

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 499 025**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009** **E 09752310 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014** **EP 2344167**

54 Título: **Inhibidores de unión de E. coli F18⁺**

30 Prioridad:

01.10.2008 GB 0817908

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

26.09.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE**

72 Inventor/es:

**CODDENS, ANNELIES;
COX, ERIC y
TENEBERG, SUSANN EVA**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 499 025 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de unión de *E. coli* F18⁺

- 5 La presente invención se refiere al determinante de grupo sanguíneo A/B/H en las cadenas de glicosfingolípidos del núcleo tipo 1 como punto de reconocimiento de la proteína FedF de *Escherichia coli* F18 enterotoxigénica y verotoxinogénica fimbriada y el uso de compuestos que comprenden tales determinantes para el tratamiento de las infecciones de *Escherichia coli* F18⁺ en cerdos y en métodos de tamizaje
- 10 Antecedentes de la invención
- Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigénica (ETEC) y verotoxigénica (VTEC) son importantes causas de enfermedad en el hombre y animales.
- 15 Al adherirse a la mucosa, las bacterias se protegen de ser erradicadas por los mecanismos naturales de limpieza del huésped tales como el peristaltismo intestinal y la secreción de fluido. Además, al estar en estrecho contacto con las superficies de las mucosas, las bacterias tienen mejor acceso a los nutrientes disponibles y las toxinas secretadas se entregan cerca de su tejido objetivo. La adherencia a los tejidos del huésped está mediada por adhesinas expresadas en la superficie del organismo microbiano. Se sabe que las adhesinas bacterianas son lectinas que se combinan con
- 20 carbohidratos complementarios en las superficies de la célula huésped. Las adhesinas bacterianas son parte de las estructuras poliméricas típicas que se denominan fimbrias o pili. Las fimbrias, son filamentos delgados y flexibles con un diámetro de 2 a 4 nm sin agujero axial, mientras que el pili son estructuras rígidas con diámetro de 7-8 nm con agujero axial. Ambos se componen de subunidades principales que conforman el eje fimbrial complementadas con subunidades menores que median la adhesión o que tienen una función estructural. En la mayoría de los casos, la adhesina es una subunidad menor.
- 25 Típicamente, las adhesinas consisten en dos dominios: un dominio N-terminal de lectina-carbohidrato específico y un dominio C-terminal de pilina. Las estructuras cristalinas revelan que los dominios de lectina de estas adhesinas fimbriales tienen un pliegue de tipo-inmunoglobulina (tipo Ig) en común, aunque muestran poca o ninguna identidad de secuencia. El
- 30 dominio C-terminal de pilina conecta la adhesina al eje fimbrial y comparte el pliegue tipo-Ig altamente conservado e incompleto de las otras subunidades fimbriales.
- Algunos de los hidratos de carbono que se reconocen por adhesinas bacterianas se determinaron con éxito en el pasado (por ejemplo, los pilis de tipo 1 y P, fimbrias F5, fimbrias F17 y fimbrias S), mientras que otras estructuras receptoras de
- 35 carbohidratos permanecen sin resolver como fimbrias F4 y fimbrias F6.
- Las adhesinas de pili tipo 1 demuestran especificidad por manosa, pero tienen una considerable mayor afinidad por oligosacáridos tales como Man α 3Man β 4GlcNAc y Man α 6(Man α 3)Man α 6(Man α 3)Man. El receptor biológico para la adhesina de pili tipo 1 (FimH) en el tracto urinario es la glicoproteína uroplaquina la cual se expresa fuertemente por las células uroepiteliales diferenciadas. Además, la glicoproteína de Tamm-Horsfall que se secreta en la orina humana es reconocida por pili de tipo 1, proporcionando una primera línea de defensa contra las infecciones del tracto urinario.
- 40 *E. coli* P fimbriada causando infecciones del tracto urinario tienen especificidad por la galabiosa (Gala4Gal) presente en la globoserie de glicolípidos en por ejemplo eritrocitos humanos y células uroepiteliales. El isotipo mínimo del receptor se llama globotriasilceramida (GbO3), que es el residuo galabiosa enlazado por un residuo de β -glucosa a un grupo ceramida que ancla el receptor en la membrana. Se encontraron además, otros miembros de la globoserie, es decir GbO4 y GbO5, que se reconocen por 3 adhesinas expresadas por los alelos PapG (PapGI, PapGII y PapGIII), cada adhesina demostrando una especificidad diferente para un isotipo de receptor diferente. Considerando que la mayoría de las lectinas bacterianas reconocen azúcares no reductores terminales, las adhesinas de *E. coli* P fimbriada reconocen además azúcares internas.
- 50 Además del pili P, otras adhesinas manosa-resistente, por ejemplo las fimbrias S, se identificaron en cepas *E. coli* asociadas con infección séptica o del tracto urinario. Estas fimbrias se unen a sialil(α 2,3) galactosidasas en varias glicoproteínas de eritrocitos humanos y del epitelio renal, pero no a los lípidos.
- 55 Las adhesinas de fimbrias F5, asociadas con *E. coli* enterotoxigénica que causa diarrea en cerdos, terneros y corderos neonatos, reconocen NeuGc α 2-3Gal β 4GlcNAc. Esta estructura del receptor glicolípido se aisló primero de los eritrocitos equinos, pero se detecta además en los raspados de la mucosa del intestino de cerdito y ternero, funcionando así como receptor *in vivo* de *E. coli* F5⁺.

No todos los receptores de carbohidratos de cepas patogénicas de *E. coli* se identificaron en el pasado. Hasta el momento, no se han concluido los estudios que indican la especificidad de unión de *E. coli* F4⁺ a carbohidratos. Cada una de las variantes antigénicas F4ab, F4ac y F4ad se une a su propia estructura de carbohidrato. La secuencia Gal α 3Gal se reconoce por las fimbrias F4ab, mientras que Gal β 3GalNAc y Gal β 3/4GlcNAc son partes esenciales de los sitios receptores de la variante F4ac.

Las moléculas receptoras de las lectinas fimbriales son de naturaleza de glicoproteína o glicolípido. Para investigar los receptores de glicoproteína involucrados en la adhesión de varias bacterias, se usan técnicas de electroforesis en gel e inmunoelectrotransferencia, seguido por ensayos de superposición. Se identifican los receptores de glicolípidos de la adhesión bacteriana y caracterizan después mediante la separación por cromatografía en capa fina.

Se sabe que los carbohidratos que se reconocen por el pili de tipo 1 y fimbrias S están anclados en las proteínas, mientras que los receptores de carbohidratos para pili P y fimbrias F5 se ubican en los lípidos. Los sacáridos de glicolípidos son más fáciles de determinar ya que cada molécula de lípido lleva sólo porta una cadena de sacárido, a diferencia de las glicoproteínas que pueden tener diversas cadenas de carbohidratos con enlace N o O en una molécula.

La expresión de receptores para las bacterias patógenas se limita a las áreas restringidas del cuerpo, determinando el lugar donde puede producirse la infección. En algunos ejemplos, los receptores se expresan sólo durante un periodo limitado en la vida.

La especificidad de azúcar de fimbrias veces no está determinado únicamente por la adhesina, pero también puede ser modulada por el eje fimbrial.

La interacción entre la adhesina y el receptor pueden activar los procesos de transducción de señales que alteran la expresión génica tanto en las células bacterianas como huésped.

En cerdos recién destetados, la *E. coli* F18 fimbriada que producen entero- y/o verotoxinas inducen diarrea y/o enfermedad del edema, contando con pérdidas económicas sustanciales en la industria porcina.

Estructuras fimbriales F18 se expresan por cepas *E. coli* F18⁺ que median la adhesión con el borde intestinal en cepillo. Las fimbrias F18 se expresan por el agregado de genes *fed* (fimbrias asociadas con la enfermedad del edema) y típicamente están compuestas de múltiples copias de la principal subunidad FedA mientras que unas subunidades menores de FedF sólo se presentan en pequeñas cantidades. FedF se determinó que es la subunidad adhesiva.

El dominio de unión de FedF está situado en la mitad del amino-terminal de la proteína, como se encuentra en muchas otras adhesinas bacterianas. La región esencial de unión se mapeó entre los aminoácidos 60 y 109 y los residuos de aminoácidos cargados Lis-72, His-88 y His-89 se encontraron que eran importantes para la unión al receptor. Estos residuos pueden estar implicados ya sea directamente en interacción con el receptor o podrían influenciar en la estructura terciaria del bolsillo de unión.

Una etapa crucial en la patogénesis de *E. coli* F18⁺ es la unión inicial a un receptor específico (F18R) en el epitelio intestinal porcino. Algunos cerdos se encuentran que son resistentes a la colonización por *E. coli* F18⁺ debido a la falta de expresión de F18R. El estado F18R en los cerdos se determina genéticamente con la expresión de control génico de F18R mapeado con el grupo de ligamiento halotano en el cromosoma 6 de cerdo. Este locus contiene dos genes candidatos, es decir, *FUT1* y *FUT2*, que codifican las α (1,2)fucosiltransferasas y el análisis de la expresión de ambos genes en el intestino delgado porcino reveló que el gen *FUT2* se expresó diferencialmente, mientras que el gen *FUT1* se expresó en todos los cerdos examinados. La secuenciación del gen *FUT1* de los cerdos siendo ya sea susceptibles o resistentes a las infecciones por *E. coli* F18⁺ mostraron un polimorfismo (G o A) en el nucleótido 307. La presencia del nucleótido A en ambos alelos (genotipo *FUT1*^{A/A}) condujo a una actividad enzimática significativamente reducida y se corresponde con el genotipo resistente de *E. coli* F18⁺, mientras que los cerdos susceptibles tuvieron el genotipo ya sea heterocigoto *FUT1*^{G/A} o homocigoto *FUT1*^{G/G}. Estos hallazgos condujeron al desarrollo de una prueba de PCR-RFLP para diferenciar entre los cerdos F18R positivos y F18R negativos. Esta prueba se describe en la patente de Estados Unidos US6596923 que se publicó el 22 de Julio de 2003.

Este prueba de ADN demostró que se correlaciona bien con la susceptibilidad *in vivo* de las infecciones por *E. coli* F18⁺ y por lo tanto se considera que es valioso en la predicción del fenotipo F18R. Sin embargo, aunque era un enfoque atractivo para eliminar las infecciones por *E. coli* F18⁺, no se usó como rutina la selección genética de cerdos resistentes a *E. coli* F18⁺.

coli en las granjas porcinas de Bélgica debido a los informes de la asociación genética con el alelo de susceptibilidad al estrés (*RYR1^T*) en la raza Landrace Suizo. Claramente, los genes que codifican el F18R se encontraron que estaban cercanos al locus de susceptibilidad al estrés en el cromosoma 6 porcino. Sin embargo, realizando la selección positiva de resistencia a *E. coli* F18⁺ en cerdos suizos, la frecuencia del alelo de resistencia *FUT1^A* puede elevarse a 0.42, mientras que originalmente no más que 5 a 10 % de esta población era resistente.

Al investigar aun más la asociación entre los alelos *FUT1^A* y *RYR1^T* en la población de cerdos de Bélgica, se encontró que no estaban asociados, revelando un nuevo potencial de esta estrategia de prevención.

Aunque la creación de una población de cerdos resistente a *E. coli* F18⁺ puede resolver de manera permanente el problema de las infecciones en cerdos por *E. coli* F18⁺, todavía se necesita comprobar que no se produzca la co-selección de rasgos no deseados, diferentes a la susceptibilidad al estrés. Adicionalmente, tomará varios años, sino décadas para establecer tal población. Así que, otra terapia anti-adhesivo basada en el receptor contra las infecciones por *E. coli* F18⁺ puede ser un gran beneficio para la industria porcina.

Se acometieron otras diversas aproximaciones para eliminar las infecciones por *E. coli* F18⁺ de las manadas porcinas.

Se realizaron ensayos de inmunización para proteger los cerdos contra *E. coli* F18⁺. Sin embargo, ninguna respuesta inmune protectora puede inducirse a pesar de que se realizaron muchas estrategias diferentes de inmunización. Esto es a diferencia de las infecciones por *E. coli* F4⁺, donde la inmunización oral con fimbrias F4 puede inducir una respuesta inmune protectora de la mucosa.

Inmunización de cerdos con cepas de *E. coli* F18⁺ de débil virulencia que no pueden practicarse debido a que estas cepas todavía producen enterotoxinas. La administración oral de fimbrias F18, encapsuladas en partículas de poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLGA) no pueden inducir cantidades significativas de anticuerpos séricos específicos a F18 ni una colonización reducida después del reto con *E. coli* F18⁺. En un estudio más reciente, sólo una baja respuesta inmune específica a F18 se puede inducir después de inmunización oral e intranasal con altas concentraciones de fimbrias F18 purificadas (30 mg y 1 mg, respectivamente) en el presencia del adyuvante LT(R192G) o CTA1-DD, respectivamente (Verdonck F, Cox E, van Gog K, Van der Stede Y, Duchateau L, Deprez P, Goddeeris BM, 2002. Vaccine 20:2995-3004). En otro estudio el suministro de la adhesina fimbrial F18 FedF en la mucosa intestinal se mejoró mediante el acoplamiento covalente de MBPFedF a fimbrias F4 (Tiels P., Verdonck F., Coddens A., Goddeeris B., Cox E., 2008. Vaccine, 26, 2154-2163). El producto acoplado puede inducir una respuesta inmune sistémica y local específica a FedF y conducir a una reducción en la excreción después del reto con *E. coli* F18⁺. Sin embargo, no se obtuvo protección completa.

Además varios métodos de protección pasiva contra las infecciones por *E. coli* F18⁺ en cerdos se probaron en el pasado.

Anticuerpos-F18 específicos presentes en la yema de huevo de gallina después de la inmunización de pollos con fimbrias F18 se administraron a los cerdos. Estos pueden reducir el derrame de *E. coli* F18⁺ y la disminución de la cantidad de diarrea y muerte después de la infección experimental en los cerdos. Anticuerpos específicos a la verotoxina II inyectada por vía intramuscular un día antes del destete puede proteger a los cerdos de los síntomas de la enfermedad del edema. Sin embargo, ya que no se obtiene reducción en la colonización de *E. coli* F18⁺, las cepas de *E. coli* F18⁺ aun aflorarán en el medio ambiente. Por lo tanto, es mejor interferir en la adhesión inicial de la bacteria con el huésped, que es la primera etapa en el proceso de infección.

La colonización del intestino porcino con *E. coli* F18⁺ puede reducirse mediante la administración oral de polvo de plasma no inmune, derivado de la sangre de los cerdos sanos de carnicería. Este efecto protector del polvo de plasma porcino se sugirió que se debe a las porciones de glicanos presentes en las glicoproteínas plasmáticas, aunque esto necesita una prueba adicional. Otro enfoque contra *E. coli* F18⁺ puede ser la sustitución por proteínas de origen animal de algunas o la totalidad de las proteínas de origen vegetal suplementadas al pienso de cerdo (patente de Estados Unidos núm. US 6,355,859 publicada el 12 de Abril del 2002: Interactions between genotype and diet in swine that prevent *E. coli* associated intestinal disease). Las proteínas de origen animal adecuadas incluyen leche, plasma sanguíneo y harina de pescado. Un inconveniente de estos últimos métodos es que la concentración de carbohidratos requerida para una inhibición eficaz de la adhesión *in vitro* e *in vivo* es alta.

Aunque la función biológica de los antígenos del grupo histo-sanguíneo no está dilucidada todavía, se informó antes que los antígenos del grupo histo-sanguíneo pueden actuar como receptores para los organismos patógenos. Diversas bacterias, incluyendo *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni*, demostraron que utilizan los determinantes de los grupos sanguíneos como receptores para facilitar su colonización. Mientras que *C. jejuni* se une al determinante del grupo sanguíneo H tipo 2

(Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS, 2003. J Biol Chem. 278(16):14112-20), el receptor principal de *H. pylori* es el determinante Le^b (Fucα2Galβ3(Fucα4)GlcNAc),), junto con un determinante H tipo 1c de afinidad de unión inferior (Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S, 1993. Science. 262(5141):1892-5). La unión al determinante Le^b y H tipo 1 está mediada por la adhesión a BabA. Recientemente la adaptación de la adhesina BabA a los antígenos del grupo sanguíneo fucosilado de mayor prevalencia se describió en la población local. En Europa y los Estados Unidos, donde los fenotipos de los grupos sanguíneos ABO son comunes en la población, las cepas de *H. pylori* (cepas generales designadas) se unen a los determinantes del grupo sanguíneo A, B, y O tipo 1; sin embargo, en poblaciones tal como la población nativa de América del Sur, que sólo tienen el fenotipo del grupo sanguíneo O, las cepas de *H. pylori* (cepas especializadas designadas) se unen sólo a los determinantes del grupo sanguíneo O (Le^b y el H tipo 1).

La unión viral a antígenos de grupos sanguíneos se ha reportado también. Trisacáridos H tipo 2 del grupo histo-sanguíneo en el epitelio de conejo se reconocen por el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) y H tipo 1 y H tipos 3/4 en las células epiteliales gastroduodenales de individuos secretores se usan por el virus de Norwalk como ligandos.

La síntesis de antígenos del grupo histo-sanguíneo requiere diversas glicosiltransferasas que actúan sobre los oligosacáridos precursores, tales como cadenas precursoras tipo 1 (Galβ3GlcNAcβ-R) y tipo 2 (Galβ4GlcNAcβ-R). Estos precursores se convierten en los antígenos H por la acción de una α(1,2)fucosiltransferasa que añade una fucosa en un enlace α1,2. En los cerdos, se identificaron dos genes que codifican las fucosiltransferasas, *FUT1* y *FUT2*, pero sólo el polimorfismo en el par de bases 307 de *FUT1* se encontró que se asociaba con la resistencia a las infecciones por *E. coli* F18⁺. *FUT1* humano y porcino preferentemente las cadenas precursoras fucosiladas tipo 2 *in vitro* apuntan a un enlace entre las cadenas de carbohidratos tipo 2 y el F18R. Sin embargo, algunos estudios indican que *FUT1* puede ser responsable de la α1,2 fucosilación de las cadenas tipo 1 *in vitro* e *in vivo* (Liu YH, Fujitani N, Koda Y, Kimura H, 1998. J Histochem Cytochem. 46:69-76, Mathieu S, Prorok M, Benoliel AM, Uch R, Langlet C, Bongrand P, Gerolami R, El-Battari A, 2004. Am J Pathol. 164:371-383).

Un estudio anterior Snoeck y otros (Veterinary Microbiology 100, (2004) 241-246) describe la inhibición de la adhesión de *E. coli* F18⁺ en enterocitos de la vellosidad intestinal de cerdo por el anticuerpo monoclonal contra los antígenos del grupo sanguíneo H-2. Una publicación de Coddens y otros (Veterinary Microbiology 122, (2007) 332-341) informa que la expresión dependiente de la edad del receptor de *E. coli* F18⁺ en las células epiteliales del intestino porcino se correlaciona positivamente con la presencia de antígenos del grupo histo-sanguíneo H en las cadenas del núcleo tipo 2.

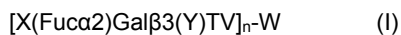
Estos estudios previos son correlativas y sugieren que el receptor F18 contiene el antígeno del grupo sanguíneo H-2 en su estructura de carbohidrato. Sin embargo, la identidad y la naturaleza de la molécula F18R permaneció difusa.

Inesperadamente, la presente invención demuestra que la adhesina FedF de *E. coli* F18 fimbriada reconoce glicosfingolípidos (GSL), con los determinantes del grupo sanguíneo A, B o H en las cadenas del núcleo tipo 1 y tipo 4, mientras que no se reconocen los determinantes del grupo sanguíneo A, B o H en las cadenas del núcleo tipo 2. Los GSL tipo 3 A puros no estuvieron disponibles para la prueba.

Así, el problema solucionado por la presente invención es la identificación de estructuras de carbohidratos que se reconocen por la *E. coli* F18⁺. La identificación de la interacción de los determinantes de los grupos sanguíneos A/B/H anteriormente mencionados en las cadenas del núcleo tipo 1 y tipo 4 con *E. coli* F18⁺ puede aplicarse para las estrategias de prevención basadas en el receptor contra las infecciones por *E. coli* F18⁺ en los cerdos. A diferencia de los antibióticos, la administración de inhibidores específicos para la interacción entre *E. coli* F18⁺ y el receptor F18 es una forma suave y segura de contrarrestar las infecciones bacterianas. Además, ya que las estrategias de prevención basadas en receptores no actúan matando o deteniendo el crecimiento del agente infeccioso, se asume que las cepas resistentes a tales agentes surgirán en menor medida en comparación con cepas resistentes a los antibióticos. La identificación de las estructuras de carbohidratos que se reconocen por *E. coli* F18⁺ permite suplementar el pienso para cerdo con moléculas muy específicas que interfieren con la interacción entre *E. coli* F18⁺ y el epitelio intestinal en concentraciones bajas al comparar con inhibidores menos específicos, tal como por ejemplo, plasma sanguíneo, o las terapias de combinación tal como por ejemplo se describen en WO2004/002495.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere al uso de un compuesto para la unión a *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF en donde dicho compuesto es un compuesto de la Fórmula (I)



en donde

X está ausente, Gala3 o GalNAc α 3 y cuando X está ausente, entonces Y está ausente;
Y está ausente o Fuca4;
T está ausente o ZNAc ϵ 3;

y en donde Z es Glc o Gal; y
 ϵ es α o β ;

V está ausente o un mono-o polisacárido;
n es 1 o más; y

W está ausente o un portador capaz de unir n (uno o más) cadenas de polisacáridos, particularmente de acuerdo con las reivindicaciones.

En una modalidad adicional de la presente invención V es UGal β 4Glc β 1; y en donde U está ausente, Gala4, Gal β 3GlcNAc β 3, o (Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3

En una modalidad adicional, W es un mono- o polisacárido, una proteína, un lípido, un glicolípido, una glicoproteína, un glicosfingolípido o una ceramida.

En una modalidad particular de la presente invención X es Gala3 o GalNAc α 3; Z es Glc o Gal y Y está ausente.

En una modalidad particular de la presente invención X, Y, T y V están ausentes.

En aún una modalidad adicional ϵ es β y/o Z es Glc.

Como una modalidad adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto como el descrito en la presente en donde dicho compuesto es un compuesto de la Fórmula (Ia)

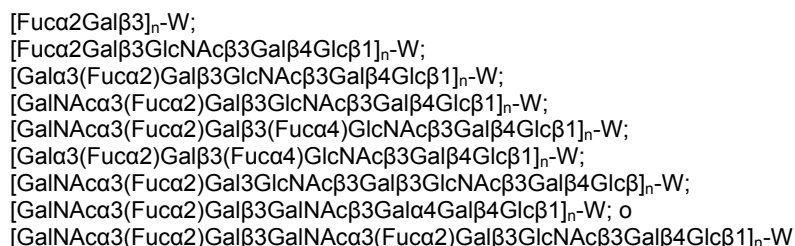


en donde

U está ausente, Gala4, Gal β 3GlcNAc β 3, o (Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3

Otra modalidad de la presente invención es el uso de un compuesto como el descrito en la presente en donde W está ausente o es ceramida, y en donde dicha ceramida es d18:1-16:0, t18:0-16:0, t18:0-h16:0, t18:0-h22:0 o t18:0-h24:0.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un compuesto como el descrito en la presente, en donde dicho compuesto es



La invención se relaciona además con un compuesto de la Fórmula (I) o (Ia) en donde el compuesto es



La invención se refiere además a los compuestos descritos anteriormente para su uso como un medicamento, para uso en el tratamiento de las infecciones por *E. coli* F18⁺ en cerdos particularmente el tratamiento de la diarrea posterior al destete y la enfermedad del edema en los cerdos o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las infecciones por

E. coli F18⁺ en cerdos particularmente en el tratamiento de la diarrea posterior al destete y la enfermedad del edema en los cerdos.

La descripción también describe métodos de detección tales como el uso de un compuesto como se ha descrito anteriormente en un método para identificar moléculas que afectan a la unión entre *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF y dicho compuesto. Particularmente, la invención se refiere a un método para identificar las moléculas que se unen a los compuestos descritos anteriormente, dicho método que comprende:

- poner en contacto la molécula que se prueba con dicho compuesto,
- y
- determinar si dicha molécula se une a dicho compuesto.

La invención se refiere además a un método para identificar las moléculas que afectan a la unión entre *E. coli*, F18⁺ fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF y el compuesto descrito anteriormente que comprende:

- poner en contacto la molécula que se prueba con *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesinas F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF; y dicho compuesto,
- y
- determinar si dicha molécula afecta la unión de *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF con dicho compuesto.

En este método *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesinas F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF, el compuesto como se describió anteriormente y/o la molécula que se prueba pueden marcarse. El compuesto, la molécula, la *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesinas F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF se pueden presentar en un soporte sólido, una célula o un tejido. El método puede comprender además:

- realizar un ensayo de unión en el cromatograma; o
- realizar la prueba de adhesión a las vellosidades.

La invención describe además las moléculas identificadas en los métodos descritos anteriormente. Esta molécula puede ser una lectina, un anticuerpo, una proteína, una glicoproteína, un glicolípido, un glicoesfingolípido, una molécula pequeña o un mimetizador sintético de un compuesto como se describió anteriormente. Dicha molécula puede ser un análogo del receptor de F18R o una molécula que bloquea el receptor de F18R.

La invención describe además una composición farmacéutica que comprende portadores farmacéuticamente aceptables y como un ingrediente activo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se describió anteriormente. En otra modalidad, la invención describe un proceso para preparar una composición farmacéutica de este tipo en donde se mezclan íntimamente los portadores farmacéuticamente aceptables y un compuesto como se describió anteriormente.

Un aspecto adicional de la invención es un alimento o bebida aditivo que comprende un compuesto o una molécula como se describió anteriormente de acuerdo con las reivindicaciones. Otro aspecto de la invención se suplementa el pienso para cerdo con un compuesto, una molécula, una composición farmacéutica o un aditivo alimentario tal como se describe anteriormente de acuerdo con las reivindicaciones.

Finalmente la presente invención describe además el uso de un compuesto, una molécula, una composición farmacéutica, un aditivo de alimento o bebida o pienso para cerdo como se describió anteriormente para diferenciar entre cerdos F18R positivos y negativos.

Descripción de las figuras

Figura 1: Efectos del tratamiento con acetona, metanol, tritón® X-100 al 1% y NaIO₄ en la adherencia de *E. coli* F18-fimbriada y *E. coli* F4ac-fimbriada en las vellosidades intestinales porcinas. El ensayo se realizó como se describe en el "Ejemplo 1". El número de cerdos investigados se indica como "n".

Figura 2: Unión del recombinante de *E. coli* que expresa las fimbrias F18 (cepa HB101(pIH120)), y fimbrias F18 con la delección de la adhesina FedF (cepa HB101(pIH126)), a mezclas de glicoesfingolípidos del epitelio de intestino delgado en cromatogramas de capa-delgada. Los glicoesfingolípidos se separaron en placas de gel de sílice con respaldo de

aluminio y se visualizaron con anisaldehído (A). Cromatogramas duplicados se incubaron con bacterias marcadas-S³⁵ (B y C), y los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el determinante del grupo sanguíneo A (D), seguido por autorradiografía durante 12 h, como se describe en el "Ejemplo 5". El sistema de solventes usado fue cloroformo/metanol/agua (60:35:8, por volumen). Los carriles fueron: Carril 1, glicosfingolípidos no-ácidos de intestino delgado de conejo, 40 µg; Carril 2, glicosfingolípidos no-ácidos de epitelio de intestino delgado de cerdito de 3 días de edad, 40 µg; Carril 3, glicosfingolípidos ácidos de epitelio de intestino delgado de cerdito de 3 días de edad, 40 µg; Carril 4, glicosfingolípidos no-ácidos de epitelio de intestino delgado de cerdo adulto (cerdo núm. 1), 40 µg; Carril 5, glicosfingolípidos ácidos de epitelio de intestino delgado de cerdo adulto (cerdo núm. 1), 40 µg; Carril 6, glicosfingolípidos no-ácidos de epitelio de intestino delgado de cerdo adulto (cerdo núm. 2), 40 µg.

Figura 3: Nano-LC/MS del sacárido obtenido por digestión con la endoglicoceramidasa II de *Rhodococcus* de la fracción O-I del glicosfingolípidos de unión a la *E. coli* F18 fimbriada del epitelio intestinal de cerdo del grupo sanguíneo O. Espectros MS de los iones [M-H] en *m/z* 852 de los sacáridos derivados del glicosfingolípidos de unión a la *E. coli* F18-fimbriada del epitelio intestinal de cerdo del grupo sanguíneo O (fracción O-I) (A), referencia H pentaglicosilceramida tipo 1 (B), y referencia H pentaglicosilceramida tipo 2 (E).

Figura 4: Caracterización de la heptaglicosilceramida de unión a la *E. coli* F18 fimbriada del epitelio intestinal de cerdo del grupo sanguíneo A (fracción A-II) por espectrometría de masas y RMN protónica.

(A) Espectro de masa del ión negativo de FAB de la fracción A-II. Por encima del espectro es una fórmula de interpretación que representa la especie con ceramida t18:0-h24:0. El análisis se realizó como se describe en el "Ejemplo 7".

(B) Región anomérica de 600 MHz del espectro de RMN protónica de la fracción A-II (30 °C). La muestra se disolvió en dimetil sulfóxido-D₂O (98:2, por volumen) después del intercambio de deuterio.

Figura 5: Espectro de masas de iones negativos de la fracción A-III del glicosfingolípidos de unión a la *E. coli* F18 fimbriada, aislada del epitelio intestinal de cerdo del grupo sanguíneo A.

Por encima del espectro están las fórmulas de interpretación que representan una octaglicosilceramida con ceramida t18:0-16:0 y una nonaglicosilceramida con ceramida t18:0-h24:0, respectivamente. El análisis se realizó como se describe en el "Ejemplo 7".

Figura 6: Efecto de la pre-incubación de *E. coli* F18-fimbriada con oligosacáridos. La cepa 107/86 de *E. coli* 18⁺ se incubó con el pentasacárido o lacto-*N*-tetraosa sacárido del grupo sanguíneo H tipo I en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Después de eso, las suspensiones se utilizaron en el ensayo *in vitro* de adhesión a las vellosidades.

Figura 7: Efecto de la pre-incubación de *E. coli* F18⁺ con oligosacáridos. La cepa 107/86 de *E. coli* F18⁺ se incubó con el pentasacárido del grupo sanguíneo H tipo 1 (H5-1), hexasacárido del grupo sanguíneo A tipo 1 (A6-1), hexasacárido o lacto-*N*-tetraosa sacárido (LNT) del grupo sanguíneo B tipo 1 (B6-1) en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Después de eso, las suspensiones se utilizaron en el ensayo *in vitro* de adhesión a las vellosidades.

Figura 8: Efecto de la pre-incubación de *E. coli* F18⁺ con azúcares de grupos sanguíneos multivalentes. La cepa 107/86 *E. coli* F18⁺ se incubó con diferentes concentraciones del pentasacárido del grupo sanguíneo H tipo I conjugado con HSA (H5-1/HSA) o hexasacárido del grupo sanguíneo A tipo 1 conjugado con HSA (A6-1/HSA) en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Después de eso, las suspensiones se utilizaron en el ensayo *in vitro* de adhesión a las vellosidades.

Figura 9: Efecto de la preincubación de *E. coli* F18⁺ con el disacárido del grupo sanguíneo H. La cepa 107/86 de *E. coli* F18⁺ se incubó con diferentes concentraciones (0.2 mg o 1 mg) del disacárido del grupo sanguíneo H (Fuca2Gal) en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Después de eso, las suspensiones se utilizaron en el ensayo *in vitro* de adhesión a las vellosidades.

Descripción detallada

Definiciones

La nomenclatura de glicolípidos y carbohidratos sigue las recomendaciones de la Comisión sobre Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB (CBN para lípidos: Eur. J. Biochem. (1998) 257, 293). Se asume que Gal, Glc, GlcNAc, GalNAc y NeuAc son de configuración D, Fuc de configuración L, y todas las unidades de monosacáridos se presentan en la forma de piranosa.

Por el término "fimbrias F18" se entiende filamentos poliméricos delgados, flexibles usados por las cepas de *E. coli* F 18⁺ para adherirse a los tejidos del huésped.

5 Por el término "adhesina F18" se entiende una lectina fimbrial que media la adhesión del F18R.

Por el término "FedF" se entiende la subunidad menor de adhesión de las fimbrias F 18 que se expresa por el agregado génico *fed*.

10 Por el término "dominio de unión al receptor de FedF" se entiende una región situada en la mitad del amino-terminal de la proteína FedF, esencial para la unión y mapeo entre los aminoácidos 60 y 109.

Por el término "la prueba de adhesión a las vellosidades" se entiende el ensayo como se describe en el Ejemplo 1.

15 Por el término "receptor F18 o F 18R" se entiende un receptor de carbohidrato específico sobre el epitelio intestinal porcino al que puede adherirse la *E. coli* F18⁺.

Por el término "cerdo positivo a F18R" se entiende el genotipo heterocigoto *FUT1*^{G/A} del porcino susceptible a *E. coli* F18⁺ o el genotipo homocigoto *FUT1*^{G/G} del porcino susceptible a *E. coli* F18⁺.

20 Por el término "cerdo negativo a F18R" se entiende el genotipo *FUT1*^{A/A} del porcino resistente a *E. coli* F18⁺.

Por el término "compuesto" se entiende un compuesto de la Fórmula (I) o (Ia).

25 Por el término "molécula" se entiende un agente identificado en los métodos de tamizaje de la invención.

Por el término "marcado" se entiende un compuesto, una molécula o una *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF marcados con agentes de marcaje.

30 Por el término "portador" se entiende cualquier sustancia o estructura a la que puede adherirse un sacárido basado en sus propiedades físicas o químicas.

Por el término "tratamiento" se entiende cualquier tratamiento de una enfermedad y/o afección en un sujeto, particularmente un animal, e incluye: (i) evitar una enfermedad y/o afección en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad y/o afección pero que aún no se ha diagnosticado que la tiene; (ii) inhibir la enfermedad y/o afección, es decir, detener su desarrollo; (iii) aliviar la enfermedad y/o afección, es decir, provocar la regresión de la enfermedad y/o afección.

35 *Modalidades de la invención*

40 *Usos*

La presente invención se refiere al uso de un compuesto para la unión a la *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF en donde dicho compuesto es un compuesto de la Fórmula (I)

45
$$[X(\text{Fuc}\alpha 2)\text{Gal}\beta 3(\text{Y})\text{TV}]_n\text{-W} \quad (\text{I})$$

en donde

X está ausente, Gala3 o GalNAc α 3 y cuando X está ausente, entonces Y está ausente;

50 Y está ausente o Fuc α 4;

T está ausente o ZNAc ϵ 3;

y en donde Z es Glc o Gal; y

ϵ es α o β ;

55 V está ausente o un mono-o polisacárido;

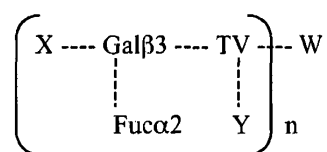
n es 1 o más; y

W está ausente o es un portador capaz de unir n cadenas de polisacáridos, particularmente de acuerdo con las reivindicaciones.

Como se usa en la presente descripción cualquier monosacárido escrito entre paréntesis regulares es decir () se encuentra ramificado de la cadena principal del polisacárido y se une al siguiente monosacárido en línea de dicha cadena de polisacárido, como se ejemplifica más abajo.

Como se usa en la presente descripción por 'polisacárido' se entiende que incluye cualquier combinación posible de dos o más monosacáridos que dan lugar a una cadena, mientras que por 'cadena(s) de polisacárido(s)' particularmente se entiende $[X(\text{Fuca}2)\text{Gal}\beta 3(Y)\text{TV}]$, en donde X, Y, T y V se definen como anteriormente en la fórmula (I).

Por ejemplo la Fórmula (I) $[X(\text{Fuca}2)\text{Gal}\beta 3(Y)\text{ZNAc}3V]_n\text{-W}$, puede representarse esquemáticamente por:



en donde $[X(\text{Fuca}2)\text{Gal}\beta 3(Y)\text{TV}]$ representa la cadena de polisacárido unida al portador W.

En el contexto de la presente invención, un grupo interesante de compuestos son los compuestos de la Fórmula (I) o (Ia) en donde cuando X está ausente y Y está ausente entonces Z es Glc.

Otro grupo interesante de compuestos son los compuestos de la Fórmula (I) en donde X, Y T y V están ausentes.

Aun otro grupo interesante de compuestos son los compuestos de la Fórmula (I) o (Ia), en donde una cadena de polisacárido se une a dicho W o en donde W es un portador multivalente de la cadena de polisacárido de la presente invención.

Cuando W es un portador multivalente de la cadena de polisacárido puede portar más de uno, más de 1000 ejemplares de la cadena de polisacárido, entre 2 y 1000 ejemplares de la cadena de polisacárido, entre 500 a 1000 ejemplares de la cadena de polisacárido, entre 2 y 500 ejemplares de la cadena de polisacárido, entre 2 y 300 ejemplares de la cadena de polisacárido, entre 2 y 100 ejemplares de la cadena de polisacárido, entre 2 y 50 ejemplares de la cadena de polisacárido, preferentemente 30; 29; 28; 27; 26; 25; 24; 23; 22; 21; 20; 19; 18; 17; 16; 15; 14; 13; 12; 11; 10; 9; 8; 7; 6; 5; 4; 3 o 2 ejemplares de la cadena de polisacárido.

W puede ser proteínas, lípidos, glicolípidos, glicoproteínas, glicosfingolípidos, ceramidas, lectinas, anticuerpos, inmunoglobulinas, mimetizadores sintéticos de los portadores antes mencionados, moléculas orgánicas, moléculas pequeñas, químicos, nanopartículas, perlas, geles, etc....

Cuando W está ausente, las secuencias de oligosacáridos de acuerdo con la presente invención son oligosacáridos libres, lo que significa que las secuencias de oligosacáridos no se enlazan a otras estructuras mono- u oligosacáridos, y se presentan como secuencias terminales de oligosacáridos no reductores. Cuando se une al portador W, la secuencia de oligosacárido se conjuga preferentemente a partir del extremo reductor de la secuencia de oligosacárido, aunque pueden usarse también otras posiciones de enlace que se toleran en la unión a *E. coli* F18⁺ anteriormente mencionada. Como consecuencia, en una modalidad particular, la presente invención proporciona las secuencias de oligosacáridos de acuerdo con la presente invención como un oligosacárido libre o como un conjugado, particularmente un conjugado polivalente a partir del terminal reductor del residuo de oligosacárido.

Otro grupo interesante de compuestos dentro del contexto de la presente invención son los compuestos de la Fórmula (I) o (Ia), en donde W es ceramida y en donde dicha ceramida es d18:1-16:0, t18:0-16:0, t18:0-h16:0, t18:0-h22:0 o t18:0-h24:0.

En la nomenclatura abreviada de los ácidos grasos y bases, el número antes de los dos puntos se refiere a la longitud de cadena de carbono y el número después de los dos puntos indica el número total de dobles enlaces en la molécula. Los ácidos grasos con un grupo 2-hidroxí se indican con el prefijo h antes de la abreviatura por ejemplo h16:0. Para bases de

cadena larga, d indica dihidroxi y t trihidroxi. Así d18:1 designa a la esfingosina (1,3-dihidroxi-2-aminooctadeceno) y t18:0 a la fitosfingosina (1,3,4-trihidroxi-2-aminooctadeceno).

Otro grupo interesante de compuestos son los compuestos de la Fórmula (I) o (Ia), en donde X es Gala3 o GalNAc α 3; Z es Glc o Gal y Y está ausente.

Otro grupo interesante de compuestos son los compuestos de la Fórmula (I) o (Ia) en donde ϵ^* es β .

Aún otro grupo interesante de compuestos son los compuestos de la Fórmula (I) o (Ia), en donde Z es Glc.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona el uso de los compuestos descritos anteriormente en donde dicho compuesto es un compuesto de la Fórmula (Ia)



en donde

U está ausente, Gala4, Gal β 3GlcNAc β 3, o (Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3

Un grupo preferido de compuestos dentro del contexto de la presente invención para la unión a *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF son los compuestos de la Fórmula (I) o (Ia) en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste de;

[Fuca2Gal β 3]_n-W;
 [Fuca2Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1]_n-W;
 [Gala3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1]_n-W;
 [GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1]_n-W;
 [GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1]_n-W;
 [Gala3(Fuca2)Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1]_n-W;
 [GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1]_n-W;
 [GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GalNAc β 3Gala4Gal β 4Glc β 1]_n-W; o
 [GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1]_n-W

Dentro de dicha modalidad W está ausente o un conjugado de extremo reductor de dicho residuo de oligosacárido; más particularmente, W está ausente y los polisacáridos libres se usan en su lugar.

Otro grupo interesante de compuestos dentro del contexto de la presente invención para la unión de *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF son los compuestos de la Fórmula (I) o (Ia) en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste de;

Fuca2Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer;
 Gala3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer;
 GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer;
 GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer;
 Gala3(Fuca2)Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer;
 GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer;
 GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GalNAc β 3Gala4Gal β 4Glc β 1Cer;
 GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer

En aún una modalidad más preferida el compuesto de la Fórmula (I) o (Ia), es [Gala3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1]_n-W; o [GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1]_n-W.

Dentro de dicha modalidad W está ausente o un conjugado de extremo reductor de dicho residuo del oligosacárido; más particularmente, W está ausente y los polisacáridos libres se usan en su lugar.

En aún una modalidad adicionalmente preferida el compuesto de la Fórmula (I) o (Ia), es Gala3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer; o GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer.

Compuesto

Se describe además en la invención un compuesto en donde el compuesto es
 $[\text{GalNAc}\alpha 3(\text{Fuc}\alpha 2)\text{Gal}\beta 3\text{GalNAc}\alpha 3(\text{Fuc}\alpha 2)\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 1]_n\text{-W}$

5 en donde W se define por la fórmula (I) anterior.

Ensayos de tamizajes

10 Los ensayos de la presente invención se pueden diseñar en muchos formatos de tamizaje de compuestos para la actividad biológica o para moléculas de unión conocidos generalmente en la técnica.

Por lo tanto la presente invención se refiere al uso de un compuesto como se describió anteriormente en un método para identificar moléculas que afectan la unión entre *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF y dicho compuesto.

15 Los compuestos descritos son responsables de una o más funciones biológicas, incluyendo uno o más estados de enfermedad, particularmente de las mencionadas anteriormente y de aquí en adelante. Por lo tanto, se desea idear métodos de tamizaje que identifican compuestos para la prevención basados en el receptor de las infecciones por *E. coli* F18⁺ en cerdos.

20 Los ensayos de la presente invención explotan favorablemente el hecho de que la perturbación en la interacción entre epítomos de uniones de la *E. coli* F18R y F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF afectan las infecciones por *E. coli* F18⁺.

25 Por lo tanto, la presente invención incluye métodos para identificar compuestos que interactúan con la unión entre *E. coli* F18⁺ y el epitelio de cerdo. Los métodos de ensayo de la presente invención difieren de los descritos en la técnica debido a que todos incorporan al menos una etapa que comprende o mimetiza la interacción de unión entre *E. coli*, F18⁺, fimbrias F18, adhesinas F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF, con el F18R.

30 El conocimiento del receptor de carbohidratos para lectinas que median la adhesión al huésped permite su uso como análogos del receptor para evitar la adherencia a la superficie epitelial del huésped mediante la inhibición competitiva. Bacterias resistentes contra estos análogos del receptor puede surgir también, pero ya que estos agentes no actúan matando o deteniendo el crecimiento del patógeno, las bacterias resistentes se diluirán con las bacterias sensibles y emergerán en un grado mucho menor, en comparación con bacterias resistentes a los antibióticos.

35 El método de tamizaje puede medir simplemente la unión de una molécula candidato al compuesto como se definió anteriormente, o a células o membranas que contienen los compuestos como se definió anteriormente por medio de un marcador directa o indirectamente asociado con la molécula candidato o con los compuestos descritos.

40 Así se describe en la presente invención un método para identificar las moléculas que unen a los compuestos de la Fórmula (I) o (Ia) dicho método que comprende

- poner en contacto la molécula que se prueba con dicho compuesto,
- y
- 45 – determinar si dicha molécula se une a dicho compuesto.

Alternativamente, el método de tamizaje puede implicar competición con uno de los compuestos descritos.

50 En el método mencionado anteriormente y más abajo, la molécula que se prueba o el compuesto descrito que se usa como competidor pueden marcarse.

Por lo tanto otra modalidad de la presente invención es un método para identificar moléculas que afectan la unión entre *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF y los compuestos de la Fórmula (I) o (Ia) que comprende:

- 55 – poner en contacto la molécula que se prueba con *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesinas F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF; y dicho compuesto,
- y

- determinar si dicha molécula afecta la unión de *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF con dicho compuesto.

Ejemplos de ensayos de unión y ensayos de unión competitiva son el ensayo *in vitro* de adhesión a las vellosidades y el ensayo de unión en el cromatograma como se describe en los ejemplos. Otros ejemplos son los ensayos ELISA, Inmunoensayos, RIA, ensayos de unión al filtro, ensayos de proximidad de centelleo (SPA), tecnología Cytostar-T, inmunoprecipitación o el uso de un efecto de resonancia de plasmón de superficie explotada por el instrumento Biacore.

En los métodos descritos anteriormente y más abajo se pueden marcar además la *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesinas F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF.

Así, un compuesto, una molécula o una *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF pueden marcarse con agentes de marcaje, tales como radioisótopos, aminoácidos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminosas, sustancias de fotoafinidad etc. Ejemplos de los radioisótopos incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ³H y ¹⁴C. Un ejemplo de marcaje metabólico incluye el marcaje de cepas de *E. coli* con metionina-³⁵S como se describe en el ejemplo 2. Generalmente, las enzimas se hacen detectables por conjugación de un sustrato adecuado que, a su vez cataliza una reacción detectable. Ejemplos de estos incluyen, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato deshidrogenasa, preferentemente peroxidasa de rábano picante. Las sustancias luminosas incluyen, por ejemplo, luminol, derivados de luminol; luciferina, aecuatorina y luciferasa.

Las moléculas pueden identificarse a partir de una variedad de fuentes, por ejemplo, células, preparaciones libres de células, genotecas químicas y mezclas de productos naturales. Tales antagonistas así identificados pueden ser moléculas naturales o modificadas, ligandos, enzimas, etc, según el caso pueden ser, del polipéptido receptor; o pueden ser mimetizadores estructurales o funcionales de estos.

Así la molécula que se prueba puede ser una lectina, un anticuerpo, una proteína, una glicoproteína, un glicolípido, un glicoesfingolípido, una molécula pequeña o un mimetizador sintético de un compuesto como se describió anteriormente. Los análogos del receptor inhiben la adhesión de las bacterias a través de inhibición competitiva. Los anticuerpos o lectinas bloquearán el receptor de carbohidratos de la molécula identificada por tanto, puede ser un análogo del receptor F18R o una molécula que bloquea el receptor F 18R.

En los métodos de la presente invención el compuesto, la molécula, la *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesinas F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF se pueden presentar en un soporte sólido, una membrana, una célula o un tejido. Los ejemplos de soportes sólidos son las placas de cromatografía, placas de ELISA, perlas tales como, pero sin limitarse a perlas de SPA o perlas magnéticas, nanopartículas, filtros, tales como pero sin limitarse a filtros de nitrocelulosa o filtros polivinildifluoruro.

Una vez que una molécula se ha diseñado o seleccionado mediante los métodos anteriores, puede probarse la afinidad con la que ese compuesto puede unirse o asociarse con *E. coli* F18⁺, fimbrias F 18, adhesinas F 18, FedF, el dominio de unión al receptor de FedF, los compuestos definidos o un F18R y optimizarse mediante la evaluación computacional y/o probando la actividad biológica.

Las moléculas pueden interactuar con *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF, el dominio de unión al receptor de FedF, los compuestos descritos o un F18R en más de una conformación que es similar en la energía de unión total. En esos casos, la energía de deformación de la unión se considera que es la diferencia entre la energía del compuesto libre y la energía promedio de las conformaciones observadas cuando se une el compuesto.

Una molécula diseñada o seleccionada que se une o asocia con *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF, el dominio de unión al receptor de FedF, los compuestos definidos o un F18R puede ser optimizada más aun mediante la informática tal que su estado unido preferentemente puede carecer de interacción electrostática repulsiva con los dominios de unión. Tales interacciones no-complementarias (por ejemplo, electrostáticas) incluyen las interacciones repulsivas carga-carga, dipolo-dipolo y carga-dipolo. Específicamente, la suma de todas las interacciones electrostáticas entre el inhibidor y un dominio de unión a un proteosoma o dominio de unión a una proteína preferentemente, cuando el inhibidor se une, hace una contribución neutra o favorable a la entalpía de unión. Compuestos de unión débil se diseñarán también mediante estos métodos para determinar la SAR. Ver, por ejemplo, solicitud de Estados Unidos núms. 60/275,629;60/331,235; 60/379,617; y, 10/097,249.

El programa informático específico está disponible en la técnica para evaluar la energía de deformación molécula y la

interacción electrostática. Ejemplos de programas diseñados para tales usos incluyen: Gaussian 92, revisión C (M. J. Frisch, Gaussian, Inc., Pittsburgh, Pa., COPYRIGHT 1992); AMBER, versión 4.0 (P. A. Kollman, Universidad de California en San Francisco, COPYRIGHT 1994); QUANTA/CHARMM (Molecular Simulations, Inc., Burlington, Mass. COPYRIGHT 1994); y Insight II/Discover (Biosym Technologies Inc., San Diego, California COPYRIGHT 1994). Otros sistemas de hardware y paquetes informáticos serán conocidos por aquellos con experiencia en la técnica.

Una vez que una molécula que se asocia con *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF, el dominio de unión al receptor de FedF, los compuestos definidos o un F18R se ha seleccionado o diseñado óptimamente como se describió anteriormente, las sustituciones pueden hacerse después en algunos de sus átomos o grupos laterales para mejorar o modificar sus propiedades de unión. Generalmente, las sustituciones iniciales son conservadoras, es decir, el grupo de reemplazo tendrá aproximadamente el mismo tamaño, forma, hidrofobicidad y carga que el grupo original. Se entenderá por supuesto, que los componentes conocidos en la técnica para alterar la conformación pueden evitarse. Tales moléculas químicas sustituidas se pueden analizar después para la eficacia del ajuste por los mismos métodos informáticos descritos en detalle, anteriormente.

El compuesto, moléculas y métodos como se describió anteriormente y las composiciones farmacéuticas, aditivos de alimentos o bebidas o pienso para cerdo que se describen más abajo se pueden usar además para diferenciar entre los cerdos F18R positivos y negativos.

Por lo tanto, se requieren las muestras biológicas de los cerdos positivos y negativos a F18R. Las muestras biológicas pueden definirse como tejido corporal o fluidos corporales. Los ejemplos de fluidos corporales son líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero, orina, esputo y saliva. Un ejemplo de un tejido corporal es el material de la vellosidad intestinal, como se describe en el ejemplo 1.

Uso terapéutico

En general, los compuestos y moléculas definidas pueden emplearse para fines terapéuticos y profilácticos de tales enfermedades como mencionadas anteriormente y de aquí en adelante.

Por lo tanto, la presente invención se relaciona con los compuestos de la Fórmula (I) o (Ia) para su uso como medicina.

Así, la presente invención se refiere al uso de compuestos de la fórmula (I) o (Ia) o de las moléculas seleccionadas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las infecciones por *E. coli* F18⁺ en cerdos, particularmente en el tratamiento de la diarrea posterior al destete y la enfermedad del edema en cerdos. La invención se refiere además a un compuesto de la fórmula (I) o (Ia) para su uso en el tratamiento de las infecciones por *E. coli* F18⁺ en cerdos, particularmente en el tratamiento de la diarrea posterior al destete y la enfermedad del edema en cerdos.

La presente invención se refiere además a una molécula identificada en un ensayo de acuerdo con la invención, en donde dicha molécula es capaz de unirse a la *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesinas F18, FedF o el dominio de unión al receptor de FedF, los compuestos descritos anteriormente o un F18R. Se refiere además al uso de dichas moléculas como una medicina y en el tratamiento de las infecciones por *E. coli* F18⁺ en cerdos.

Así, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso para la prevención, tratamiento o mejoría de la afección médica relacionada con las infecciones por *E. coli* F18⁺ que comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o una molécula como se describió anteriormente, en combinación opcionalmente con un portador farmacéuticamente aceptable, en una cantidad eficaz para modular las infecciones por *E. coli* F18⁺. Tales portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y las combinaciones de estos. Los compuestos y moléculas de la presente invención pueden emplearse solos o de conjunto con otro compuesto, tal como compuestos terapéuticos.

Así, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende portadores farmacéuticamente aceptables y como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o (Ia) y a un proceso de preparar una composición farmacéutica como se describió anteriormente en donde los portadores farmacéuticamente aceptables y un compuesto de fórmula (I) o (Ia) están íntimamente mezclados.

El compuesto, molécula o composición se adaptará a la vía de administración, por ejemplo una vía oral. La administración de estos compuestos y moléculas pueden ser en forma de píldoras, tabletas, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, pastas, geles, aditivos alimentarios, alimentos aditivos bebestibles.

El compuesto, molécula, composición o formulación que se administra contendrá, en cualquier caso, contiene una cantidad de compuesto(s) activo(s) en una cantidad eficaz para aliviar los síntomas del sujeto que se trata.

- 5 La dosificación exacta y la frecuencia de administración de los presentes compuestos y moléculas dependen del compuesto o molécula usada en particular, la afección en particular que se trata, la gravedad de la afección que se trata, la edad, peso, sexo, dieta, tiempo de administración y afección física general del sujeto en particular, el modo de administración así como otra medicación que el sujeto puede estar tomando, como es bien conocido por aquellos con experiencia en la técnica. Además, es evidente que dicha cantidad diaria efectiva se puede aumentar o disminuir dependiendo de la respuesta del sujeto tratado, y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescribe los compuestos o moléculas de la presente invención.

- 10 Pueden prepararse composiciones o formas de dosificación que contiene el ingrediente activo en el intervalo de 0.25 a 95 %. Dependiendo del modo de administración, la composición farmacéutica comprenderá de preferencia de 0.05 a 99 % en peso, con mayor preferencia de 0.1 a 70 % en peso de los ingredientes activos, y, de 1 a 99.95 % en peso, con mayor preferencia de 30 a 99.9 % en peso de un portador farmacéuticamente aceptable, todos los porcentajes se basan en la composición total.

- 15 Así el compuesto de la Fórmula (1) o (Ia) o las moléculas descritas anteriormente pueden administrarse como un aditivo de alimentos o bebidas.

- 20 Para la administración oral, una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable se forma mediante la incorporación de cualquiera de los excipientes normalmente empleados, tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, celulosa, derivados de celulosa, croscarmelosa sódica, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, glucosa, sacarosa, magnesio, carbonato, y similares. Tales composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Tales composiciones pueden contener 1 %-95 % de ingrediente activo, con mayor preferencia 2-50 %, con la máxima preferencia 5-8 % de ingrediente activo.

- 25 Las formas sólidas pueden ser adecuadas para solución o suspensión en líquido o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares. Adicionalmente, si se desea, las composiciones farmacéuticas, aditivos de alimentos o bebidas que se administra puede además contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores del pH y similares, tales como por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, acetato sódico de trietanolamina, etc.

- 30 El porcentaje de compuesto activo incluido en las soluciones o suspensiones es altamente dependiente de la naturaleza específica de este, así como la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto. Sin embargo, los porcentajes de ingrediente activo de 0.1 % a 10 % en solución son empleables, y serán mayores si la composición es un sólido que posteriormente se diluirá a los porcentajes anteriores. Preferentemente, la composición comprenderá 0.2-2 % del agente activo en solución.

- 35 Una modalidad adicional de la invención de acuerdo con las reivindicaciones es el pienso para cerdos, suplementado con un compuesto de fórmula (I) o (Ia), una molécula, una composición farmacéutica o un aditivo alimentario de acuerdo con las reivindicaciones. El pienso para cerdos adecuado incluye el pienso inicial, pienso de destete o pienso de engorde.

- 45 *Paquetes y estuches*

Finalmente, la invención describe paquetes que incluyen paquetes y estuches farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de los compuestos antes mencionados, moléculas, composiciones, aditivos de alimentos o bebidas, y pienso para cerdo de la invención.

- 50 Esta invención describe un artículo de fabricación que comprende un empaque y un agente farmacéutico, en donde (a) el agente farmacéutico es uno de los compuestos como se describió anteriormente o el agente farmacéutico se identifica usando un ensayo de la presente invención, y (b) el empaque comprende una etiqueta que indica el uso del agente para tratar un sujeto, particularmente, como un medicamento o para el tratamiento de infecciones de *E. coli* F18⁺ en cerdos.

Esta invención se entenderá mejor con referencia a los Detalles Experimentales que siguen, pero los expertos en la materia apreciarán fácilmente que éstos son solamente ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen posteriormente. Adicionalmente, a lo largo de toda esta solicitud, se citan varias publicaciones.

5

Parte experimental

Ejemplo 1: Ensayo *in vitro* de adhesión a las vellosidades

- 10 La naturaleza del F18R en los enterocitos de las vellosidades de intestino delgado porcino se investigó usando un ensayo *in vitro* de inhibición de adhesión a las vellosidades (Cox, E., Houvenaghel, A., 1993. Vet. Microbiol. 34(1),7-18;Verdonck, F., Cox, E., van Gog, K., Van der Stede, Y., Duchateau, L., Deprez, P., Goddeeris, B.M., 2002. Vaccine 20(23-24), 2995-3004). En resumen, un segmento intestinal de 20 cm se recogió a partir de yeyuno medio de un cerdo sacrificado, se enjuagó tres veces con PBS helado, y fijó con amortiguador Krebs-Henseleit (160 mM, pH 7,4) que contiene 1% (v/v) de formaldehído por
- 15 30 min a 4 °C. Después de eso, las vellosidades se rasparon suavemente de la mucosa con un portaobjetos de vidrio y almacenaron en amortiguador Krebs-Henseleit a 4 °C. El tratamiento de las vellosidades con acetona, metanol, 1 % de Tritón® X-100, 10 mM de NaIO₄ en 0.2 M de acetato de sodio, pH 4.5, o 0.2 M de acetato de sodio, pH 4.5, sin NaIO₄ respectivamente, se realizó a temperatura ambiente en una rueda giratoria en un volumen de 500 µl durante 1 h. A continuación, las vellosidades se lavaron 6 veces con amortiguador Krebs-Henseleit seguido por adición de 4×10^8 bacterias de la cepa de *E. coli* de referencia F18 positiva (107/86), o la cepa de *E. coli* GIS 26 que expresa F4ac, a un promedio de 50 vellosidades en un volumen total de 500 µl de PBS, suplementado con 1 % (p/v) de D-manosa para evitar la adhesión
- 20 mediada por pili de tipo 1. Estas mezclas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h mientras que se agitaron suavemente. Las vellosidades se examinaron por microscopía de contraste de fases con un aumento de 600, y el número de bacterias adheridas a lo largo de 50 µm de borde de cepillo se evaluó cuantitativamente contando el número de bacterias adheridas en 20 lugares seleccionados al azar, después de lo cual se calculó el promedio de adhesión bacteriana.

Ejemplo 2: Cepas bacterianas, cultivo y marcaje.

- La cepa de referencia de *E. coli* verotoxigénica F18 positiva 107/86 (serotipo O139:K12:H1, F18ab+, SLT-IIv+) (Bertschinger HU, Bachmann M, Mettler C, Pospischil A, Schraner EM, Stamm M, Sydler T, Wild P, 1990. Vet Microbiol. 25(2-3):267-81), y
- 30 la cepa de referencia de *E. coli* enterotoxigénica F4ac positiva GIS 26 (serotipo O149:K91:F4ac LT+, STa+, STb+), se cultivaron en placas de agar BHI (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) a 37 °C por 18 h. Posteriormente, las bacterias se cosecharon por centrifugación y resuspendieron en solución salina regulada con fosfato (PBS, pH 7.3). La concentración de bacterias en la suspensión se determinó midiendo la densidad óptica a 660 nm (DO660). Una DO de 1 equivale a 10^9 bacterias por ml, como se determina contando las unidades formadoras de colonias.

35

- Las cepas *E. coli* recombinantes que expresan fimbrias F18 (HB101 (pIH120) completas, o fimbrias F18 con delección de la subunidad adhesiva FedF (HB101 (pIH126)) (Imberechts y otros, 1992; 1996), se cultivaron en placas de agar Sensitest Iso (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) suplementadas con ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C durante toda la noche. Para el marcaje metabólico, las placas de cultivo se suplementaron con 10 µl de ³⁵S-metionina (400 µCi; Amersham Pharmacia Biotech). Las bacterias se cosecharon, lavaron tres veces en PBS, y resuspendieron en PBS que contiene 2 % (p/v) de albúmina de suero bovino, 0.1 % (p/v) de NaN₃ y 0.1 % (p/v) de Tween 20 (BSA/PBS/TWEEN) a una densidad bacteriana de 1×10^8 unidades formadoras de colonias/ml. La actividad específica de las suspensiones bacterianas fue aproximadamente 1 cpm por 100 bacterias.

40

Ejemplo 3: Glicosfingolípidos de referencia.

- Las fracciones totales de glicosfingolípidos ácido y no ácidos se prepararon como se describió por Karlsson (Karlsson K-A, 1987. Meth. Enzymol. 138:212-220). Los glicosfingolípidos individuales se obtuvieron por cromatografía repetida sobre columnas de ácido silícico y por HPLC, y se identificaron por espectrometría de masas (Samuelsson y otros., 1990) y espectroscopia de RMN de protón (Koerner, T. A. W. Jr., J. H. Prestegard, P. C. Demou, y R. K. Yu. 1983. Biochemistry 22:2676-2687).

50

Ejemplo 4: Cromatografía de capa fina

- Placas de cromatografía de capa fina de alto rendimiento de gel de sílice 60 respaldados por aluminio- o vidrio (Merck, Darmstadt, Alemania) se usaron para la cromatografía de capa fina, y eluyeron con cloroformo/metanol/agua (60:35:8, por

55

volumen) como sistema de solvente. Los diferentes glicosfingolípidos se aplicaron a las placas en cantidades de 0.002-4 µg de glicosfingolípidos puros y 40 µg de mezclas de glicosfingolípidos. La detección química se realizó con anisaldehído (Waldi D, 1962. *Sprühreagentien für die dünnschicht-chromatographie*, p. 496-515. In Stahl, E. (ed.), *Dünnschicht-Chromatographie*. Springer-Verlag, Berlin).

5

Ejemplo 5: Ensayos de unión en el cromatograma

Ejemplo 5a

- 10 La unión de las bacterias radiomarcadas a glicosfingolípidos en los cromatogramas de capa fina se realizó como se describió previamente (Hansson GC, Karlsson K-A, Larson G, Strömberg N, Thurin J, 1985. *Anal. Biochem.* 146:158-163). Los cromatogramas secos se sumergieron en éter dietílico/n-hexano (1:5 v/v) que contiene 0.5% (p/v) polisobutilmetacrilato por 1 min, se secaron y se bloquearon después con BSA/PBS/Tween por 2 h a temperatura ambiente. Después de eso, las placas se incubaron con bacterias marcadas con ³⁵S (1-5 x 10⁶ cpm/ml) diluidas en BSA/PBS/TWEEN por otras 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar seis veces con PBS, y secar, se autorradiografiaron las placas de capa fina por 12 h usando películas de rayos x XAR-5 (Eastman Kodak, Rochester, Nueva York).

15

Ejemplo 5b

- 20 Ensayos de unión en el cromatograma con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el determinante del grupo sanguíneo A (DakoCytomation Norden A/S, Glostrup, Dinamarca) se realizaron como se describe (Hansson GC, Karlsson K-A, Larson G, McKibbin JM, Blaszczyk M, Herlyn M, Steplewski Z, Koprowski H, 1983. *J. Biol. Chem.* 258:4091-4097), usando anticuerpos anti-ratón marcados con I¹²⁵ para la detección.

- 25 Ejemplo 6: Aislamiento de glicosfingolípidos de unión a *E. coli* F18 fimbriada de epitelio del intestino delgado porcino.

Los glicosfingolípidos no ácidos se aislaron a partir de raspados epiteliales de intestinos delgado porcino por el método descrito por Karlsson (Karlsson K-A, 1987. *Meth. Enzymol.* 138:212-220). En resumen, los raspados epiteliales se liofilizaron, y después se extrajeron en dos etapas en un aparato Soxhlet con cloroformo y metanol (2:1 y 1:9, por volumen, respectivamente). El material obtenido se sometió a hidrólisis alcalina suave y diálisis, seguido de separación en una columna de ácido silícico. Las fracciones de glicosfingolípidos ácidos y no ácidos se obtuvieron por cromatografía en una columna de DEAE-celulosa. Para separar los glicolípidos no ácidos a partir de fosfolípidos alcalino-estables, esta fracción se acetiló y separó en una segunda columna de ácido silícico, seguido de desacetilación y diálisis. Las purificaciones finales se realizaron por cromatografías en columnas DEAE-celulosa y de ácido silícico. Las fracciones totales de glicosfingolípidos no ácidos obtenidas se separaron después de eso, tal como se describe más abajo. A lo largo de los procedimientos de separación las alícuotas de las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía de capa fina, y las fracciones que se colorearon verde por anisaldehído se probaron para la unión de *E. coli* F18 fimbriada usando el ensayo de unión en el cromatograma.

30

35

- 40 Ejemplo 6a: Epitelio intestinal de cerdo del grupo sanguíneo O.

Una fracción total de glicosfingolípidos no ácidos (148 mg) a partir del epitelio intestinal de cerdo del grupo sanguíneo O se separó primero en una columna de ácido silícico eluido con volúmenes crecientes de metanol en cloroformo. De ese modo, se obtuvo una fracción de unión a la *E. coli* F18 fimbriada que contiene tetraglicosilceramidas y compuestos de migración más lenta (22 mg). Esta fracción se separó además en una columna latrobeads (latrobeads 6RS-8060; latron Laboratories, Tokio) (10 g), primero se eluyó con cloroformo/metanol/agua 60:35:8 (por volumen), 10 x 5 ml, seguido por cloroformo/metanol/agua 40:40:12 (por volumen), 2 x 10 ml. El compuesto de unión a la *E. coli* F18 fimbriada se eluyó en las fracciones 3 y 4, y después de mezclar estas fracciones se obtuvo 6.7 mg. Este material se acetiló y, se separó además, en una columna latrobeads (2 g), primero se eluyó con volúmenes crecientes de metanol en cloroformo. Después de la desacetilación y diálisis, se obtuvo 6.0 mg de glicosfingolípidos puros de unión a la *E. coli*-F18 fimbriada (designado fracción O-I).

45

50

Ejemplo 6b: Epitelio intestinal de cerdo del grupo sanguíneo A.

- 55 Una fracción total de glicosfingolípidos no ácidos (183 mg) a partir del epitelio intestinal de cerdo del grupo sanguíneo A se separó inicialmente en una columna de ácido silícico eluida con volúmenes crecientes de metanol en cloroformo. La mezcla de las fracciones que contienen tetraglicosilceramidas y compuestos de migración más lenta produjo 51.2 mg. Este material

se separó además por HPLC en una columna de sílice 1.0 x 25 cm (Kromasil sílice, partículas de 10 µm; Skandinaviska Genetec, Kungsbacka, Suecia) se eluyó con un gradiente lineal de cloroformo/metanol/agua 70:25:4 a 40:40:12 (por volumen) durante 180 min y con un flujo de 2 ml/min. Las fracciones obtenidas se mezclaron de acuerdo a la movilidad en los cromatogramas de capa fina y la actividad de unión a la *E. coli*-F18 fimbriada. De ese modo, se obtuvieron seis fracciones de unión a la *E. coli* F18 fimbriada, designadas fracción A-I (12.6 mg), A-II (3.6 mg), A-III (0.3 mg), A-IV (0.5 mg), A-V (0.2 mg) y A-VI (0.2 mg), respectivamente.

Ejemplo 7: Espectrometría de masas FAB de ion negativo

Los espectros de masas FAB de ion negativo se registraron en un espectrómetro de masas JEOL SX-102A (JEOL, Tokio, Japón). Los iones se produjeron por bombardeo de átomos de xenón 6 keV, usando trietanolamina (Fluka, Buchs, Suiza) como matriz, y un voltaje de aceleración de -10 kV.

Ejemplo 8: Digestión con endoglicoceramidasa y LC/MS

La endoglicoceramidasa II a partir de *Rhodococcus* spp. (Ito y Yamagata, 1989) (Takara Bio Europe S.A., Gennevilliers, Francia) se usó para la hidrólisis de glicosfingolípidos. En resumen, 50 µg de la fracción O-I de unión a la *E. coli* F18 fimbriada del epitelio intestinal porcino del grupo sanguíneo O, pentaglicosilceramida H tipo 1 de meconio humano y pentaglicosilceramida H tipo 2 de eritrocitos humanos se resuspendieron en 100 µl de 0.05 M de amortiguador de acetato de sodio, pH 5.0, que contiene 120 µg de colato de sodio, y se sonicaron brevemente. Después de eso, 1 mU de glicanasa de ceramida se añadió y la mezcla se incubó a 37 ° C por 48 h. La reacción se detuvo por la adición de cloroformo/metanol/agua a las proporciones finales 8:4:3 (por volumen). La fase superior que contiene oligosacárido obtenido así se separó del detergente en un cartucho Sep-Pak QMA (Waters, Milford, Massachusetts). El eluyente que contiene los oligosacáridos se secó bajo nitrógeno y bajo vacío.

Para LC/MS los sacáridos derivados de glicosfingolípidos se separaron en una columna (200 x 0.180 mm) ya empacadas con partículas de 5 micras de grafito poroso (Hypercarb, Thermo Scientific), y se eluyeron con un gradiente lineal de 0 % de B a 45 % de B en 46 min. (Solvente A 8 mM de NH₄HCO₃ y Solvente B 20 % de 8 mM de NH₄HCO₃/80 % acetonitrilo (por volumen)). Los sacáridos eluidos se analizaron en el modo negativo en un espectrómetro de masas de trampa de iones lineal LTQ (Thermo Electron, San José, California), usando el software Xcalibur.

Ejemplo 9: Espectroscopía de RMN de protón

Los espectros RMN ¹H se adquirieron en un espectrómetro Varian 600 MHz a 30 °C. Las muestras se disolvieron en dimetilsulfóxido-D₂O (98:2, por volumen) después del intercambio de deuterio.

Ejemplo 10: Determinación de la naturaleza de F18R

Para examinar el carácter de F18R, las vellosidades intestinales aisladas de cuatro cerdos se trataron con diferentes agentes que afectan a los lípidos o carbohidratos en la membrana celular del enterocito. El tratamiento fue seguido por la evaluación de la adhesión de *E. coli* F18 fimbriada al epitelio de las vellosidades. La adhesión de *E. coli* F18 fimbriada a las vellosidades intestinales porcinas se abolió completamente después del tratamiento con acetona, metanol, 1% de Tritón[®] X-100 y NaIO₄ (Figura 1), sugiriendo que la F18R es un glicolípido. En contraste, la adhesión de la cepa control *E. coli* F4ac fimbriada, que tiene un receptor de glicoproteína, se abolió sólo por la incubación con NaIO₄ mientras que el tratamiento con acetona, metanol y 1 % de Tritón[®] X-100 no tuvo ninguno o sólo muy poco efecto.

Ejemplo 11: Tamizaje para el reconocimiento del carbohidrato F18 mediante la unión a las mezclas de glicosfingolípidos.

El sugerido glicolípido de unión de la *E. coli* F18 fimbriada se investigó por la unión a glicosfingolípidos separados en placas de capa fina. El primer tamizaje para la actividad de unión del carbohidrato a la *E. coli* F18 fimbriada se hizo usando mezclas de glicosfingolípidos de varias fuentes, para exponer las bacterias a un gran número de estructuras de carbohidratos activos potencialmente para la unión. De ese modo, se obtuvo la unión de la cepa HB101 (pIH120) de *E. coli* que expresa F18 a los glicosfingolípidos no ácidos menores de migración lenta del intestino de rata blanca y negra (datos no mostrados). En particular, estos compuestos no se reconocieron por la cepa HB101 (pIH126) de *E. coli*, que tiene una delección de la adhesina FedF.

Un rasgo característico del intestino de rata blanca y negra es la presencia de glicosfingolípidos con determinantes del grupo sanguíneo A en las cadenas del núcleo (Galβ3GlcNAc) de tipo 1, mientras que están ausentes en los

glicosfingolípidos determinantes del grupo sanguíneo A del intestino de rata blanca. Cuando la unión de la cepa HB101 (pH120) F18 positiva a glicosfingolípidos no ácidos del intestino de rata blanca se examinó, ninguna unión de las bacterias a esta fracción ocurrió (datos no mostrados), en contraste con la unión de las bacterias a la fracción de glicosfingolípidos no ácido de intestino de rata blanca y negra. Otra observación fue la ausencia de la unión de las bacterias F18 fimbriadas a los glicosfingolípidos no ácidos de eritrocitos del grupo sanguíneo humano A, B u O, donde los glicosfingolípidos predominantes con determinantes del grupo sanguíneo A, B y H tienen las cadenas del núcleo de tipo 2 (Gal β 4GlcNAc). Una vez más, ningún glicosfingolípidos se reconoció por el mutante de delección FedF HB101 (pH126).

En resumen, la unión de las bacterias F18 fimbriadas a los glicosfingolípidos no ácidos menores de migración lenta del intestino de rata blanca y negra sugirió un reconocimiento específico de los determinantes del grupo sanguíneo en las cadenas del núcleo de tipo 1. Además, la ausencia de unión del mutante de delección FedF a estos compuestos indicó una implicación de la proteína FedF en la interacción.

Ejemplo 12: Unión de la *E. coli* F18 fimbriada a glicosfingolípidos puros de referencia.

Los ensayos de unión usando glicosfingolípidos puros de referencia en cantidades definidas confirmaron la sugerida unión de la *E. coli* F18 fimbriada a los determinantes del grupo sanguíneo en las cadenas del núcleo de tipo 1. Los resultados (datos no mostrados) junto con los resultados de los experimentos descritos más abajo, se resumen en la Tabla 1. Así, la *E. coli* que expresa F18 se une a todos los glicosfingolípidos con determinantes del grupo sanguíneo A, B o H en las cadenas del núcleo de tipo 1, como el pentaglicosilceramida H tipo 1 (Fuca2Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), el hexaglicosilceramida B tipo 1 (Gal α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), la hexaglicosilceramida A tipo 1 (GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), el heptaglicosilceramida A tipo 1 (GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer) y el heptaglicosilceramida B tipo 1 (Gal α 3(Fuca2)Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3-Gal β 4Glc β 1Cer). En contraste, ninguna de las contrapartes del núcleo de tipo 2 de estos compuestos se reconocieron por las bacterias F18 fimbriadas, como el pentaglicosilceramida H tipo 2 (Fuca2Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), el hexaglicosilceramida B tipo 2 (Gal α 3(Fuca2)Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), el hexaglicosilceramida A tipo 2 (GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), o el heptaglicosilceramida A tipo 2 (GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 4(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer).

En particular, ninguno de los glicosfingolípidos con determinantes del grupo sanguíneo A, B o H en las cadenas del núcleo de tipo 1, reconocidos por las bacterias F18 fimbriadas, se unieron por la cepa mutante de delección FedF HB101 (pH126) (Tabla 1), demostrando que la proteína FedF es el elemento estructural responsable de la unión a los glicosfingolípidos que portan el grupo sanguíneo A, B o H tipo 1.

Adicionalmente a estos compuestos con determinantes terminales del grupo sanguíneo A/B/H una serie de otros glicosfingolípidos puros se examinaron para la actividad de unión a la *E. coli* F18 fimbriada usando el ensayo de unión en el cromatograma, pero no se detectaron glicosfingolípidos activos de unión adicional (Tabla 1).

Las comparaciones de la afinidad de unión relativa de la *E. coli* F18 fimbriada para la unión de varios glicosfingolípidos activos se realizaron usando diluciones de glicosfingolípidos en cromatogramas de capa fina. El límite de detección para el pentaglicosilceramida H tipo1 fue de 2 μ g, mientras que el límite de detección para el hexaglicosilceramida A tipo 1 y el hexaglicosilceramida B tipo 1 fueron de aproximadamente 0.08 μ g (datos no mostrados).

Dado que la lactotetraosilceramida (Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer, núm 20 en la Tabla 1), que tiene una cadena del núcleo tipo 1 no sustituida, careció de actividad de unión mediada por FedF, la fucosa terminal con enlace α 2 de pentaglicosilceramida H tipo1 (Fuca2Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer) fue necesaria para ocurrir la unión. De interés en este contexto es la ausencia de unión de las bacterias F18 fimbriadas a fucosil-gangliotetraosilceramida (Fuca2Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer; núm. 11 en la Tabla 1), demostrando que la N-acetilglucosamina interna es además obligatoria para el proceso de unión. Además, la afinidad más alta para la hexaglicosilceramida B tipo 1 (Gal α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), y la hexaglicosilceramida A tipo 1 (GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), demostraron que la galactosa/N-acetilgalactosamina terminal con enlace α 3 de estos compuestos contribuyeron sustancialmente a la interacción.

La comparación de la unión de las bacterias F18 positivas a la hexaglicosilceramida A tipo 1 (GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer) y la heptaglicosilceramida A tipo 1 (GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer) reveló que el límite de detección para la hexaglicosilceramida A tipo 1 fue de aproximadamente 0.08 μ g y para el heptaglicosilceramida A tipo 1 de 0.8 μ g, demostrando que la sustitución de la N-acetilglucosamina con un α -fucosa en la posición 4 constituye un impedimento relativo para la unión de la proteína

FedF. Esta sugerencia se corrobora por el hecho de que el Le^b hexaglicosilceramida (Fuca2Galβ3(Fuca4)GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer; núm. 22 en la Tabla 1) no se reconoce por la *E. coli*, que expresa F18 aunque tiene la secuencia Fuca2Ga1β3GlcNAc de la pentaglicosilceramida H tipo 1 activa para la unión.

5 Así, un epítipo mínimo para la unión de la adhesina FedF de las fimbrias F18 es la secuencia lineal Fuca2Galβ3GlcNAc y un epítipo para la unión óptima se crea por la adición de la galactosa o N-acetilgalactosamina con enlace α3 de las secuencias Galα3(Fuca2)Galβ3GlcNAc y GalNAcα3(Fuca2)Galβ3GlcNAc.

Ejemplo 13: Unión de la *E. coli* F18 fimbriada a glicosfingolípidos de epitelio del intestino delgado porcino

10 Para evaluar el papel potencial del reconocimiento de glicosfingolípidos por *E. coli* F18 fimbriada en la adherencia del tejido objetivo, se determinó la unión de la cepa HB101 (pH120) de *E. coli* que expresa F18 y la cepa mutante de delección FedF HB101 (pH126), que tiene una delección de la adhesina FedF, a las fracciones de glicosfingolípidos ácido y no ácido del epitelio del intestino delgado porcino (Figura 2). No ocurrió la unión a los glicosfingolípidos ácido (carriles 3 y 5) sin embargo, en las fracciones no ácidos de un cerdito de 3 días de edad (carril 2), y en los dos cerdos adultos (carriles 4 y 6), se obtuvo la unión a algunos compuestos con la cepa F18-fimbriada (Figura 2B). En particular, se observaron que estos compuestos no se reconocieron por la cepa mutante de delección FedF (Figura 2 C). Dos modos de unión diferentes se observaron para las dos fracciones de glicosfingolípidos no ácidos de epitelio intestinal de cerdo adulto (Figura 2B, carriles 4 y 6). La fracción en el carril 4 (cerdo adulto núm.1) tuvo un compuesto activo para la unión que migra en la región de pentaglicosilceramida, mientras que se observó en la fracción en el carril 6 (cerdo adulto núm. 2) la unión a un compuesto que migra en la región de penta-/hexaosilceramida junto con la unión a un compuesto que migra más lento. Varios compuestos reconocidos por los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el determinante del grupo sanguíneo A estaban presentes en la fracción no-ácido de cerdo adulto núm. 2 (Figura 2D, carril 6). La ausencia de unión de los anticuerpos monoclonales anti-A a los glicosfingolípidos no ácidos de cerditos de 3 días de edad y el cerdo adulto núm.1, indicó que estos eran de cerdos del grupo sanguíneo O, ya que el grupo sanguíneo B no se expresa en cerdos.

Ejemplo 14: Aislamiento y caracterización de glicosfingolípidos de unión a la *E. coli* F18 fimbriada a partir de epitelio intestinal de cerdo de grupo sanguíneo O

25 A partir de 148 mg de glicosfingolípidos totales no ácidos del epitelio intestinal de un cerdo de grupo sanguíneo O, se aisló 6 mg de glicosfingolípidos puro de unión a las fimbrias F18 (fracción designada O-I) por una serie de etapas cromatográficas. Hay que señalar que aunque todas las fracciones obtenidas durante el procedimiento de aislamiento se probaron para la unión a la *E. Coli* que expresa F18, no se detectaron ningún otro glicosfingolípidos activos para la unión a partir de esta fuente.

30 La caracterización del glicosfingolípidos de unión a la *E. coli* F18 fimbriada aislado a partir de epitelio intestinal de cerdo del grupo sanguíneo O demostró un pentaglicosilceramida del grupo sanguíneo H tipo 1(Fuca2Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer). Esta conclusión se basa en las tres propiedades siguientes:

- I) El compuesto activo para la unión migró en la región de pentaglicosilceramida en cromatogramas de capa fina (Figura 2B, carril 4).
- 35 II) En el análisis nano-LC/MS de los sacáridos obtenidos por la hidrólisis con endoglicoceramidasa de *Rhodococcus*, el tiempo de retención y espectro MS del sacárido de la pentaglicosilceramida porcina y de pentaglicosilceramida de referencia H de tipo 1 fueron casi idénticos (datos no presentados) Los sacáridos se detectaron como un ión [M-H]⁺ en *m/z* 852, y los sacáridos de epitelio intestinal de cerdo y de pentaglicosilceramida de referencia H tipo 1 ambos eluyeron a 22.5-23.3 min, mientras que el sacárido obtenido a partir de pentaglicosilceramida de referencia H tipo 2 eluyó a 24.6-25.1 min. MS del sacárido liberado del pentaglicosilceramida de epitelio intestinal del cerdo (Figura 3A) y de pentaglicosilceramida de referencia H tipo 1 (Figura 3B) resultaron en espectros de masas muy similares con una serie de iones del fragmento prominente de tipo C (C₂ en *m/z* 325, C₃ en *m/z* 528, y C₄ en *m/z* 690) identificando un pentaglicosilceramida con secuencia Fuc-Hex-HexNAc-Hex-Hex. Los iones del fragmento de tipo C en *m/z* 325, *m/z* 528, y *m/z* 690, identificando una secuencia Fuc-Hex-HexNAc-Hex-Hex, estuvieron presentes además en el espectro MS de pentaglicosilceramida de referencia H tipo 2 (Figura 3C). Sin embargo, este espectro fue dominado por un ión del fragmento^{0.2} A₃ en *m/z* 427, y un ión del fragmento O^{0.2}A₃-H₂ en *m/z* 409, característico de GlcNAc sustituidos en C-4, es decir. cadenas de carbohidratos de tipo 2 (Chai y otros., 2001; Robbe y otros., 2004)..
- 45 III) El protón del espectro de RMN de la pentaglicosilceramida de unión a la *E. coli* F18 fimbriada de intestino de cerdo (no mostrado) reveló cinco señales anómalas compuestas de un α terminal y cuatro resonancias β internas y el

compuesto se identificó fácilmente como el pentaglicosilceramida H tipo 1 (Fuca2Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer) a través de la comparación con los espectros publicados anteriormente (Clausen y otros, 1985).

5 Ejemplo 15: Aislamiento de glicosfingolípidos de unión a la *E. coli* F18 fimbriada a partir de epitelio intestinal de cerdo de grupo sanguíneo A

La fracción total no ácida del epitelio intestinal de un cerdo del grupo sanguíneo A se separó por cromatografía de gel de sílice y HPLC, y las subfracciones obtenidas se mezclaron de acuerdo con la movilidad en cromatogramas de capa fina y la actividad de unión a la *E. coli* F18 fimbriada. De ese modo, se obtuvieron seis fracciones de unión a la *E. coli* F18 fimbriada, fracción designada A-I (12.6 mg), A-II (3.6 mg), A-III (0.3 mg), A-IV (0.5 mg), A-V (0.2 mg) y A-VI (0.2 mg), respectivamente (datos no mostrados). Así, mientras que sólo un glicosfingolípidos con actividad de unión a la *E. coli* F18 fimbriada se obtuvo a partir del epitelio intestinal de cerdo del grupo sanguíneo O, el epitelio intestinal de cerdo del grupo sanguíneo A tuvo un número de compuestos de unión a la *E. coli* F18 fimbriada (Tabla 2).

Ejemplo 16: Caracterización de glicosfingolípidos de unión a la *E. coli* F18 fimbriada_ a partir de epitelio de intestino de cerdo del grupo sanguíneo A.

15 Ejemplo 16a: Fracción A-I.

La caracterización estructural de la fracción A-I identificó una hexaglicosilceramida del grupo sanguíneo A6 tipo 1 (GalNAcα3(Fuca2)Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer). Esta conclusión se basa en las tres observaciones siguientes:

- I) En los cromatogramas de capa fina este glicosfingolípidos de unión a la *E. coli* fimbriada F18 migró en la región de hexaglicosilceramida.
- 20 II) El espectro de masas FAB de ión negativo de la fracción A-I (no mostrado) tuvo una serie de iones moleculares en m/z 1574-1721, identificando una hexaglicosilceramida con una fucosa, dos HexNAc y tres Hex, que tienen una composición mixta de ceramida con el ácido graso fitoesfingosina e hidroxil 24:0 como las especies predominantes. Los iones del fragmento, derivado del ion molecular en m/z 1721, se encontraron en m/z 1680, 1518, 1372, 1209, 1006, 844 y 682, identificando una secuencia HexNAc-(Fuc-)Hex-HexNAc-Hex-Hex.
- 25 III) La espectroscopia de RMN de protón (datos no mostrados) mostró seis señales anómericas a 5.061 ppm (α), 4.913 ppm (α), 4.532 ppm (β), 4.501 ppm (β), 4.259 ppm (β), y 4.208 ppm (β), respectivamente y el compuesto se identificó así como hexaglicosilceramida A tipo 1 (GalNAcα3(Fuca2)Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1 Cer) a través de la comparación con los espectros publicados anteriormente (Clausen y otros, 1985).

30 Ejemplo 16b: Fracción A-II.

La caracterización de la fracción de unión A-II a la *E. coli* F18 fimbriada demostró una heptaglicosilceramida basado en una cadena de tipo 4, es decir una heptaglicosilceramida del grupo sanguíneo A tipo 4 (GalNAcα3(Fuca2)Galβ3GalNAcβ3Galα4Galβ4Glcβ1Cer) como el componente principal. Esta conclusión se basa en las siguientes propiedades:

- 35 I) En los cromatogramas de capa fina el compuesto principal de la fracción A-II migró en la región de heptaglicosilceramida. Se observó además un compuesto menor que migra en la región de hexaglicosilceramida.
- II) El espectro de masas FAB de ión negativo de la fracción A-II (Figura 4 A) tuvo un conjunto de iones moleculares en m/z 1736, 1752, 1770, 1855 y 1883 indicando un glicosfingolípidos con una Fuc, dos HexNAc y cuatro Hex, y d18:1-16:0, t18:0-16:0, t18:0-h16:0, t18:0-h22:0 y t18:0-h24:0 ceramidas, respectivamente. Una serie de iones del fragmento, obtenidos por la pérdida secuencial de unidades de carbohidratos terminales a partir del ion en m/z 1883, se observaron en m/z 1680, 1534, 1372, 1169, 1006, 844 y 682, demostrando una secuencia HexNAc-(Fuc-)Hex-HexNAc-Hex-Hex-Hex. Otras series de iones del fragmento apoyaron esta secuencia de carbohidratos propuesta, como *por ejemplo*. los iones derivados a partir del ión molecular en m/z 1770, encontrado en m/z 1567, 1421, 1259, 1056, 894, 732, y 570 (no mostrado).
- 40 III) La región anómerica del espectro de RMN de protón de la fracción A-II se muestra en la Fig. 4B reveló la presencia de dos compuestos principales (-1:1) de los cuales el primero es A6 tipo 1 como se describió para la fracción anterior. El segundo compuesto exhibe siete señales anómericas como sigue: 5.056 ppm (α), 4.930 ppm (α), 4.810 ppm (α), 4.510 ppm (β), 4.437 ppm (β), 4.253 ppm (β) y 4.208 ppm (β). Este conjunto de señales identifica fácilmente el compuesto como glicosfingolípidos A7 tipo 4

(GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer) previamente aislado de eritrocitos del grupo sanguíneo A1.

Una comparación de la unión de las bacterias *E. coli* que expresan F18 a hexaglicosilceramida A tipo1 (GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1 Cer) y la heptaglicosilceramida A tipo 4 (GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer) resultó en un límite de detección para la hexaglicosilceramida A tipo 1 de aproximadamente 0.08 μ g, mientras que el límite de detección para la heptaglicosilceramida A tipo 4 fue de aproximadamente 0.8 μ g.

Ejemplo16c: Fracción A-III.

La caracterización estructural de la fracción AIII de unión a la *E. coli* F18 fimbriada mostró que incluyó una octaglicosilceramida lineal del grupo sanguíneo A tipo I (GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer) y una nueva nonaglicosilceramida repetitiva A tipo 1 (GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer). Esto se concluyó a partir de las tres observaciones siguientes:

- I) La fracción A-III migró más abajo de la región de heptaglicosilceramida en los cromatogramas de capa fina.
- II) En el espectro de masas FAB de ión negativo de la fracción A-III (Figura 5) se observaron dos conjuntos de iones moleculares. Los iones moleculares en m/z 2204 y 2232 correspondieron a una nonaglicosilceramida con dos fucosas, tres HexNAc y cuatro hexosas, combinadas con t18:0-h22:0 y t18:0-h24:0 ceramidas, respectivamente. Los iones de los fragmentos del ión molecular en m/z 2232, observados en m/z 2086, 2029, 1721, 1517, 1371, 1209, 1006, 844, y 682 (no mostrados) identificaron una secuencia HexNAc-(Fuc-)-Hex-HexNAc-(Fuc-)-Hex-HexNAc-Hex-Hex.
- La segunda serie de iones moleculares en m/z 1958 y 1974 identificó una octaglicosilceramida con una fucosa, tres HexNAc y cuatro hexosas, y con t18:0-16:0 y t18:0-h16:0 ceramidas, respectivamente. Los iones de los fragmentos derivados del ión molecular en m/z 1958, encontraron que m/z 1755, 1609, 1446, 1243, 1081, 878, 716 (no mostrado) y 554 (no mostrado), demostraron una secuencia de carbohidrato HexNAc-(Fuc-)-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-Hex.
- III) La región anomérica del espectro de RMN de protón de la fracción A-III (no mostrado) es compleja, consistente de al menos cuatro especies de las cuales dos son dominantes. Una de las contribuciones menores es debido al glicolípido A7 tipo 4 como se describió anteriormente, mientras que los dos compuestos dominantes se pueden atribuir a A8 tipo 1 (GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Ger) y A9 tipo 1 (GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), de los cuales el primero ha sido previamente aislado de intestino delgado de rata. La estructura A8 tipo 1 así muestra las siguientes señales anómicas: 5.066 ppm (Fuc α 2), 4.917 ppm (GalNAc α 3), 4.783 ppm (GlcNAc β 3 núcleo), 4.53 ppm (GlcNAc β 3), 4.49 ppm (Gal β 3), 4.26 ppm (Gal β 4), 4.209 ppm (Glc β 1) y 4.195 ppm (Gal β 3 núcleo). El último compuesto (A9 tipo 1) no se ha descrito anteriormente, pero se diferencia de la estructura A9 tipo 3 sólo en que el Gal del núcleo en la posición 4 está con enlace 3 en lugar de con enlace 4. Sin embargo, esto afecta a la región anomérica del espectro de RMN de manera significativa con respecto al determinante interno del grupo sanguíneo A. Las siguientes señales anómicas se podrían establecer (los valores A9 de tipo 3 medidos a 35 °C (Clausen H, Lavery SB, Nudelman E, Tsuchiya S, Hakomori S, 1985. Proc Natl Acad Sci U S A. 82(4):1199-203.) están dados en el paréntesis): GalNAc α 3 externa en 4.950 ppm (4.947), Fuc α 2 externa en 5.055 ppm (5.061), Gal β 3 externa en 4.657 ppm (4.663), GalNAc α 3 interna en 4.933 ppm (4.955), Fuc α 2 interna en 5.276 ppm (5.329), Gal β 3 interna en 4.469 ppm (Gal β 4 4.344), GlcNAc β 3 del núcleo en 4.50 ppm (4.618), Gal β 4 del núcleo en 4.26 ppm (4.260) y Glc β 1 del núcleo en 4.158 ppm (4.168).

Ejemplo 16d: Fracciones A-IV-VI.

Las fracciones de unión a la *E. coli* F18 fimbriada A-IV-VI migraron más abajo de la región octaglicosilceramida en los cromatogramas de capa fina. Los espectros de masas FAB de ión negativo (no mostrado) de estas fracciones fueron muy complejos. El espectro de la fracción A-IV tuvo dos iones moleculares en m/z 2407 y 2435, indicando un decaglicosilceramida con dos fucosas, cuatro HexNAc y cuatro hexosas, con t18:0-h22:0 y t18:0-h24:0 ceramidas, respectivamente. Los iones de los fragmentos del ión molecular en m/z 2435 se observaron en m/z 2232, 1924 y 1721, identificando una secuencia terminal HexNAc-(Fuc-)-Hex-HexNAc. La espectrometría de masas FAB del ión negativo de la fracción A-V demostró iones moleculares a m/z 2553 y 2581, correspondiendo a un undecaglicosilceramida con tres fucosas, cuatro HexNAc y cuatro hexosas, con t18:0-h22:0 y t18:0-h24:0 ceramidas, respectivamente. Una secuencia

terminal HexNAc-(Fuc-)Hex-HexNAc se sugirió por los iones del fragmento a partir del ión molecular m/z 2581, encontrado en m/z 2378, 2070 y 1867.

El compuesto principal de la fracción A-VI dio lugar a iones moleculares en m/z 2772 y 2800, que tentativamente lo identificaron como un glicoesfingolípido con doce unidades de carbohidratos (dos fucosas, cinco HexNAc y cinco Hex), combinado con t18:0-H22:0 y t18:0-H24:0 ceramidas, respectivamente. Los iones de los fragmentos del ión molecular en m/z 2800, observados en m/z 2597, 2289 y 2086, de nuevo identificaron una secuencia terminal HexNAc-(Fuc-)Hex-HexNAc.

Ejemplo 17: Ensayo de inhibición de carbohidrato con el pentasacárido y lacto-N-tetraosa del grupo sanguíneo H tipo1.

La capacidad de los oligosacáridos solubles (pentasacárido y lacto - N-tetraosa del grupo sanguíneo tipo H 1) para interferir con la unión de la *E. coli* F18 fimbriada a células de intestino delgado porcino se evaluó en el ensayo *in vitro* de adhesión a las vellosidades.

Materiales y Métodos

La cepa 107/86 de *E. coli* F18 positiva (8×10^7 bacterias) se incubaron con diferentes concentraciones (10 mg/ml, 1 mg/ml, 100 mg/ml) de pentasacárido del grupo sanguíneo H tipo 1 (Fuca2Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glc) o lacto-N-sacárido tetraosa (Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glc) (Glycoseparations, Moscú, Rusia) en un volumen final de 100 μl de PBS, por 1 hora a temperatura ambiente, mientras que se agitaron suavemente. Las mezclas se añadieron después a las vellosidades, y de nuevo se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Después de eso, las vellosidades se examinaron por microscopía de contraste de fases con un aumento de 600, y el número de bacterias adheridas a lo largo de unos 50-μm de borde en cepillo se evaluó cuantitativamente contando el número de bacterias adheridas en 20 lugares seleccionados al azar, después de lo cual se calculó el promedio de adhesión bacteriana. Las vellosidades de dos cerdos diferentes F18R positivos, y los conteos se realizaron por triplicado. Los cerdos usados se encontraron que eran del grupo sanguíneo H de tipo 1 y 2 positivo, y grupo sanguíneo A tipo 2 negativo, por inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos monoclonales específicos al grupo sanguíneo (clon 17-206, GeneTex, Inc., San Antonio, Tx; clon 92FR-A2, Abcam, Cambridge, Reino Unido; clon 29,1 Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), y el anticuerpo secundario anti-ratón marcado con FITC (Sigma-Aldrich).

Resultados

Una fuerte reducción (87.1 %, S.D. = 4.5 y el 68.5 %, S.D. = 12.2) de la adherencia de *E. coli* F18 positiva a las vellosidades intestinales porcinas de dos cerdos diferentes se obtuvo por incubación de las bacterias con 10 mg/ml y 1 mg/ml de pentasacárido del grupo sanguíneo H tipo I (H5-1, Fuca2Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glc) (Figura 6), mientras que la incubación con 100 mg/ml del sacárido H5-1 no tuvo ningún efecto visible (1.4% de inhibición, S.D. = 11.14) en la adherencia de las bacterias. La incubación con diferentes concentraciones (10 mg/ml, 1 mg/ml, 100 mg/ml) de sacárido lacto-N-tetraosa (LNT, Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glc) no tuvo ningún efecto (5.8% de inhibición, S.D.= 8.9; 5.8 % de inhibición, S.D. = 6.4 y 4.2 % de inhibición, S.D. = 4.2, respectivamente) en la adherencia de *E. coli* F18 fimbriada

Ejemplo 18: Ensayo de inhibición de carbohidratos con el pentasacárido del grupo sanguíneo H tipo1, hexasacárido del grupo sanguíneo A tipo 1, hexasacárido del grupo sanguíneo B tipo1 y sacárido lacto-N-tetraosa .

La capacidad de los oligosacáridos solubles (pentasacárido del grupo sanguíneo H tipo 1, hexasacárido del grupo sanguíneo A tipo 1, hexasacárido del grupo sanguíneo B tipo 1 y lacto N-tetraosa) para interferir con la unión de la *E. coli* F18 fimbriada a células de intestino delgado porcino se evaluó en el ensayo *in vitro* de adhesión a las vellosidades.

Materiales y Métodos

La cepa 107/86 de *E. coli* F18 positiva (8×10^7 bacterias) se incubó con 1 mg de pentasacárido del grupo sanguíneo H tipo 1 (H5-1, Fuca2Galβ3GlcNAcβ3Gal(34Glc), hexasacárido del grupo sanguíneo A tipo I (A6-1, GalNAcα3(Fuca2)Galβ3GlcNAcβ3Gal(34Glc), hexasacárido del grupo sanguíneo B tipo 1(B6-1, Galα3(Fuca2)Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glc) o sacárido lacto-N tetraosa (LNT, Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glc) (Elicityl, Grenoble, Francia) en un volumen final de 100 μl de PBS, por 1 h a temperatura ambiente, mientras que se agitaron suavemente. Las mezclas se añadieron después a las vellosidades, y de nuevo se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Después de eso, las vellosidades se examinaron por microscopía de contraste de fases, y las bacterias adheridas se cuantificaron como se describió anteriormente. Las vellosidades de dos cerdos diferentes F18R positivos se usaron, y los

conteos se realizaron por triplicado. Los cerdos usados se encontraron que eran del grupo sanguíneo H de tipo 1 y 2 positivo, y grupo sanguíneo A tipo 2 negativo, por inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos monoclonales específicos al grupo sanguíneo (clon 17-206, GeneTex, Inc., San Antonio, Tx; clon 92FR-A2, Abcam, Cambridge, Reino Unido; clon 29.1 Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), y el anticuerpo secundario anti-ratón marcado con FITC (Sigma-Aldrich).

Resultados

Pre-incubación de *E. coli* F18 positiva con 1 mg de pentasacárido de grupo sanguíneo H tipo 1 (H5-1, Fuc α 2Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc) resulta en 52.4 % de inhibición (S.D. = 19.9) de adherencia de *E. coli* F18⁺ a las vellosidades intestinales porcinas de dos cerdos diferentes (Figura 7). La pre-incubación de *E. coli* F18⁺ con 1 mg de hexasacárido de grupo sanguíneo A tipo 1 (A6-1, GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc) y hexasacárido de grupo sanguíneo B tipo 1 (B6-1, Gal α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc) conducen a 72.9% (S.D. = 15.5) y 86.8% (S.D. = 11.4) de inhibición, respectivamente. En contraste, la incubación con 1 mg de sacárido lacto-*N*-tetraosa (LNT) no tuvo efecto (-2.8 % de inhibición, S.D. = 12.4) en la adherencia de *E. coli* F18⁺.

Ejemplo 19: Ensayo de inhibición de carbohidrato con azúcares de grupos sanguíneos multivalentes.

La capacidad de los azúcares de grupos sanguíneos multivalentes para interferir con la unión de la *E. coli* F18 fimbriada a células de intestino delgado porcino se evaluó además en el ensayo *in vitro* de adhesión a las vellosidades

Materiales y Métodos

La cepa 107/86 de *E. coli* F18 positiva (8 x 10⁷ bacterias) se incubó con diferentes concentraciones de proteína (0.2 μ g; 2 μ g; 10 μ g; 20 μ g) de pentasacárido del grupo sanguíneo H tipo 1 (H5-1, Fuc α 2Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc) conjugado a HSA (H5-1/HSA; 25 mol oligosacárido/mol proteína o se incubó con el hexasacárido de grupo sanguíneo A tipo I (A6-1, GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc) conjugado a HSA (A6-1/1-HSA; 9 mol oligosacárido/mol proteína) (IsoSep AB, Tullinge, Suecia) en un volumen final de 100 μ l PBS, por 1 h a temperatura ambiente, mientras que se agitaron suavemente. Las mezclas se añadieron después a las vellosidades, y de nuevo se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Después de eso, las vellosidades se examinaron por microscopía de contraste de fases, y las bacterias adheridas se cuantificaron como se describió anteriormente. Se usó vellosidades de un cerdo F18R positivo, y los conteos se realizaron por duplicado. El cerdo usado se encontró que era del grupo sanguíneo H de tipo 1 y 2 positivo, y grupo sanguíneo A tipo 2 negativo, por inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos monoclonales específicos al grupo sanguíneo (clon 17-206, GeneTex, Inc., San Antonio, Tx; clon 92FR-A2, Abcam, Cambridge, Reino Unido; clon 29.1 Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), y el anticuerpo secundario anti-ratón marcado con FITC (Sigma-Aldrich).

Resultados

Una fuerte reducción (71.4 %, S.D. = 9.2 y 71.1 %, S.D. = 5.8) de la adherencia de *E. coli* F18 positiva a vellosidades intestinales porcinas se obtuvo por la incubación de las bacterias con 10 μ g y 20 μ g de pentasacárido del grupo sanguíneo H tipo 1 (H5-1, Fuc α 2Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc), conjugado a HSA (H5-1/HSA), mientras que la incubación con 2 μ g de H5-1/HSA tuvo solamente efecto moderado (35.8 % inhibición, S.D. = 11.3) y la incubación con 0.2 μ g de H5-1/HSA tuvo solo poco efecto (18.7 % de inhibición, S.D. = 11.7) en la adherencia de *E. coli* F18⁺ (Figura 8). Del mismo modo, una fuerte reducción (67.1 %, S.D. = 10.8 y 69.1 %, S.D. = 5.0) de la adherencia de *E. coli* F18⁺ a las vellosidades intestinales porcinas se observó después de la pre-incubación de *E. coli* F18⁺ con 10 y 20 μ g de hexasacárido del grupo sanguíneo A tipo 1 (A6-1, GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc), conjugado a HSA (A6-1/HSA). Un efecto moderado (30.6 % de inhibición, S.D. = 22.2) se observó después de la incubación con 2 μ g de A6-1/HSA, mientras que la incubación con 0.2 μ g de A6-1/HSA sólo tuvo poco efecto (11.3 % de inhibición; S.D. = 8.6

No se obtuvo inhibición de la adherencia de *E. coli* F18⁺ a las vellosidades intestinales porcinas cuando se pre-incubó *E. coli* F18⁺ con 20 μ g de HSA.

Ejemplo 20: Un método para identificar moléculas que se unen a los compuestos de la presente invención

Materiales y Métodos

Para identificar moléculas tales como anticuerpos o lectinas que se unen a los compuestos de la presente invención, una placa de 96 pocillos Maxisorb se recubrió con 2.5 μ g/ml del grupo sanguíneo H tipo 1 (H5-1, Fuc α 2Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc), conjugado a HSA (H5-1/HSA) durante 2 horas a 37°C. Las placas se bloquearon durante

toda la noche a 4 °C con PBS + 0.2 % Tween® 80. Posteriormente, las placas se incubaron secuencialmente con un anticuerpo monoclonal específico del grupo sanguíneo H de tipo 1 (clon 17-206, GeneTex, Inc., San Antonio, Texas) diluido 1/100 en PBS + 0.2 % Tween® 20 + 3 % BSA y con anti-ratón-HRP en conejo (Dako). Cada etapa de incubación de 1 hora se siguió por 3 lavados con PBS + 0.2 % Tween® 20. Después de la incubación con el sustrato ABTS, se midió la DO₄₀₅.

5 Resultados

Una DO₄₀₅ de 1.084 se midió después de la incubación con el sustrato ABTS. Esto indica que el anticuerpo específico al grupo sanguíneo H tipo 1 reconoce el pentasacárido del grupo sanguíneo H tipo 1 conjugado a HSA. Por lo tanto, concluimos que este método se puede usar para detectar moléculas que se unen a los compuestos de la presente invención.

10 Ejemplo 21. Ensayo de inhibición de carbohidrato con el disacárido del grupo sanguíneo H (Fuca2Gal)

La capacidad de H-disacárido soluble (Fuca2Gal) para interferir con la unión de la *E. coli* F18 fimbriada a células de intestino delgado porcino se evaluó en el ensayo in vitro de adhesión a las vellosidades

Materiales y Métodos

15 La cepa 107/86 de *E. coli* F18 positiva (8×10^7 bacteria) se incubó con diferentes concentraciones (0.2 mg, 1 mg) de disacárido del grupo sanguíneo H (IsoSep, Suecia) en un volumen final de 100 µl de PBS, por 1 h a temperatura ambiente, mientras que se agitaron suavemente. Las mezclas se añadieron después a las vellosidades, y de nuevo se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Después de eso, las vellosidades se examinaron por microscopía de contraste de fases con un aumento de 600, y el número de bacterias adheridas a lo largo de unos 50-µm de borde en cepillo se evaluó cuantitativamente contando el número de bacterias adheridas en 20 lugares seleccionados al azar, después de lo
20 cual se calculó el promedio de adhesión bacteriana. Las vellosidades de un cerdo F18R positivo se usaron, y los conteos se realizaron por triplicado.

Resultados

25 Una fuerte reducción (83.7 %, S.D. = 8.8) de la adherencia de *E. coli* F18 positiva a las vellosidades intestinales porcinas se obtuvo por incubación de las bacterias con 1 mg de disacárido del grupo sanguíneo H (Fuca2Gal) (Fig. 9), mientras que la incubación con 0.2 mg del disacárido H no tuvo efecto visible (5.1 % de inhibición, S.D. = 12.1) en la adherencia de las bacterias.

Además para la identificación de Fuca2Galβ3GlcNAc como un determinante de unión mínimo de E Coli F18 fimbriada en el ejemplo 12, estábamos aquí capaces de localizar además el determinante de unión mínima a Fuca2Ga

30 **Tabla 1.** Unión de la *Escherichia coli* (pIH120) que expresa fimbrias F18 recombinantes marcadas con ³⁵S, y *E. coli* recombinante que expresa fimbrias F18 con la delección de la subunidad (pIH126), a glicosfingolípidos en cromatogramas de capa fina

núm. nombre trivial	Estructura	pH120	pH126
<i>Compuestos simples</i>			
1. Galactosilceramida	Gal β 1Cer	- ^a	-
2. Glucosilceramida	Glc β 1Cer	-	-
3. Sulfatida	SO ₃ -3Gal β 1Cer	-	-
4. LacCer (d18:1-16:0-24:0) ^b	Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
5. LacCer (t18:0-h16:-h24:0)	Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
6. Isoglobotri	Gal α 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
7. Globotri	Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
8. A-4	GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
<i>Ganglioseries</i>			
9. GgO3	GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
10. GgO4	Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
11. Fuc-GgO4	Fuca2Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
12. Sulf-GgO4	SO ₃ -3Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
<i>Neolactoseries</i>			
13. Neolactotetra	Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
14. H5 tipo 2	Fuca2Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
15. B5	Gal α 3Gal β 34GlcNAc β 3Gal β 34Glc β 1Cer	-	-
16. B6 tipo 2	Gal α 3(Fuca2)Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
17. A6 tipo 2	GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
18. B7 tipo 2	Gal α 3(Fuca2)Gal β 4(Fuca3)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
19. A7 tipo 2	GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 4(Fuca3)GlcNAc β 3Gal β 34Glc β 1Cer	-	-
<i>Lactoseries</i>			
20. Lactotetra	Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
21. Le ^a -5	Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
22. Le ^b -6	Fuca2Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
23. H5 tipo 1	Fuca2Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+++	-
24. B6 tipo 1	Gal α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+++	-
25. A6 tipo 1	GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+++	-
26. A7-1 tipo 1	GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+++	-
27. B7 tipo 1	Gal α 3(Fuca2)Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+++	-
28. A8 tipo 1	GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+++	-
29. A9 tipo 1	GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+++	-

núm. nombre trivial	Estructura	pH120	pH126
<i>Globoseries</i>			
30. Globotetra	GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
31. Forssman	GalNAc α 3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
32. A7 tipo 4	GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer	+++	-
<i>Gangliósidos</i>			
33. NeuGc-GM3	NeuGc α 3Gal β 4Glc β 31Cer	-	-
34. NeuGc-GM1	Gal β 3GalNAc β 4(NeuGc α 3)Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
35. NeuAc-GM1	Gal β 3GalNAc β 4(NeuAc α 3)Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
36. NeuAc-GD1b	Gal β 3GalNAc β 4(NeuAc α 8NeuAc α 3)Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
37. NeuAc α 3SPG	NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-
^a La unión se define como sigue: +++ indica una tinción intensa cuando 4 μg del glicoesfingolípido se aplicó sobre el cromatograma de capa fina, + indica una tinción, mientras que - indica sin unión incluso a 4 μg. ^b En la nomenclatura abreviada de los ácidos grasos y bases, el número antes de los dos puntos se refiere a la longitud de cadena de carbono y el número después de los dos puntos asigna el número total de dobles enlaces en la molécula. Los ácidos grasos con un grupo 2-hidroxi se indican por el prefijo h antes de la abreviatura por ejemplo. h16:0. Para bases de cadena larga, d indica dihidroxi y t trihidroxi. Así d18:1 indica esfingosina (1,3-dihidroxi-2-aminooctadeceno) y t18:0 fitesfingosina (1,3,4-trihidroxi-2-aminooctadeceno).			

Tabla 2 : Visión general de los glicosfingolípidos de unión a la *E. coli* F18 frimbriada aislada a partir de un cerdo del grupo sanguíneo O y A

Cerdo	Fracción	cantidad	identidad
cerdo del grupo sanguíneo O	O-I	6,0 mg	pentaglicosilceramida H tipo 1
			Fuc _α 2Gal _β 3GlcNAc _β 3Gal _β 4Glc _β 1Cer
cerdo del grupo sanguíneo A	A-I	12,6 mg	hexaglicosilceramida A tipo 1
			GalNAc _α 3(Fuc _α 2)Gal _β 3GlcNAc _β 3Gal _β 4Glc _β 1Cer
	A-II	3,6 mg	heptaglicosilceramida A tipo 4
			GalNAc _α 3(Fuc _α 2)Gal _β 3GalNAc _β 3Gal _α 4Glc _β 1Cer
	A-III	0,3 mg	octaglicosilceramida A tipo 1
			GalNAc _α 3(Fuc _α 2)Gal _β 3GlcNAc _β 3Gal _β 3GlcNAc _β 3Gal _β 4Glc _β 1Cer
			nonaglicosilceramida A tipo 1
			GalNAc _α 3(Fuc _α 2)Gal _β 3GalNAc _α 3(Fuc _α 2)Gal _β 3GlcNAc _β 3Gal _β 4Glc _β 1Cer
	A-IV	0,5 mg	decaglicosilceramida
			dos fucosas, cuatro HexNAc y cuatro hexosas
	A-V	0,2 mg	undecaglicosilceramida
			tres fucosas, cuatro HexNAc y cuatro hexoses
	A-VI	0,2 mg	glicosfingolípido con 12 unidades de carbohidrato
			dos fucosas, cinco HexNAc y cinco hexosas

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para el uso para tratar o prevenir una infección de *E. coli* F18+ en cerdos en donde dicho compuesto se une a la *E. coli* F18+, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o dominio de unión del receptor de FedF y en donde dicho compuesto es de la fórmula (I)



en donde

X está ausente, es $\text{Gal}\alpha 3$ o es $\text{GalNAc}\alpha 3$ y cuando X está ausente, entonces Y está ausente
Y está ausente o es $\text{Fu}\alpha 4$;
T está ausente o es $\text{ZNAc}\epsilon 3$;

y en donde Z es Glc o Gal; y
 ϵ es α o β ;

V está ausente o es un mono- o polisacárido;
n es 1 o mayor; y

W está ausente o es un portador capaz de unir n cadenas de polisacáridos, siendo particularmente dicho portador una proteína, un lípido, un glicolípido, una glicoproteína, un glicosfingolípido, una ceramida, una lectina, un anticuerpo, una inmunoglobulina, un mimico sintético del portador antes mencionado, una molécula orgánica, una molécula pequeña, un producto químico, una nanopartícula, una perla, o un gel.

2. Un compuesto para el uso como el reivindicado en la reivindicación 1, en donde V es $\text{UGal}\beta 4\text{Glc}\beta 1$; y en donde U está ausente, es $\text{Gala}4$, $\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3$, o $(\text{Fu}\alpha 2)\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3$.
3. Un compuesto para el uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde X es $\text{Gal}\alpha 3$ o $\text{GalNAc}\alpha 3$; Z es Glc o Gal y Y está ausente.
4. Un compuesto para el uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde T es $\text{ZNAc}\epsilon 3$ y en donde ϵ es β y Z es Glc.
5. Un compuesto para el uso como el reivindicado en la reivindicación 1, en donde X, Y, T y V están ausentes.
6. Un compuesto para el uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde dicho compuesto es un compuesto de la Fórmula (Ia)



en donde

U está ausente, es $\text{Gala}4$, es $\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3$, o es $(\text{Fu}\alpha 2)\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3$.

7. Un compuesto para el uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde n es uno o mas, y en donde W está ausente o en donde W es un portador capaz de unir n cadenas de polisacáridos, particularmente dicho portador que se selecciona a partir del grupo que comprende: una ceramida, un mono- o polisacárido, una proteína, un lípido, un glicolípido, una glicoproteína, un glicosfingolípido, una lectina, un anticuerpo, una inmunoglobulina, un mimico sintético del portador antes mencionado, una molécula orgánica, una molécula pequeña, un producto químico, una nanopartícula, una perla, o un gel.
8. Un compuesto para el uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde dicho compuesto es

$\text{Fu}\alpha 2\text{Gal}$
 $\text{Fu}\alpha 2\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$;
 $\text{Gala}3(\text{Fu}\alpha 2)\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$;
 $\text{GalNAc}\alpha 3(\text{Fu}\alpha 2)\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$;
 $\text{GalNAc}\alpha 3(\text{Fu}\alpha 2)\text{Gal}\beta 3(\text{Fu}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$;

Gal α 3(Fuc α 2)Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc;
 GalNAc α 3(Fuc α 2)Galp3GlcNAc β 3Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc;
 GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GalNAc β 3Gala4Gal β 4Glc; o
 GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc;
 y conjugados polivalentes reductores del extremo de estos.

9. Un compuesto como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el uso como una medicina.
10. Un compuesto como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el uso en el tratamiento de infecciones por la *E. coli* F18⁺ en cerdos particularmente en el tratamiento de diarrea y edema después del destete en cerdos.
11. Un compuesto como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el uso como el definido en las reivindicaciones 9 o 10, para administración oral.
12. Un método para identificar moléculas que afectan la unión entre la *E.coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o dominio de unión del receptor de FedF y el compuesto como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende:
- poner en contacto la molécula que se prueba con la *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesinas F18, FedF o dominio de unión del receptor de FedF; y dicho compuesto, y
 - determinar si dicha molécula afecta la unión de *E. coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesina F18, FedF o el dominio de unión del receptor de FedF con dicho compuesto.
13. Un método como el reivindicado en la reivindicación 12 que comprende:
- realizar un ensayo de unión en el cromatograma; o
 - realizar la prueba de adhesión a las vellosidades;
- en donde el compuesto o *E coli* F18⁺, fimbrias F18, adhesinas F18, FedF, el dominio de unión al receptor de FedF o la molécula está presente en un soporte sólido, una célula o tejido.
14. Una composición farmacéutica para el uso en un método de tratamiento que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y como un ingrediente activo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
15. Un aditivo de alimentos o bebidas que comprende uno o más de los compuestos seleccionados del grupo que consiste de:
- [Gal α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc]_n-W;
 [GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc]_n-W;
 [GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc]_n-W;
 [GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GalNAc β 3Gala4Gal β 4Glc]_n-W; y
 [GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc]_n-W,
- en donde n es uno o más, y en donde W está ausente o en donde W es un portador capaz de unir n cadenas de polisacáridos, particularmente, dicho portador que se selecciona a partir del grupo que comprende: una ceramida, un mono- o polisacárido, una proteína, un lípido, un glicolípido, una glicoproteína, un glicosfingolípido, una lectina, un anticuerpo, una inmunoglobulina, un mimico sintético del portador antes mencionado, una molécula orgánica, una molécula pequeña, un producto químico, una nanopartícula, una perla, o un gel.
16. Pienso para cerdos suplementado con uno o más de los compuestos como el definido en la reivindicación 15.

Figura 1

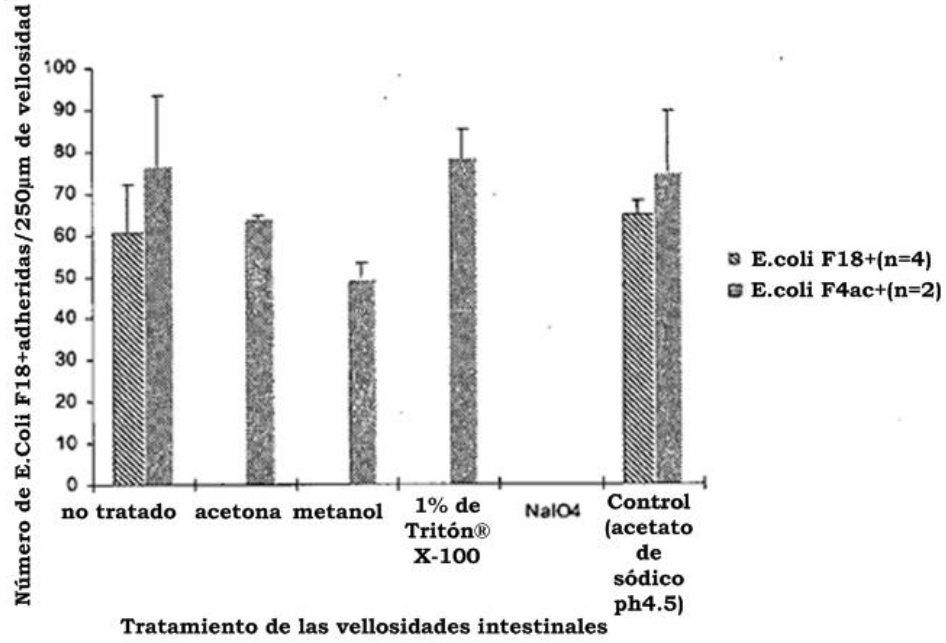


Figura 2

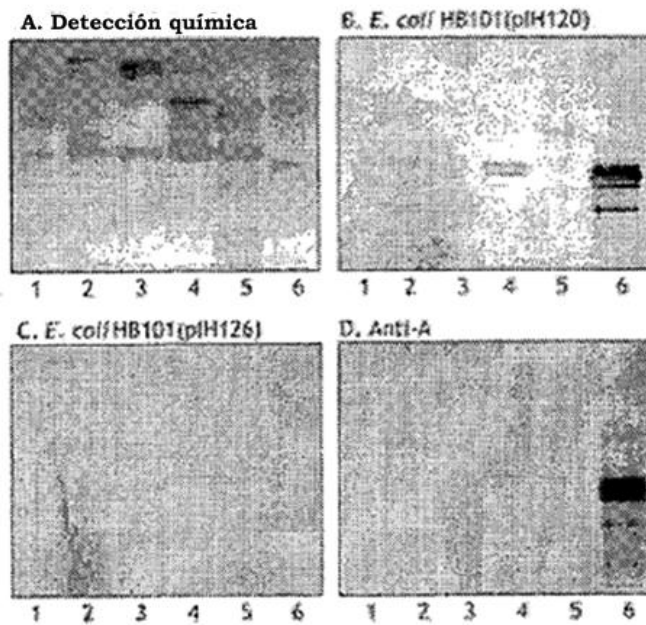


Figura 3

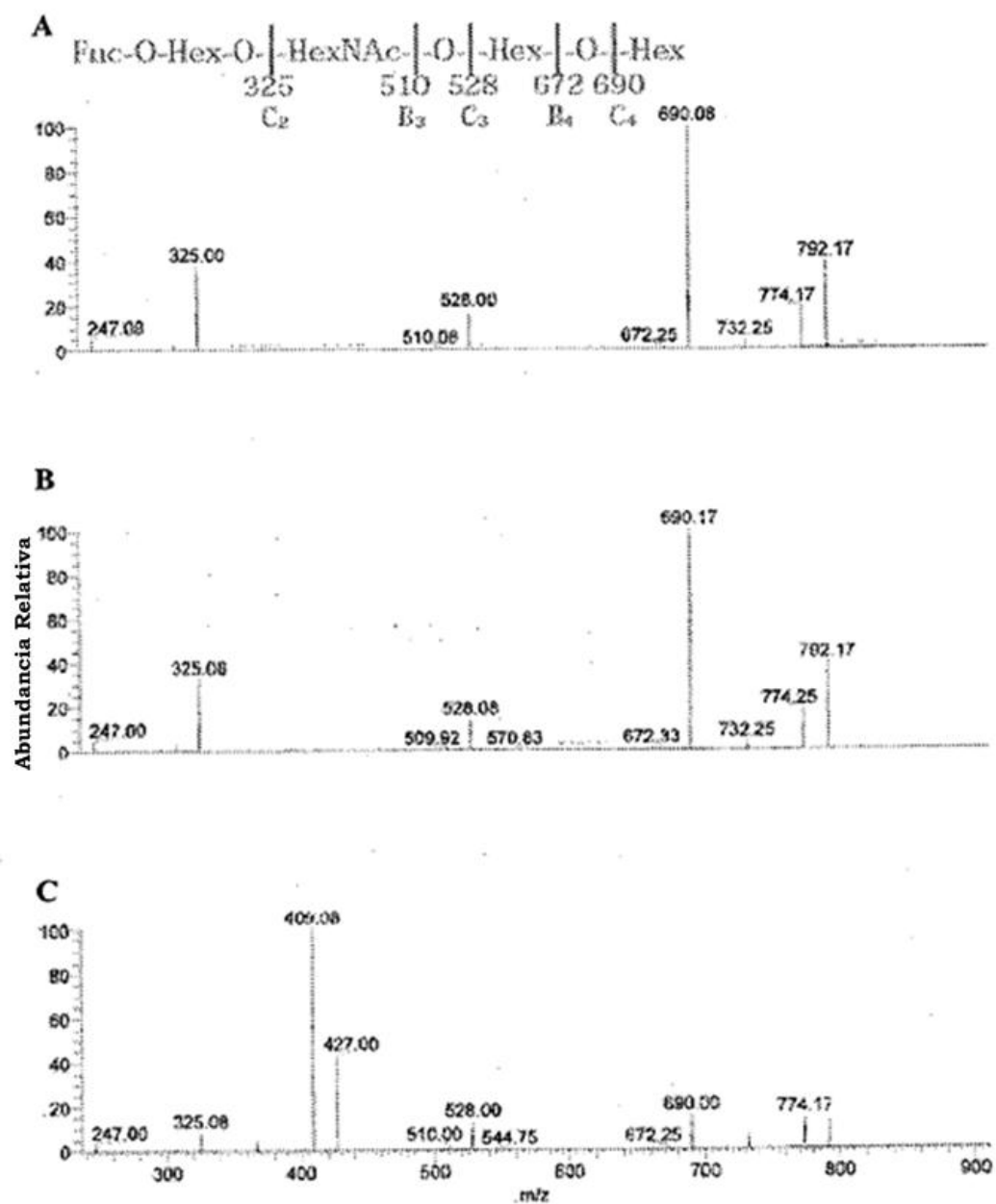


Figura 4

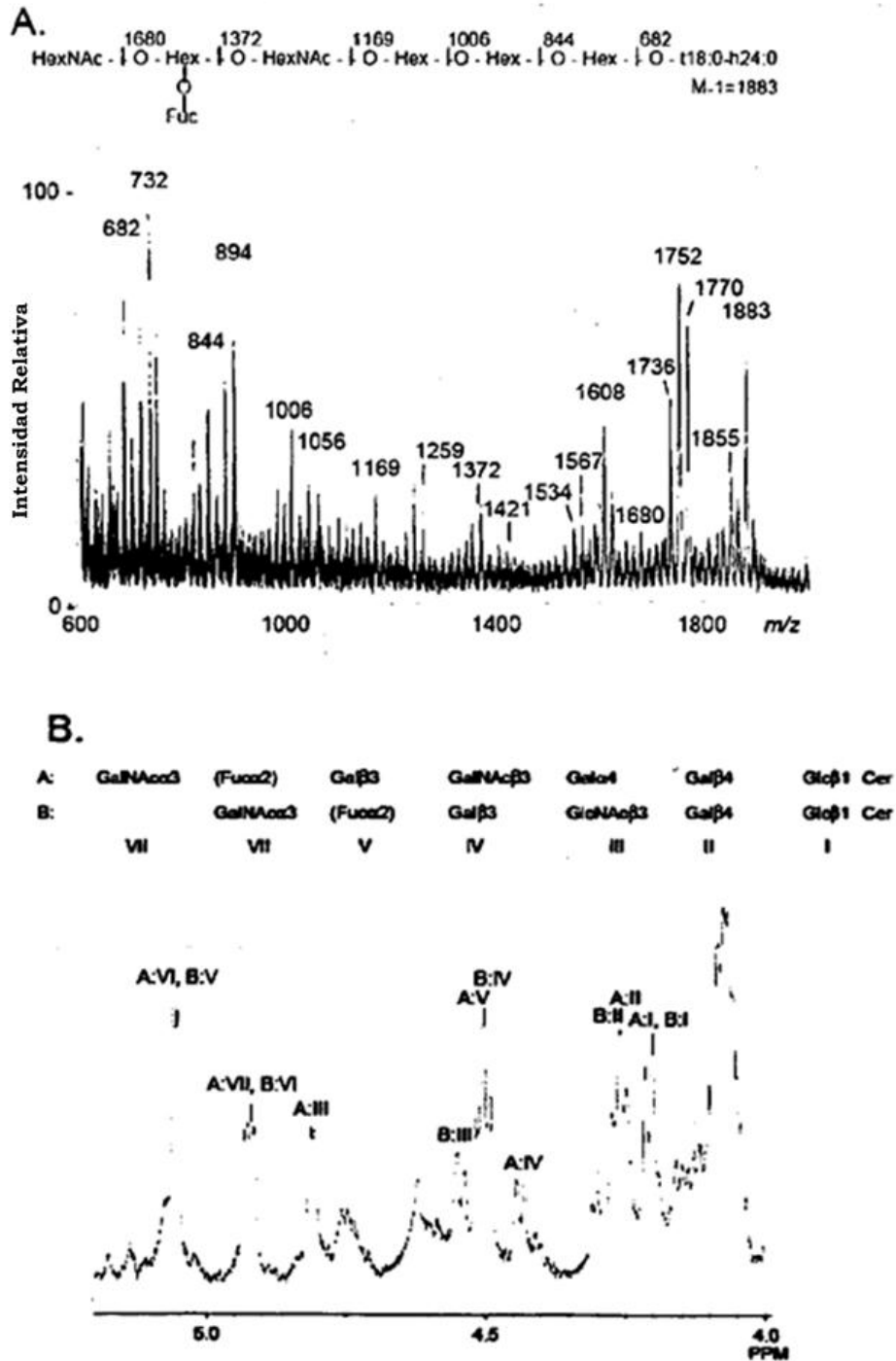


Figura 5

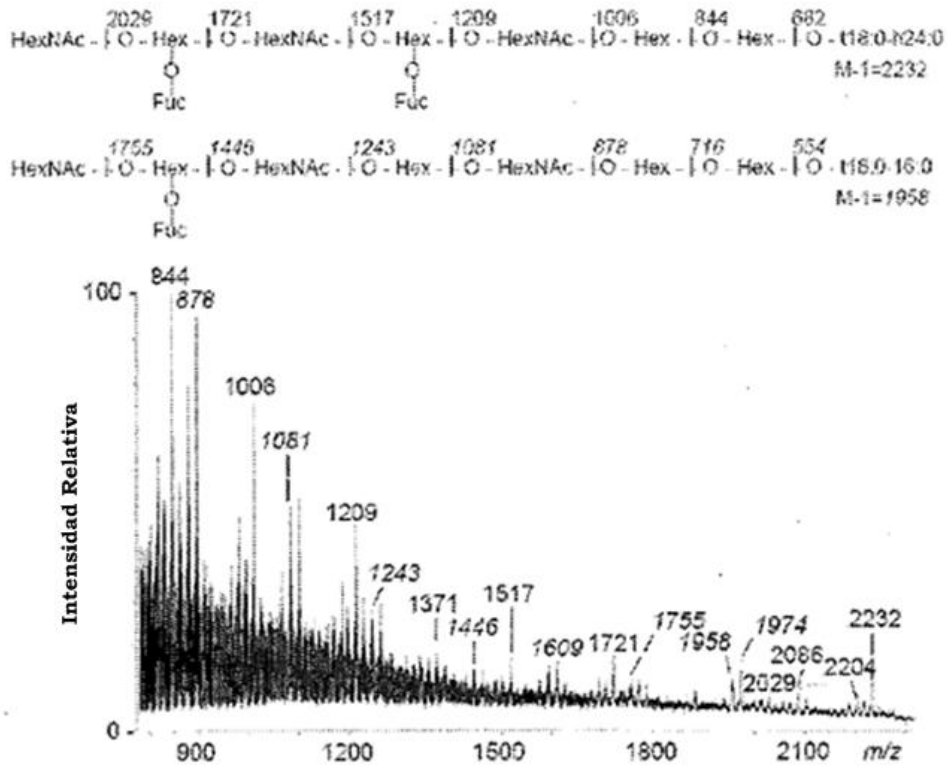


Figura 6

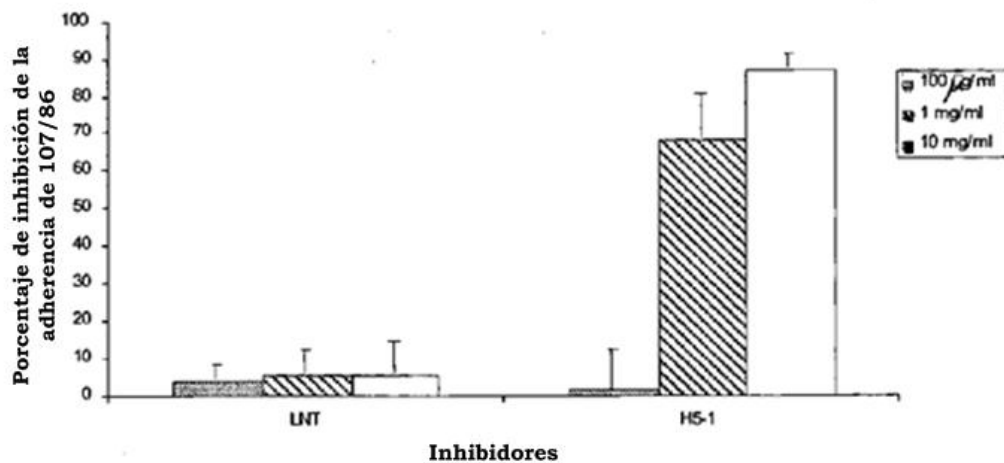


Figura 7

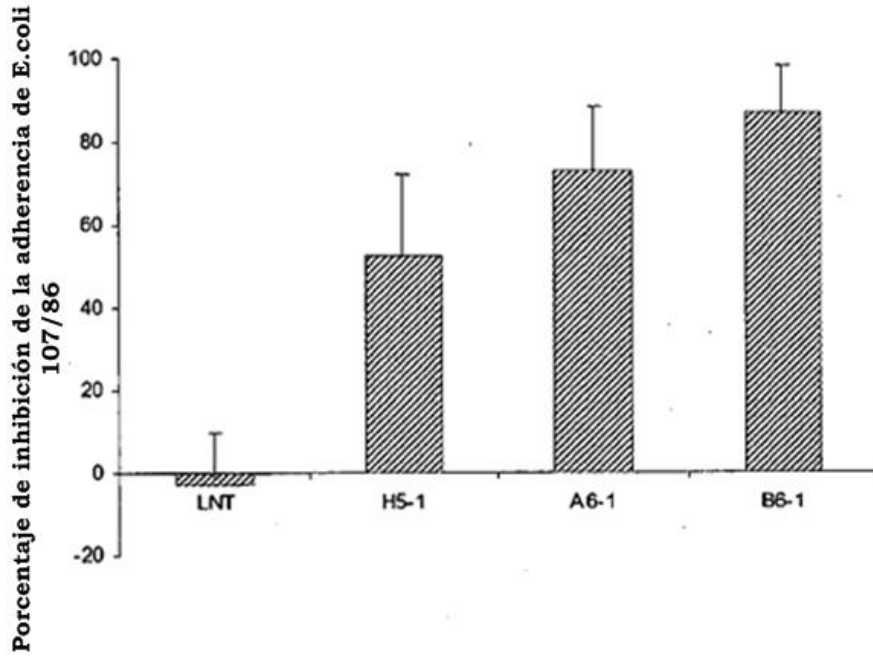


Figura 8

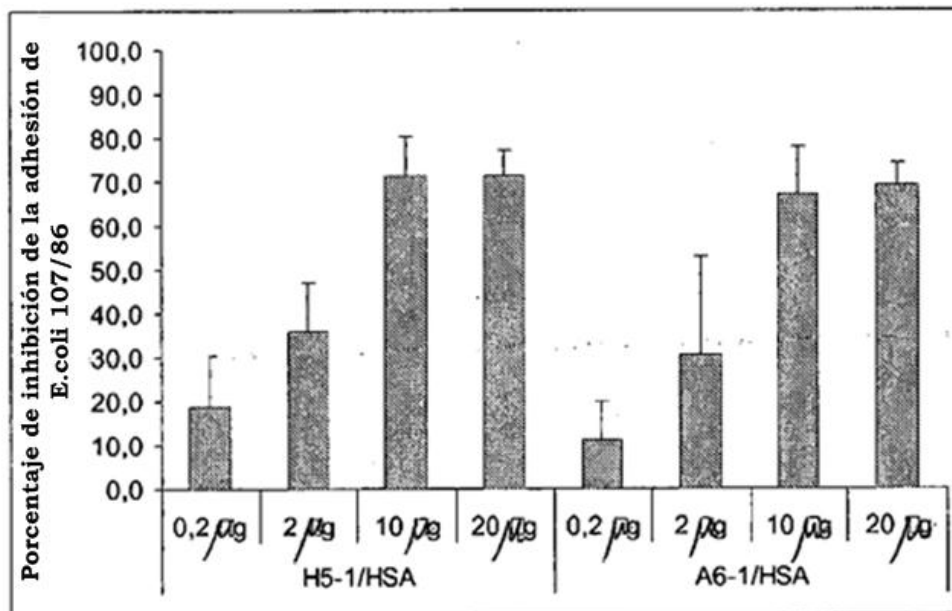


Figura 9

