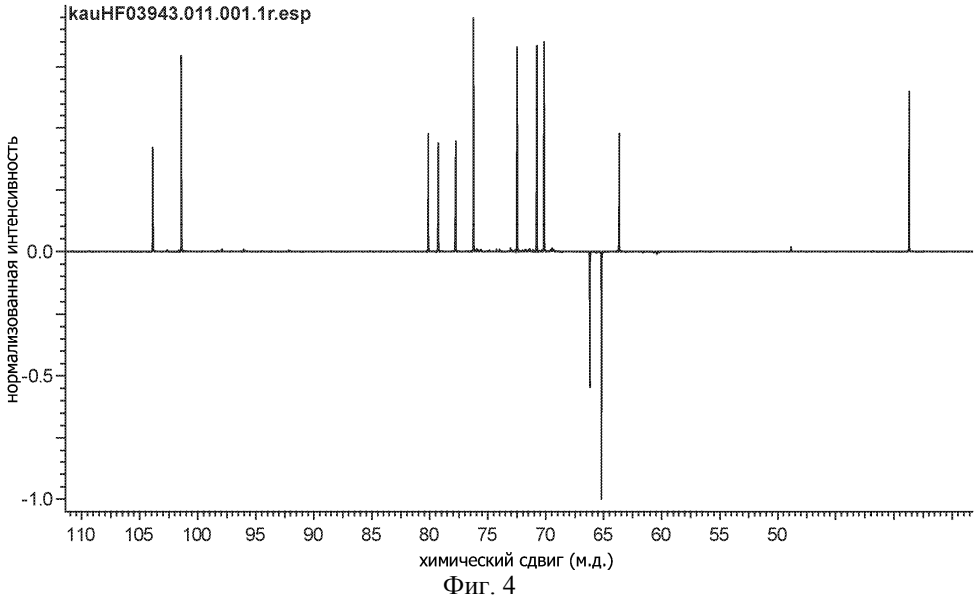
Фиг. 1



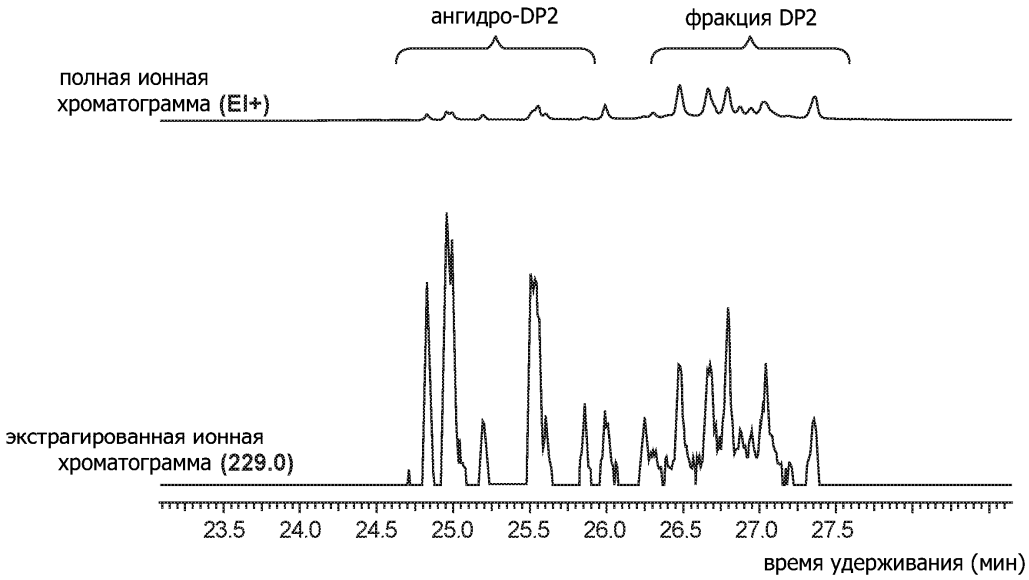
Фиг. 2



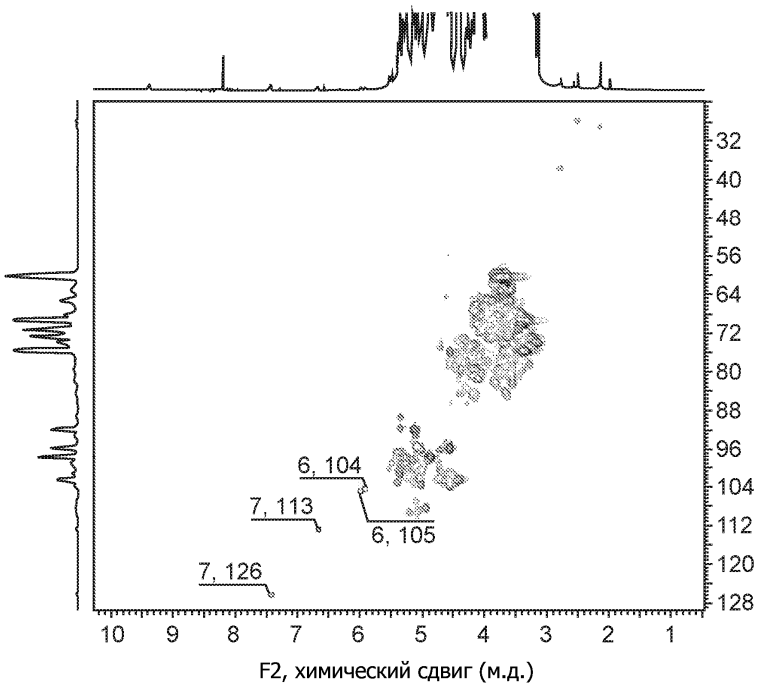
Фиг. 3



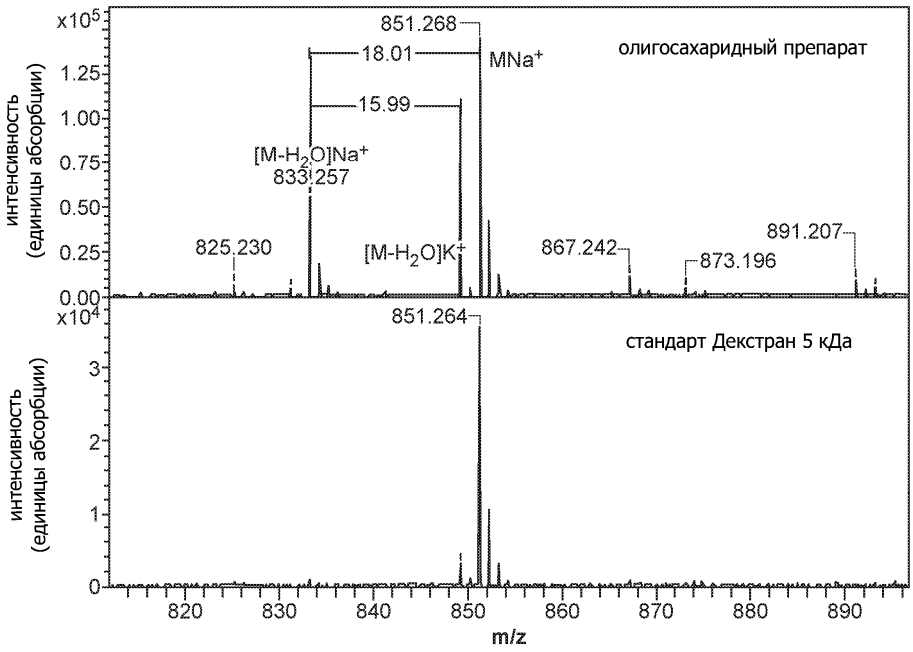
Фиг. 4


ангидро-DP2
фракция DP2
полная ионная
хроматограмма (EI+)
экстрагированная ионная
хроматограмма (229.0)
23.5
24.0
24.5
25.0
25.5
26.0
26.5
27.0
27.5
время удерживания (мин)

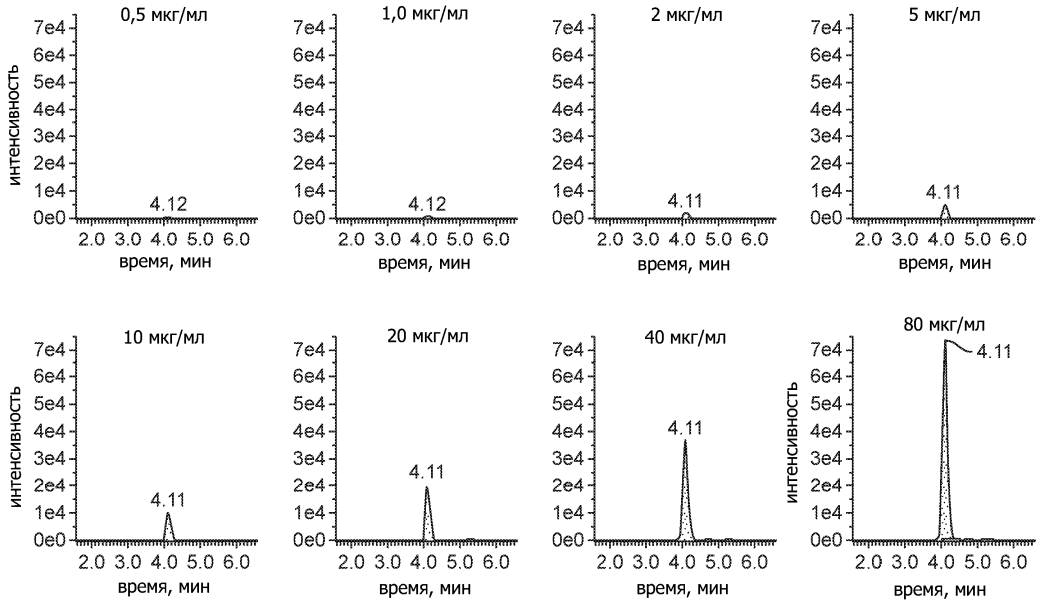
Фиг. 5


6, 104
7, 113
6, 105
7, 126
32
40
48
56
64
72
80
88
96
104
112
120
128
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
F2, химический сдвиг (м.д.)

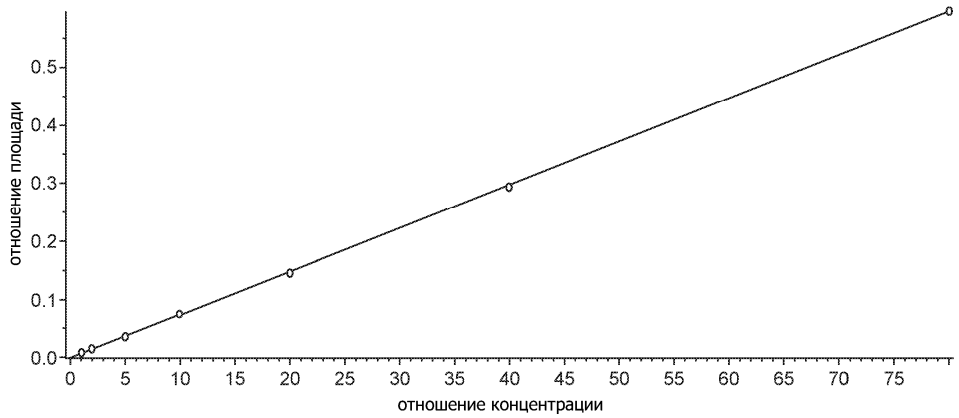
Фиг. 6



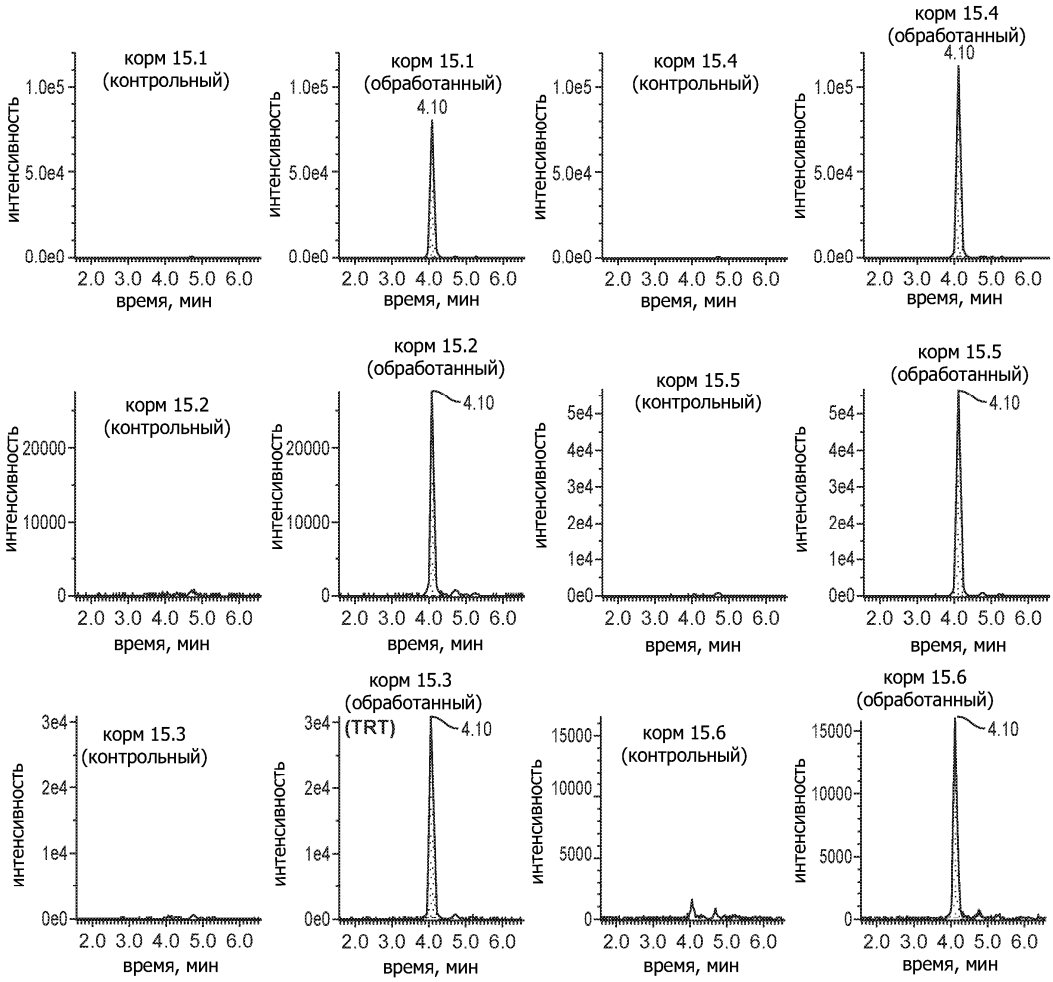
Фиг. 7



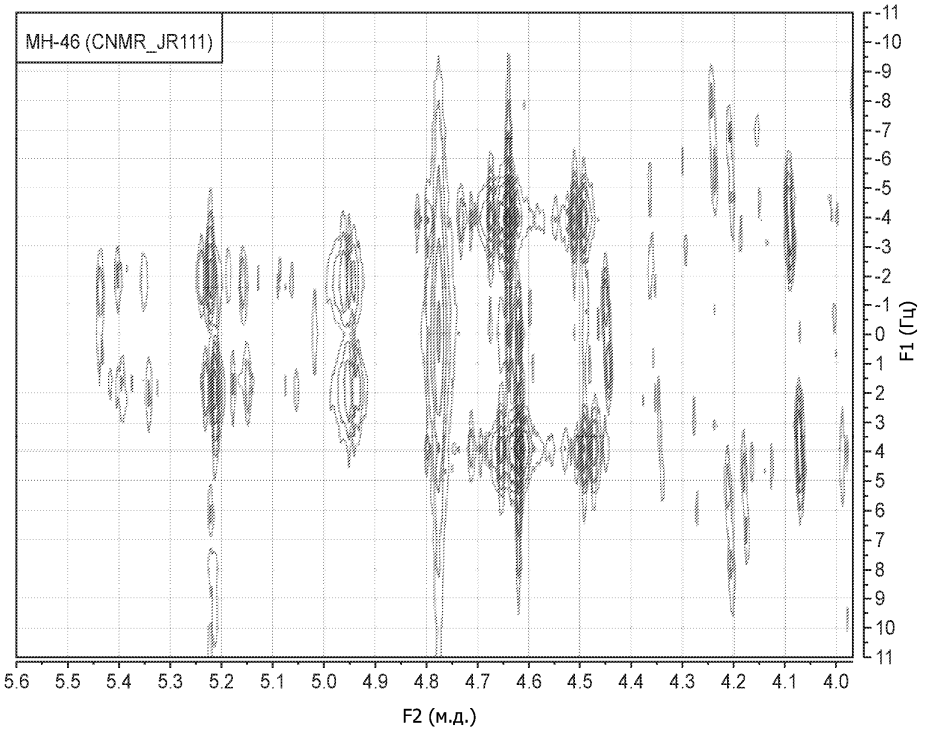
Фиг. 8A



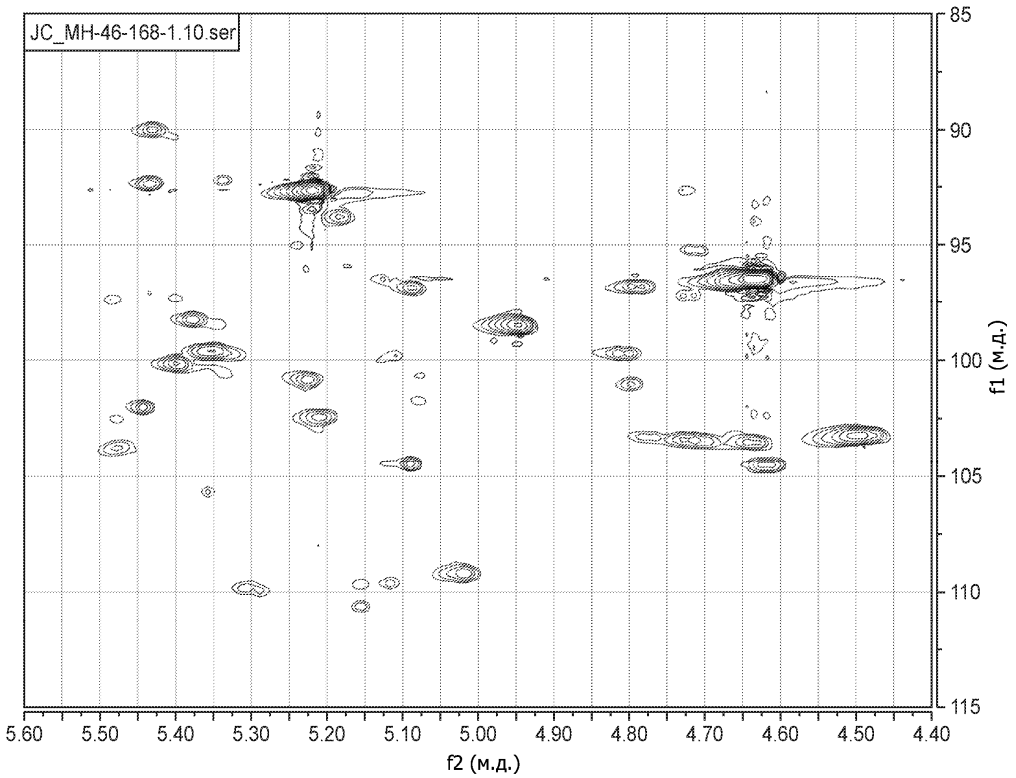
Фиг. 8B


корм 15.1
(контрольный)
корм 15.1
(обработанный)
4.10
корм 15.4
(контрольный)
корм 15.4
(обработанный)
4.10
корм 15.2
(контрольный)
корм 15.2
(обработанный)
4.10
корм 15.5
(контрольный)
корм 15.5
(обработанный)
4.10
корм 15.3
(контрольный)
корм 15.3
(обработанный)
(TRT)
4.10
корм 15.6
(контрольный)
корм 15.6
(обработанный)
4.10
интенсивность
время, мин
2.0 3.0 4.0 5.0 6.0

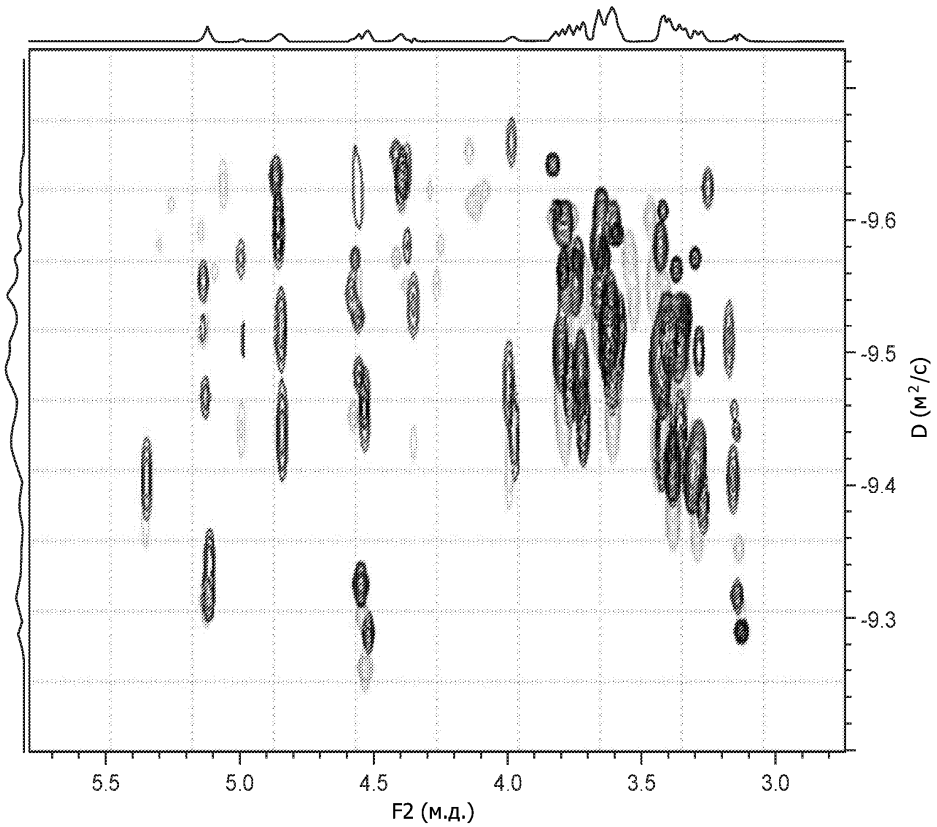
Фиг. 9


MH-46 (CNMR_JR111)
F1 (Гц)
F2 (м.д.)
5.6 5.5 5.4 5.3 5.2 5.1 5.0 4.9 4.8 4.7 4.6 4.5 4.4 4.3 4.2 4.1 4.0

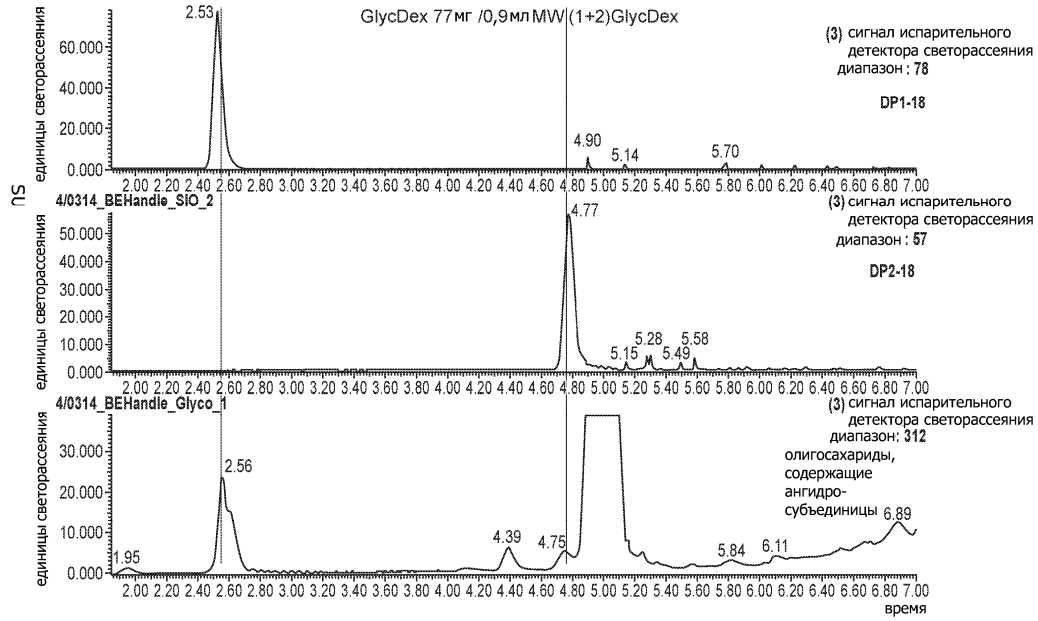
Фиг. 10


JC_MH-46-168-1.10.ser
85
90
95
100
105
110
115
f1 (м.д.)
5.60
5.50
5.40
5.30
5.20
5.10
5.00
4.90
4.80
4.70
4.60
4.50
4.40
f2 (м.д.)

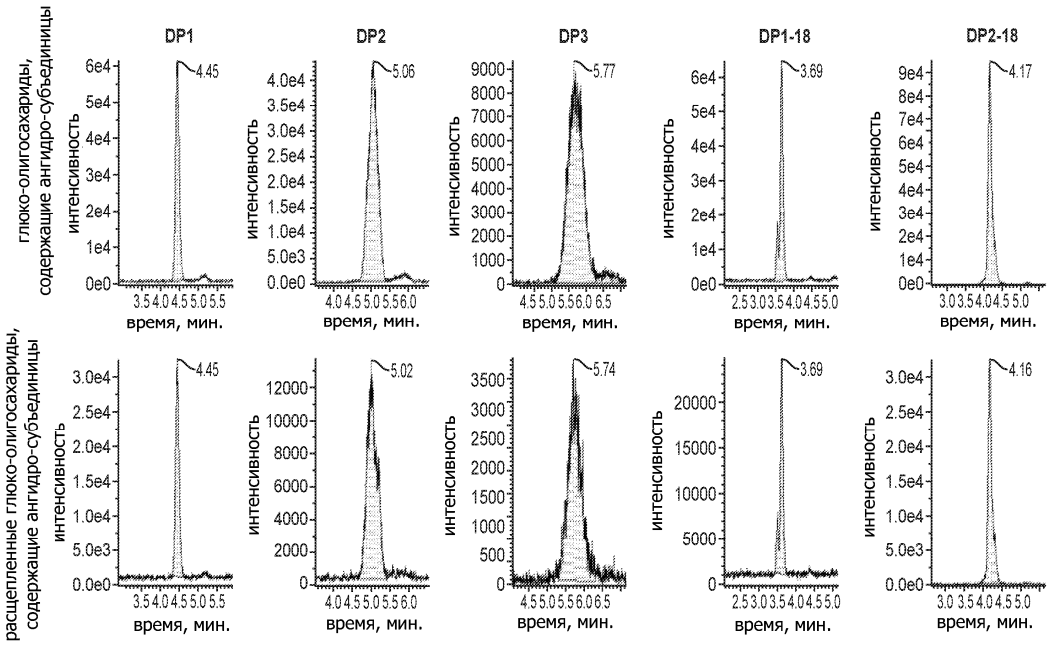
Фиг. 11


-9.6
-9.5
-9.4
-9.3
D (м²/с)
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
F2 (м.д.)

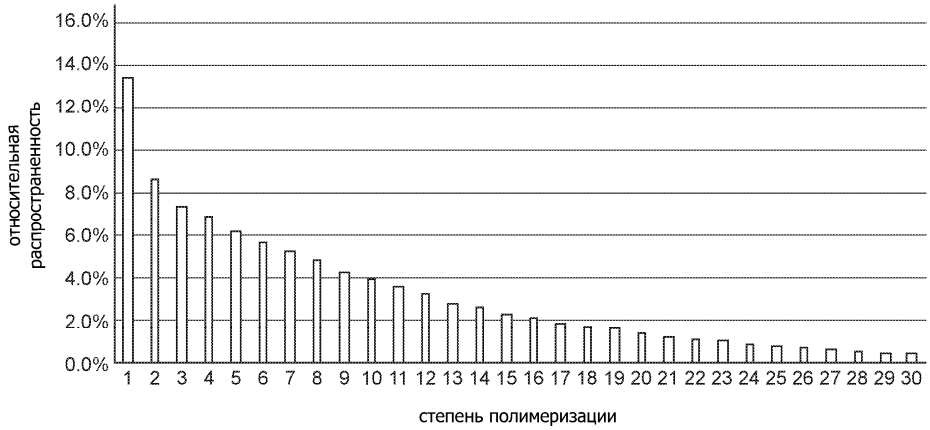
Фиг. 12



Фиг. 13

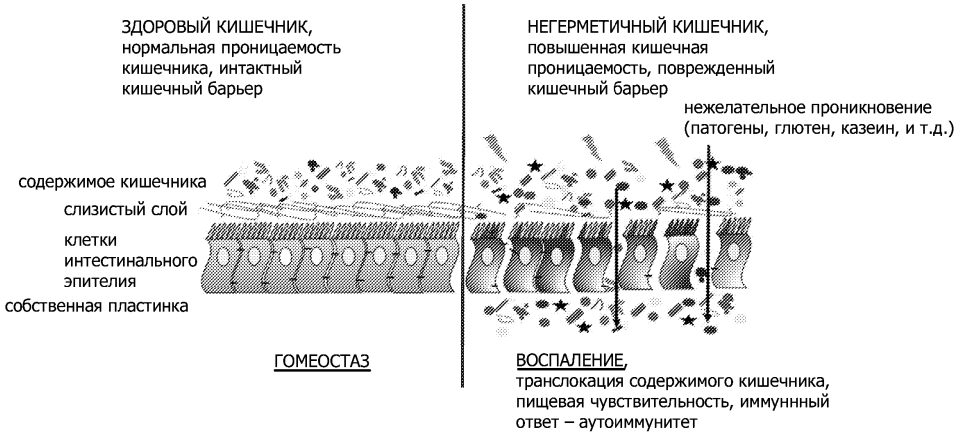


Фиг. 14

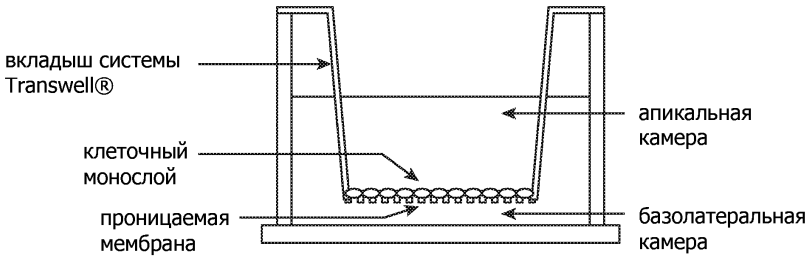


Фиг. 15

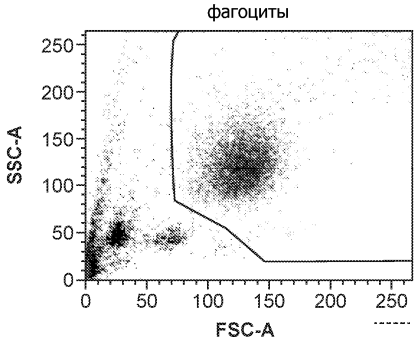
Фиг. 16



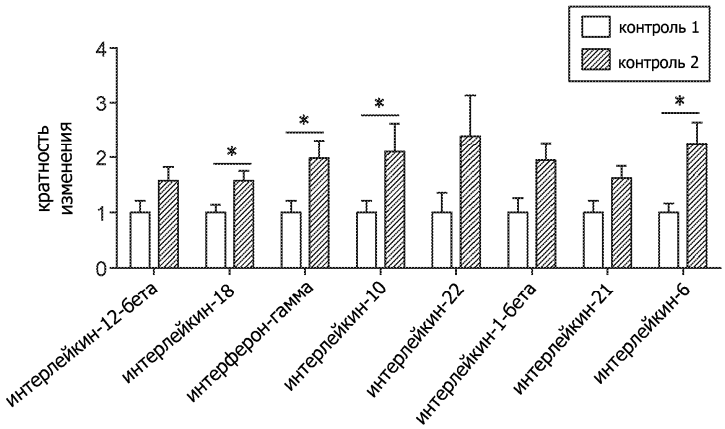
Фиг. 17



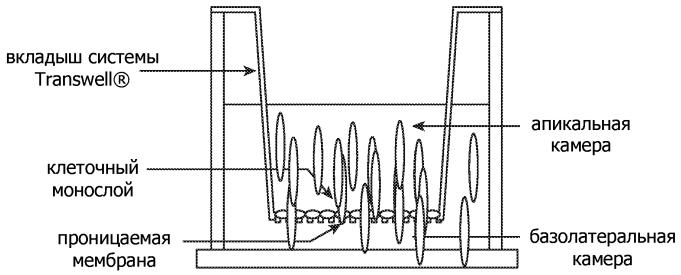
Фиг. 18



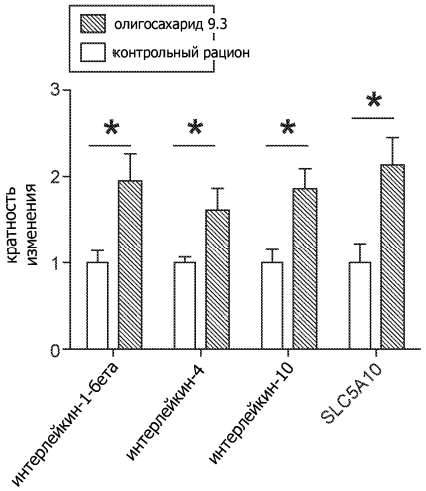
Фиг. 19



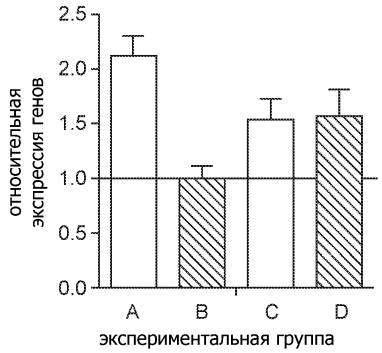
Фиг. 20



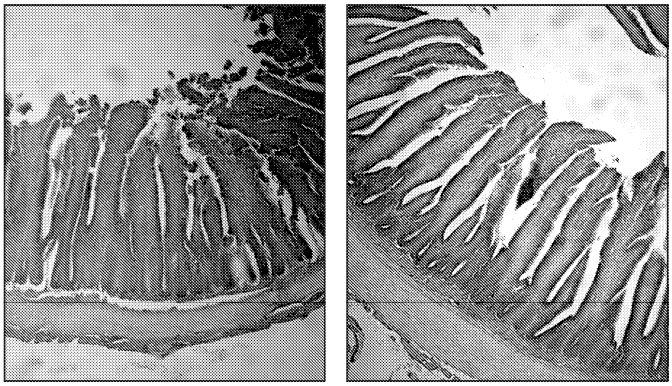
Фиг. 21



Фиг. 22



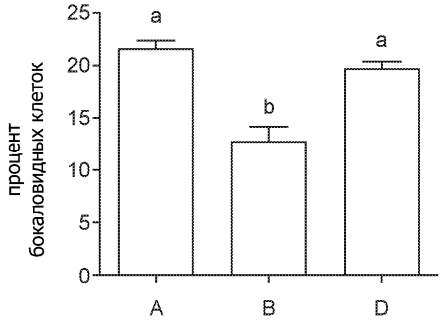
Фиг. 23



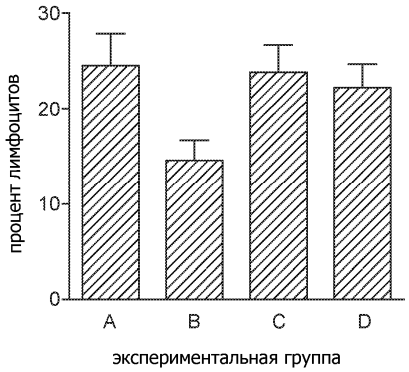
экспериментальная группа B (стимуляция)

экспериментальная группа D (олигосахарид из Примера 9.2)

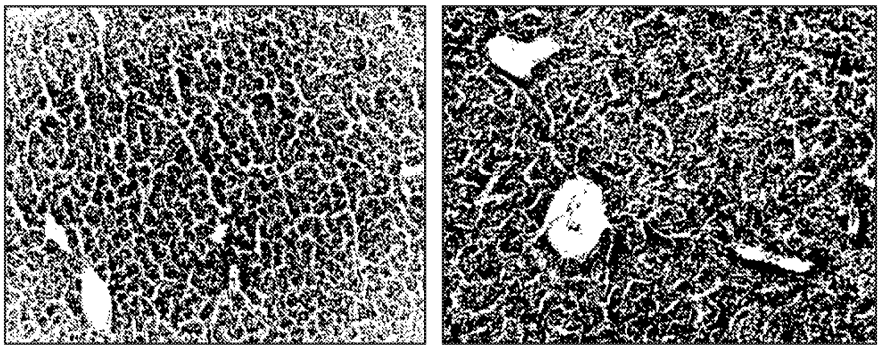
Фиг. 24



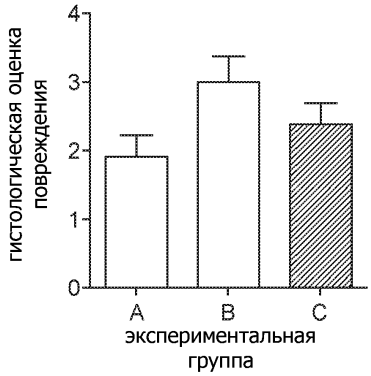
Фиг. 25



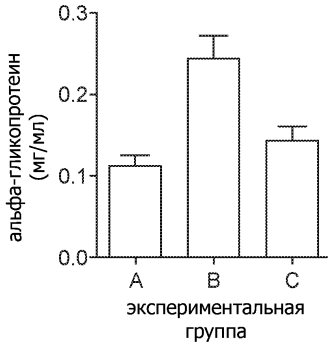
Фиг. 26



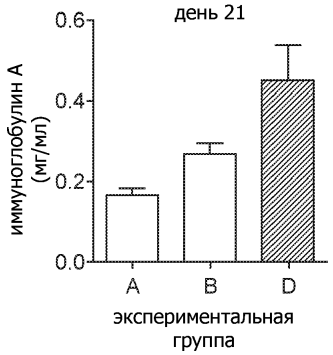
Фиг. 27A



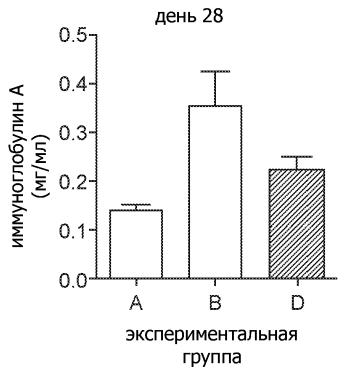
Фиг. 27B



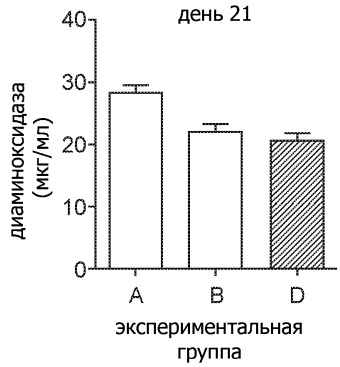
Фиг. 27C



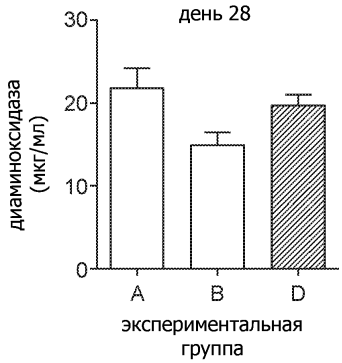
Фиг. 28A



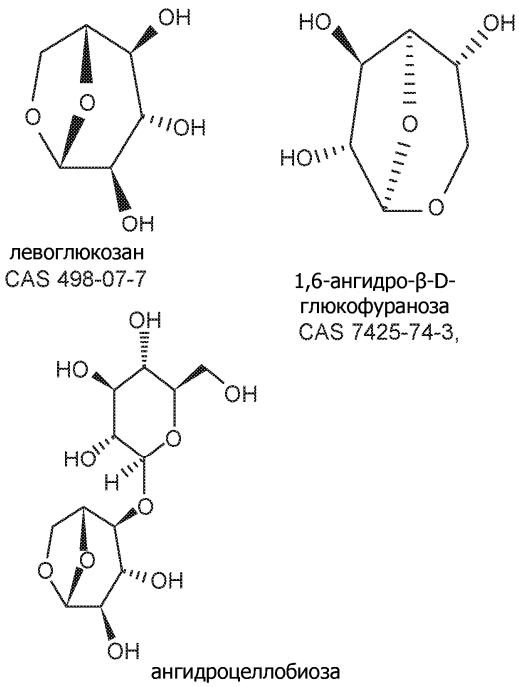
Фиг. 28B



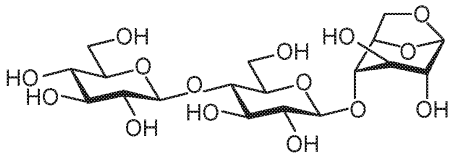
Фиг. 29A



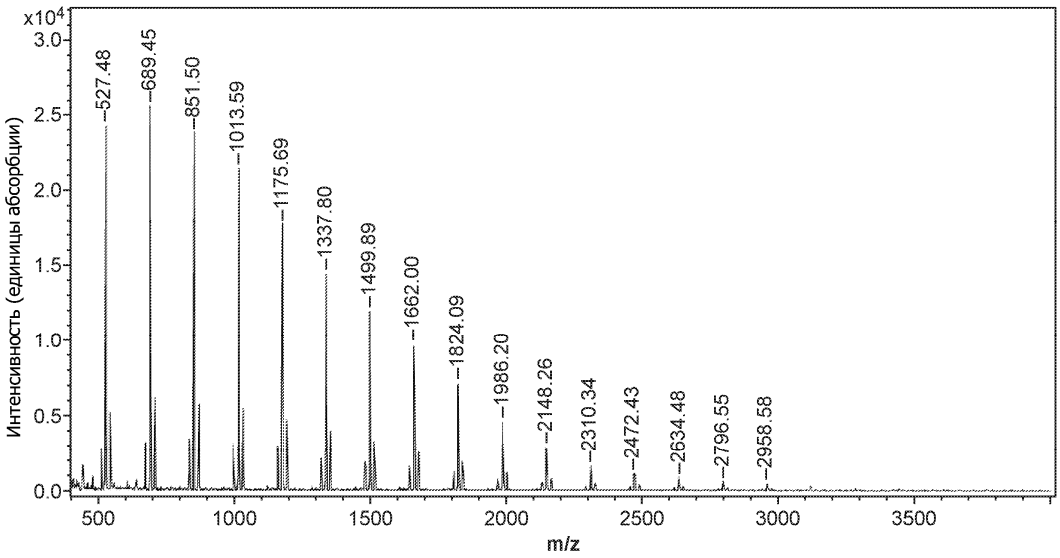
Фиг. 29B



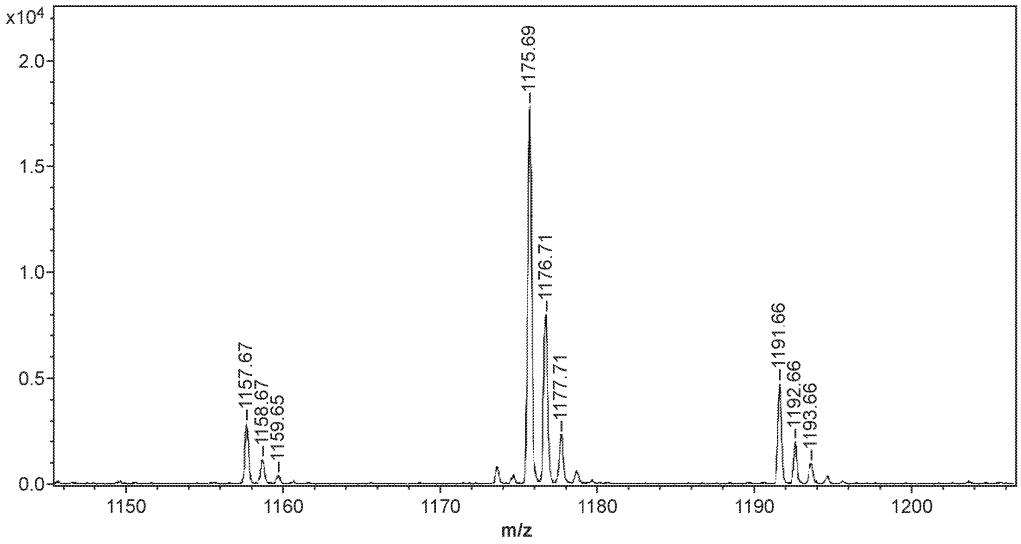
Фиг. 30



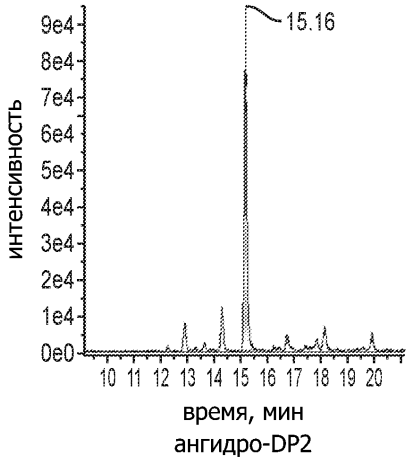
Фиг. 31



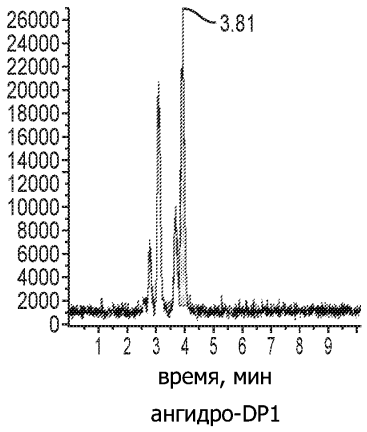
Фиг. 32А



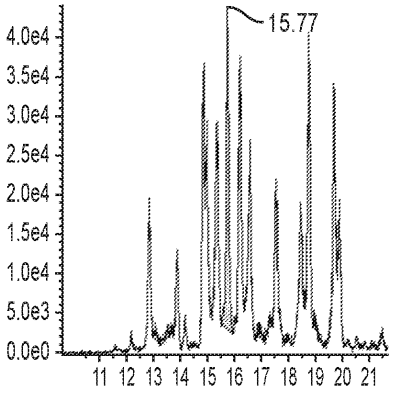
Фиг. 32B



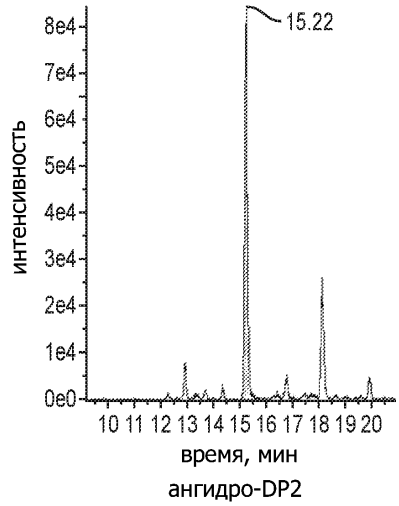
Фиг. 33A



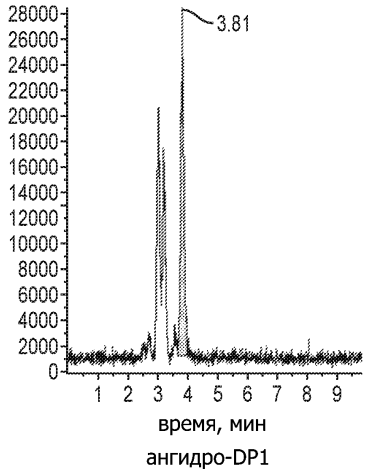
Фиг. 33B



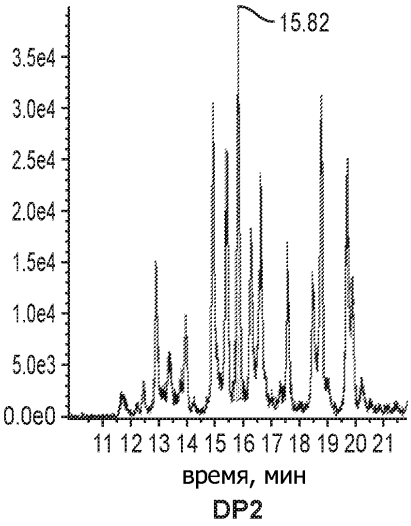
Фиг. 33C



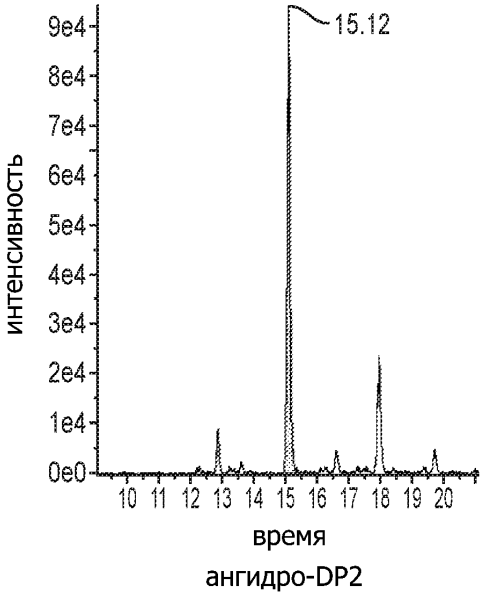
Фиг. 34A



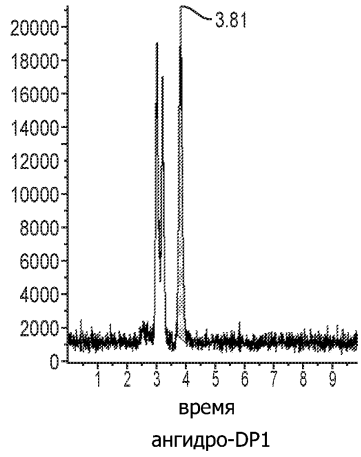
Фиг. 34B



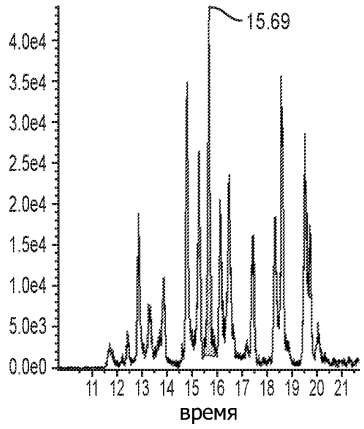
Фиг. 34C



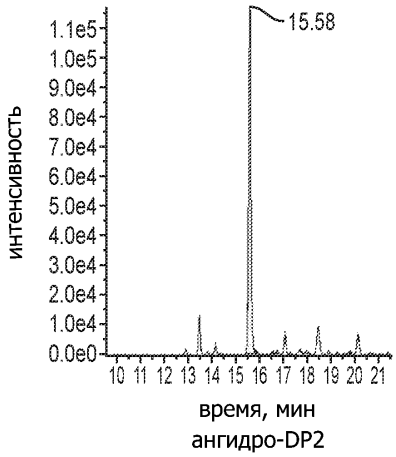
Фиг. 35A



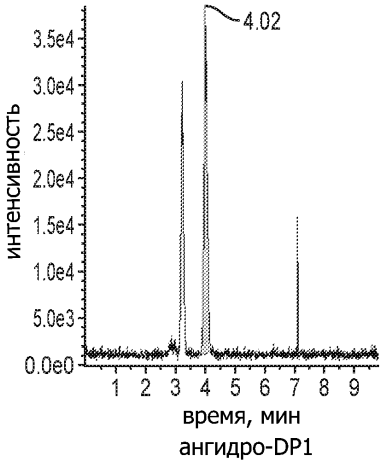
Фиг. 35B



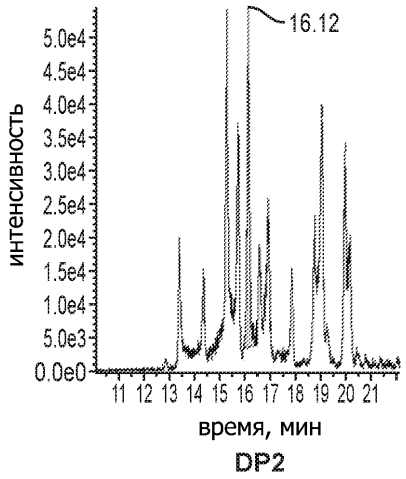
Фиг. 35C



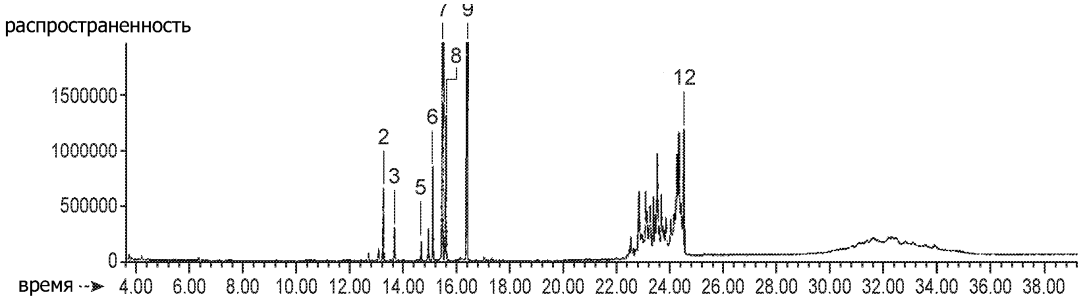
Фиг. 36A



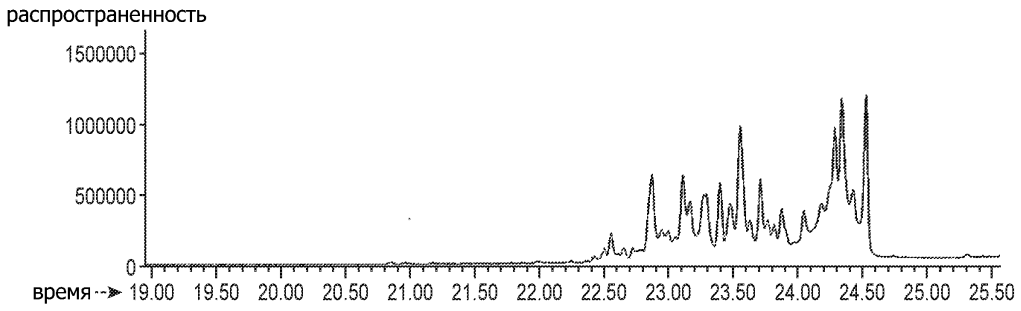
Фиг. 36B



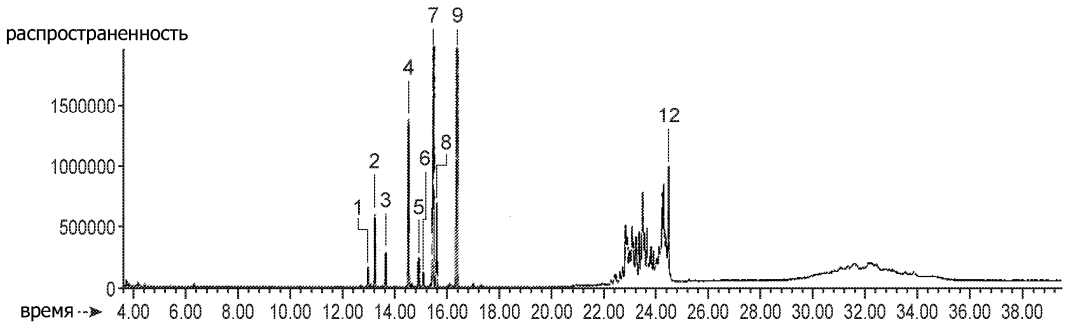
Фиг. 36C



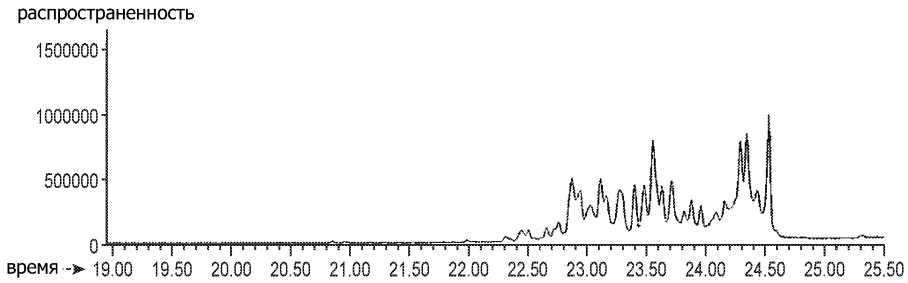
Фиг. 37A



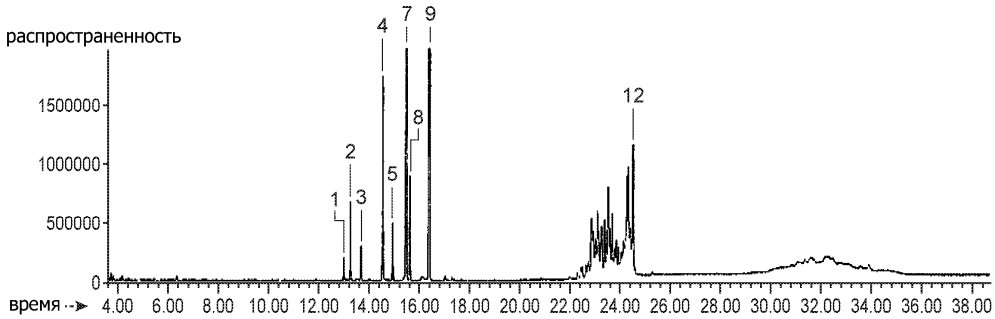
Фиг. 37B



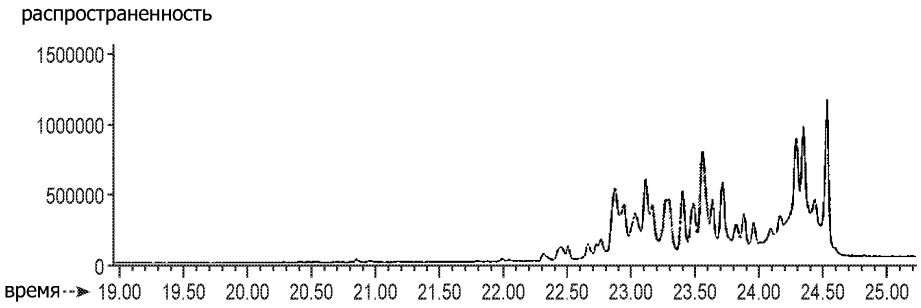
Фиг. 38A



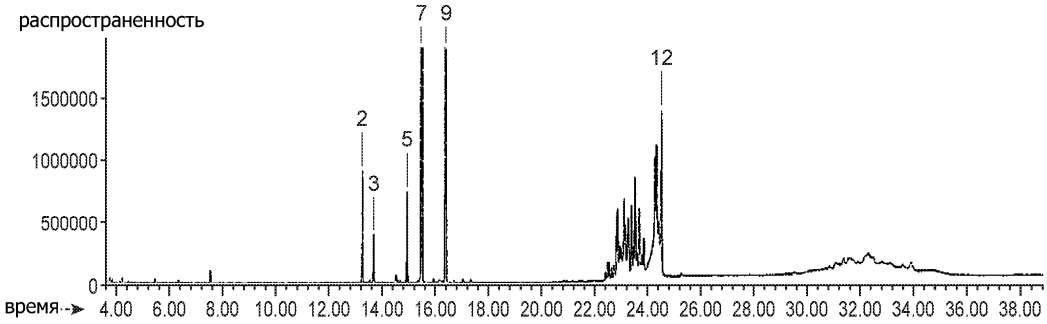
Фиг. 38B



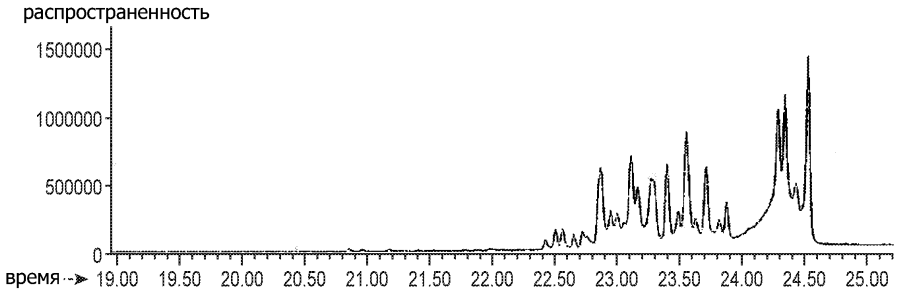
Фиг. 39A



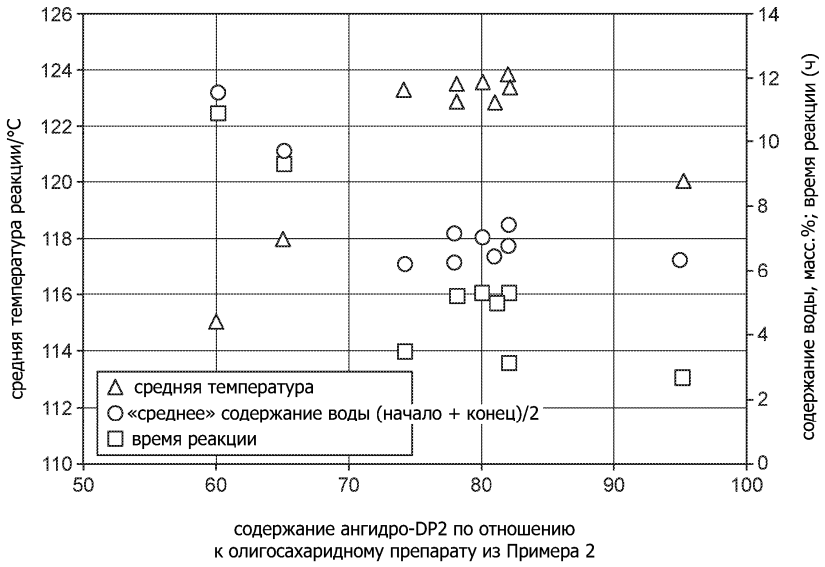
Фиг. 39B



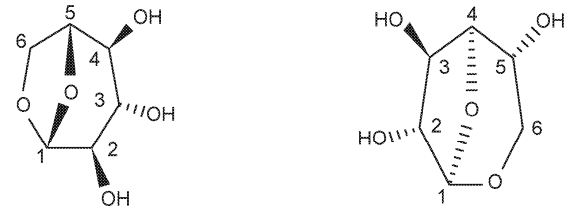
Фиг. 40A



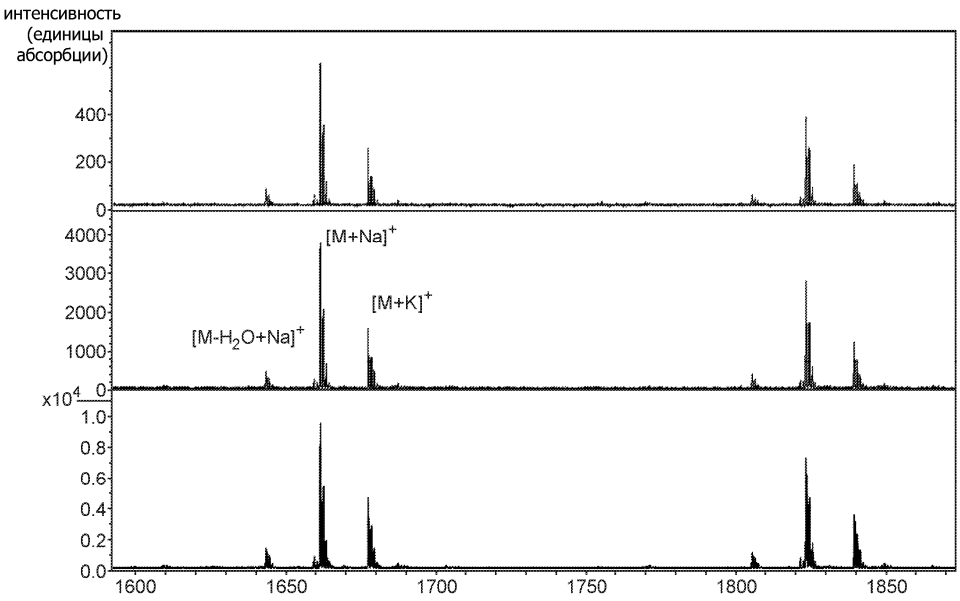
Фиг. 40B



Фиг. 41



Фиг. 42



Фиг. 43

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2