

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 408**

51 Int. Cl.:

A61K 31/445	(2006.01) A23C 9/13	(2006.01)
A61K 36/00	(2006.01) A23K 1/17	(2006.01)
A61K 8/04	(2006.01) A23L 1/29	(2006.01)
A61K 8/30	(2006.01) A23L 2/00	(2006.01)
A61K 8/49	(2006.01) A23L 1/30	(2006.01)
A61Q 11/00	(2006.01) A61K 45/06	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01) A61K 31/4015	(2006.01)
A61K 9/06	(2006.01) A61K 31/45	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01) G01N 1/38	(2006.01)
A61K 9/68	(2006.01) A23K 1/16	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2011** **E 11710197 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015** **EP 2549994**

54 Título: **Uso de D-fagomina como inhibidor de la adherencia bacteriana a las células epiteliales**

30 Prioridad:

25.03.2010 EP 10382068

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

18.11.2015

73 Titular/es:

BIOGLANE, S.L.N.E. (100.0%)
C. Tavern 17, 3º 4º
08006 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

PUMAROLA SEGURA, SERGIO y
TORRES SIMÓN, JOSEP, LLUIS

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 551 408 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

Uso de D-fagomina como inhibidor de la adherencia bacteriana a las células epiteliales

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere al uso de iminociclitolos en la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de infecciones bacterianas o de desequilibrios en la microflora, así como a composiciones farmacéuticas, veterinarias o alimentarias que los contienen.

Antecedentes de la técnica

10

[0002] La adherencia bacteriana a las superficies mucosas se considera un prerequisite importante para la colonización y la infección. Una diversidad de moléculas y de estructuras macromoleculares, conocidas conjuntamente como adhesinas, una entidad de unión procedente de la bacteria, reconocen e interactúan con los receptores de la superficie de las células hospedadoras.

15

[0003] Se han descrito tres tipos principales de interacciones adhesina-receptor. El primer tipo de interacción adhesiva es debido a la unión de las lectinas con estructuras de carbohidratos. El segundo tipo, del cual se conoce un número significativo de casos, implica el reconocimiento entre una proteína de una bacteria y una proteína complementaria de la superficie mucosa. El tercer tipo comprende las interacciones de unión que se producen entre las hidrofobinas, que frecuentemente implican la interacción de las fracciones hidrófobas de las proteínas con lípidos.

20

[0004] El primer tipo, las adhesinas de lectina, se clasifican habitualmente según la especificidad del azúcar. La especificidad puede ser determinada mediante la inhibición de la adhesión con carbohidratos simples o complejos que compiten por la unión de las adhesinas a las células hospedadoras.

25

[0005] Sharon et al., en el documento "Bacterial adherence to cell surface sugars", Ciba Found Symp. 1981, vol.80, págs. 119 - 41, describen que la unión de las cepas de Escherichia coli y de Salmonella spp. a las células epiteliales es inhibida por la D-manosa. Desafortunadamente, la concentración activa de manosa necesaria para producir la inhibición es alta, de al menos aproximadamente 0,5 M. Escherichia coli está entre la causa más común de diarrea, en los receptores de las células epiteliales intestinales. Escherichia coli puede colonizar también el área vaginal y periuretral y ascender por el tracto urinario. Su adhesión a las células epiteliales es la etapa inicial en el establecimiento de una infección. Por lo tanto, se cree que la capacidad para unirse a la superficie de la mucosa es esencial para que Escherichia coli colonice y permanezca en el tracto urinario.

35

[0006] El documento, José A. Castillo et al "Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-Fagomine, N-alkylated derivatives and preliminary biological assays" Organic Letter 2006, vol. 8, n° 26, páginas 6067 - 6070, describe que la D-fagomina y los derivados N-alkilados C₄, C₆, C₈, C₉ y Ph-CH₂ no muestran actividad antimicrobiana.

40

[0007] Otro tipo de inhibidores son los iminociclitolos, denominados también iminoazúcares o azaazúcares. El documento, Barira Islam et al., "Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: Inhibition of Streptococcus mutans biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from Morus alba", Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008, vol. 62, págs. 751 - 757, describe la actividad antimicrobiana frente a S. mutans de la 1-deoxinojirimicina, un compuesto aislado a partir de M. alba. La DNJ es un inhibidor de la glucosidasa. Desafortunadamente, estos inhibidores de la glucosidasa a menudo provocan trastornos intestinales y diarrea.

45

[0008] Otros extractos botánicos se describen en las siguientes solicitudes de patente.

50

[0009] La solicitud de patente US20090087501 proporciona una composición oral que tiene al menos dos principios activos botánicos derivados de plantas. Los principios activos botánicos proporcionan unas propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, antienvjecimiento y/o curativas particularmente eficaces a la composición oral.

55

[0010] La solicitud de patente japonesa JP19920073844 describe una pasta de dientes que comprende un extracto de Kuwahakubi y un extracto de Morus Alba.

[0011] La solicitud de patente japonesa JP20070230719 describe un inmunoestimulante que comprende un extracto soluble en agua de corteza de morera como un principio activo.

60

[0012] El documento Asano et al. "N-containing sugars from Morus Alba and their glycosidase inhibitory activities" Carbohydrate Research 1994, vol. 259, páginas 243 - 255, describe los azúcares que contienen N procedentes de la raíces de Morus Alba, y las actividades inhibitoras de la glucosidasa de estos compuestos.

65

[0013] Finalmente, la solicitud de patente CA2696874 describe una fracción eficaz de alcaloides preparada a partir

de ramas de morera, y la composición farmacéutica que contiene la fracción eficaz para la preparación de agentes hipoglucémicos.

[0014] Otros documentos describen azúcares o iminoazúcares para diferentes aplicaciones farmacéuticas. La solicitud de patente WO2009152665 describe una composición farmacéutica que comprende fagomina para el tratamiento y la prevención de la diabetes. La solicitud de patente WO2010029313 describe alcaloides e iminoazúcares con actividad frente al HCV (el virus de la Hepatitis C) y el RSV (el virus respiratorio sincitial). La solicitud de patente WO03002127 describe el uso de una sustancia glucosidasa que comprende una estructura de piranosa con al menos un oligosacárido para el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

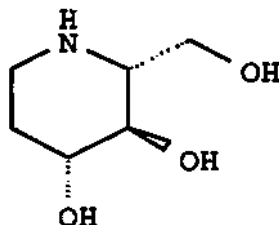
[0015] Finalmente, la solicitud de patente EP0852948 describe el uso de inhibidores de enzimas glucosidasas, tales como la α -galactosidasa, en el tratamiento de la malaria, el choque endotóxico y el choque séptico. Los inhibidores reducen la conversión del precursor de la toxina en la toxina, reduciendo así la cantidad de toxina en circulación en los pacientes con malaria.

[0016] Por lo tanto, a partir de lo que se sabe en la materia, se deduce que el desarrollo de inhibidores de las adherencias bacterianas todavía es de gran interés.

Resumen de la invención

[0017] Los inventores han averiguado que la D-fagomina inhibe la adherencia bacteriana a las células epiteliales, lo que hace este compuesto útil para la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de infecciones causadas por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli. Es ventajoso porque con unas concentraciones de ppm contribuye a la prevención y/o al tratamiento de las infecciones bacterianas, sin producir efectos secundarios.

[0018] La D-fagomina, (2R, 3R, 4R)-2-hidroximetilpiperidina-3,4-diol, es un iminociclitol natural, una piperidina polihidroxilada que fue aislada por primera vez a partir de semillas de trigo sarraceno de Fagopyrum esculentum moench y posteriormente a partir de Castanospermum australe, de hojas secas de Xanthocercis zambesiaca y de hojas de Morus bombycis. La D-fagomina, (2R, 3R, 4R)-2-hidroximetilpiperidina-3,4-diol se muestra en la siguiente fórmula.

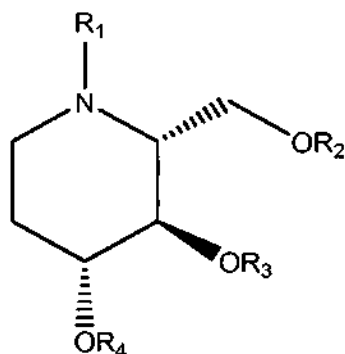


[0019] Nada en la materia sugiere que la D-fagomina o sus sales tengan la capacidad de inhibir la adherencia a las células epiteliales de las bacterias patógenas, y su valor práctico en la prevención y/o en el tratamiento coadyuvante de enfermedades en las que la adherencia bacteriana es un prerequisite para el inicio de la infección.

[0020] Por inhibición de la adherencia a las células epiteliales de las bacterias patógenas se entiende la reducción del contacto entre los receptores de la superficie de las células epiteliales y la entidad de unión originada en la bacteria, las adhesinas, típicamente las lectinas, impidiendo así la adhesión del agente infeccioso. Dado que una mejor adherencia permite la supervivencia bacteriana, al impedir la adhesión en una etapa temprana se impide la infección. Existen pruebas convincentes que demuestran que la adherencia a las células epiteliales de las bacterias entéricas, orales y respiratorias es necesaria para que la colonización, y que la colonización es necesaria para el subsiguiente desarrollo de los síntomas de las enfermedades, Ofek et al., "Bacterial adhesion to animal cells and tissues", ASM Press 2003, capítulo 1.

[0021] La inhibición no sólo impide que se produzca la infección, sino que también es útil como coadyuvante para el tratamiento de la infección. El mecanismo de adhesión es un proceso con múltiples etapas. Se ha sugerido que existen dos etapas cinéticamente distintas, la primera de las cuales es fácilmente reversible. Una vez que se ha producido la segunda etapa, la célula queda firmemente unida y la unión sólo es muy lentamente reversible. Por lo tanto, la primera etapa del mecanismo de adhesión puede ser reversible en el caso de que las adhesinas de las bacterias tengan una mayor afinidad por el agente antiadhesión, y puede tratarse una primera etapa de la infección bacteriana.

[0022] Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o a una sal del mismo farmacéuticamente, veterinaria o comestible aceptable,



(I)

en el que R₁, R₂, R₃, R₄ son H, para su uso en la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana o de un desequilibrio en la microflora causado por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli.

[0023] La presente invención desvela una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con excipientes o portadores farmacéuticos.

[0024] La presente invención desvela una composición veterinaria que comprende un compuesto de fórmula (I) o de una sal veterinaria aceptable del mismo, junto con excipientes o portadores veterinarios.

[0025] El compuesto de la invención, la D-fagomina, ayuda a mejorar la flora intestinal mediante la inhibición del crecimiento de las bacterias perjudiciales, por ejemplo, de Escherichia coli, pero sin inhibir las bacterias beneficiosas, por ejemplo, Lactobacilli y Bifidobacteria. Esto es porque este compuesto inhibe la adherencia bacteriana a las células epiteliales de una forma selectiva.

[0026] La presencia del compuesto de la invención en la comida animal está asociada con una disminución en la incidencia de enfermedades infecciosas y un aumento de peso, también denominado "efecto promotor del crecimiento", esto es porque el compuesto de la invención se adhiere a las bacterias perjudiciales, pero no a las bacterias sanas, por ejemplo, a Lactobacillus o Bifidobacterium y a otros probióticos útiles.

[0027] Por lo tanto, es posible usar la D-fagomina como parte de una composición nutricional para alimentos y pienso. Dicho alimento funcional tiene un efecto positivo sobre la salud de la persona o del animal al impedir una infección bacteriana causada por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli.

[0028] Por lo tanto, la presente invención desvela una composición alimenticia, un alimento para mascotas o una composición de pienso que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal comestible apropiada del mismo.

[0029] La mayoría de las bacterias poseen genes que codifican para más de un tipo de adhesina, un fenómeno que requeriría el uso de múltiples agentes para múltiples adhesinas.

[0030] Por lo tanto, el compuesto de la invención puede usarse solo o junto con otros compuestos o probióticos bioactivos adecuados. En una forma de realización en particular, puede usarse un compuesto de fórmula (I) o sus sales en la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana o de un desequilibrio en la microflora causado por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli, administrado solo o junto con un sacárido, un iminociclitol, probióticos o un agente antibacteriano.

[0031] Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una combinación de un compuesto de fórmula (I) o sus sales, con un sacárido, un iminociclitol, un probiótico o un agente antibacteriano, para su uso en la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana o de un desequilibrio en la microflora causado por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli. La presente invención desvela una composición farmacéutica, que comprende una combinación de un compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un sacárido, un iminociclitol, un probiótico o un agente antibacteriano, junto con excipientes o portadores farmacéuticos.

[0032] Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición veterinaria que comprende un compuesto de fórmula (I) o sus sales veterinarias aceptables, con un sacárido, un iminociclitol, un probiótico o un agente antibacteriano, junto con excipientes o portadores veterinarios, para su uso en la prevención y/o el

tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana o de un desequilibrio en la microflora causado por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli.

5 [0033] Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un alimento, a un alimento para mascotas o a una composición de pienso que comprende una combinación de un compuesto de fórmula (I) o de sus sales apropiadas comestibles aceptables, con un sacárido, un iminocitol o un probiótico, para su uso en la prevención de una infección bacteriana como se ha definido anteriormente.

10 [0034] La invención también describe el compuesto de fórmula (I) o sus sales como se ha definido anteriormente, para su uso como un agente en la inhibición de la adherencia de una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli a las células epiteliales.

Descripción detallada de la invención

15 [0035] Como se ha mencionado anteriormente, un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o a sus sales farmacéuticamente, veterinarias o comestibles apropiadas aceptables.

20 [0036] Este aspecto de la invención también puede ser formulado como el uso de un compuesto de fórmula (I) o de sus sales como se ha definido anteriormente, para la preparación de una composición farmacéutica o veterinaria, para la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana o de un desequilibrio en la microflora causado por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli en un mamífero, incluyendo un ser humano.

25 [0037] Algunas sales no limitantes de la D-fagomina que pueden usarse en el ámbito de la presente invención son las sales de tartrato, de hemitartrato, de citrato, de hemicitrato, de clorhidrato, de malato o de acetato.

30 [0038] El término "cantidad terapéuticamente eficaz", según se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un compuesto que, cuando es administrada, es suficiente para impedir el desarrollo, o aliviar en cierto grado, uno o más de los síntomas del trastorno, la enfermedad, el desequilibrio en la microflora o la afección que se va a tratar. La dosis en particular del compuesto administrado de acuerdo con esta invención estará determinada por supuesto por las circunstancias particulares del caso, incluyendo el compuesto administrado, la vía de administración, la afección en particular que se va a tratar y consideraciones similares.

35 [0039] El término "sacárido" representa un análogo del receptor de sacáridos de las células epiteliales, por ejemplo, metil α manósido, globotetraosa, manosa, gal $\alpha(1\ 4)$ gal o metilo unido, sialil 3' lactosa, sialil-gal ($\beta\ 1\ 4$) GlcNAc, ($\alpha\ 1\ 6$) glucano oxidado.

40 [0040] El término "células epiteliales" representa en el presente documento cualquier célula epitelial que cubra la superficie externa del cuerpo, así como la mayoría de las cavidades corporales.

[0041] El término "probiótico" representa microorganismos vivos que, cuando son administrados en las cantidades adecuadas, confieren un beneficio saludable al hospedador y que no ven modificada su adhesión a la mucosa intestinal por la presencia de los iminocitolos.

45 [0042] El término "alimento funcional" representa en el presente documento cualquier alimento sano reivindicado por tener una propiedad promotora de la salud o de prevención de enfermedades más allá de la función básica de proporcionar nutrientes.

50 [0043] Una forma de realización en particular es el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una sal veterinaria del mismo o una sal comestible apropiada del mismo, para su uso en la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana o de un desequilibrio en la microflora causado por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli.

55 [0044] Preferiblemente, el compuesto de la invención se usa en la prevención de una infección bacteriana causada por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli.

60 [0045] En una forma de realización preferida, el compuesto de la invención se usa como coadyuvante en el tratamiento de una enfermedad causada por la infección bacteriana, que se elige de entre el grupo que consiste en la caries dental, una enfermedad periodontal, una enfermedad urinaria y una enfermedad intestinal.

65 [0046] En una forma de realización preferida, el compuesto de la invención es para su uso en la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana o de un desequilibrio en la microflora causado por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli.

mediante la inhibición de la adherencia de la bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli a las células epiteliales.

[0047] Por el término "adherencia bacteriana" se entiende el proceso mediante el cual las bacterias se unen a las células o a otras superficies antes de proliferar.

[0048] Como se ha mencionado anteriormente, también se divulga en la invención una composición farmacéutica o una composición veterinaria que comprende el compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente o veterinaria aceptable del mismo, junto con excipientes o portadores farmacéuticos o veterinarios.

[0049] En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica es un enjuague bucal, un gel, una loción de limpieza dental líquida, una pasta de dientes, una goma de mascar, un limpiador de dentadura o una crema de adherencia protésica. En una forma de realización más preferida, la composición farmacéutica es una goma de mascar.

[0050] Adicionalmente es posible el uso de los compuestos de la invención como parte de una composición nutricional alimentaria, comida para mascotas y pienso. Dicho alimento funcional tiene un efecto positivo sobre la salud de la persona o del animal al impedir la infección bacteriana y los desequilibrios en la microflora causados por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli. Algunas áreas relevantes del uso en el pienso como preventivo de enfermedades en la producción animal son, por ejemplo, la salmonelosis en la producción de pollos, la reducción de microbios perjudiciales en los cerdos para obtener un mejor crecimiento o la prevención de la acidosis en rumiantes.

[0051] Los compuestos de la invención también pueden usarse como un alimento o como un aditivo en la bebida para producir un alimento funcional o una bebida funcional. Por lo tanto, pueden ser añadidos a productos alimentarios líquidos o concentrados o en polvo, tales como leche y productos lácteos líquidos, diversas bebidas incluyendo zumos, refrescos, bebidas deportivas, bebidas alcohólicas, y similares. Es especialmente útil tener el compuesto de la invención como parte de un alimento para un niño, preferiblemente como parte de una fórmula infantil. También es relevante el interés del alimento funcional que incluye trigo sarraceno, destacando el contenido en D-fagomina, algunos ejemplos relevantes pueden ser la cerveza, la cerveza sin alcohol, una bebida de tipo té, una bebida láctea, pasta, bizcochos, galletas, barras de cereales, granos inflados, pan, tortitas, tartas, cremas, postres, cereales para el desayuno y otros que están enriquecidos o estandarizados en su contenido en D-fagomina básica. El yogur y sus derivados también son alimentos relevantes para ser usados junto con los probióticos seleccionados.

[0052] El alimento o el aditivo alimentario también puede ser producido de una forma natural, por ejemplo, teniendo un animal doméstico, tal como una vaca u otro animal, que produzca la D-fagomina en su leche. Esto puede llevarse a cabo alimentando el animal con *Fagopyrum esculentum*, *Morus alba* o D-fagomina purificada.

[0053] Finalmente, como se ha mencionado anteriormente, el compuesto de la invención puede usarse solo o junto con otros compuestos bioactivos adecuados tales como un sacárido, un iminociclitol, probióticos o un agente antibacteriano, en la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana causada por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli. En la invención también se divulgan composiciones farmacéuticas, composiciones alimenticias veterinarias, alimento para mascotas y productos de pienso que comprenden la combinación.

[0054] Las combinaciones de la invención pueden usarse en la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana causada por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli. Preferiblemente, las combinaciones se usan en la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana causada por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli mediante la inhibición de la adherencia de una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli a las células epiteliales. Preferiblemente, la combinación es para una administración secuencial, simultánea o por separado.

[0055] Algunos probióticos no limitantes que pueden usarse en el ámbito de la presente invención son: Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Lactobacillus siporogenes, Bifidobacteria bifidum, Bifidobacteria lonaum y Bifidobacteria infantis.

[0056] Los objetos, ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras el análisis de la descripción, o pueden ser aprendidos a través de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención. Adicionalmente, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de las formas de realización particulares y preferidas descritas en el presente documento.

Ejemplos

[0057] Los siguientes ejemplos se proporcionan como medio ilustrativo y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1: ensayo de aglutinación bacteriana

[0058] Las bacterias usadas en el ensayo fueron *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Streptococcus mutans*, procedentes de cultivos de una noche. Las bacterias se inocularon en el matraz de 100 ml con medio de Luria. Las bacterias se cultivaron durante 24 h a 37 °C. Después de la incubación, se inocularon placas con medio de Agar Luria. Después de 24 h se prepararon suspensiones de cada cepa en medio de PBS (10^8 UFC/ml).

[0059] Se realizaron diluciones sucesivas de los productos que se iban a ensayar, la D-fagomina y el tartrato de D-fagomina (a 20 ppm, 200 ppm, 2.000 ppm). Las diluciones se mezclaron con las suspensiones bacterianas en una proporción de 1:1. Después de 90 min a la temperatura ambiente, las suspensiones se observaron bajo el microscopio óptico. Se compararon con el cultivo de control, sin ningún producto añadido. Se encontró que los dos ensayos de productos a 20 ppm, a 200 ppm y a 2.000 ppm, aglutinaban las células de las tres cepas.

[0060] Cuando las bacterias se aglutinan, pierden su capacidad de adherirse a otras células o a un sustrato.

Ejemplo 2: ensayo de aglutinación bacteriana

[0061] Las bacterias usadas en el ensayo fueron *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium sp.*, procedentes de cultivos de una noche. Las bacterias se inocularon en el matraz de 100 ml con medio de Luria. Las bacterias se cultivaron durante 24 h a 37 °C. Después de la incubación, se inocularon placas con medio de Agar Luria. Después de 24 h se prepararon suspensiones de cada cepa en medio de PBS (10^8 UFC/ml). Se realizaron diluciones sucesivas de los productos que se iban a ensayar, el tartrato de D-fagomina (a 10 ppm, 20 ppm, 2.000 ppm). Las diluciones se mezclaron con las suspensiones bacterianas en una proporción de 1:1. Después de 90 min a la temperatura ambiente, las suspensiones se observaron bajo el microscopio óptico. Se compararon con el cultivo de control, sin ningún producto añadido. La *Escherichia coli* y la *Salmonella typhimurium* se compararon con un cultivo de control positivo (manosa 0,05 M).

[0062] Se encontró que el ensayo del producto, a 20 ppm y a 200 ppm, aglutinaba las células de las tres cepas, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, pero no a 10 ppm. Cuando la concentración de ensayo del producto es de 20 ppm, la aglutinación era de aproximadamente un 60 % la del correspondiente control positivo, y cuando la concentración es de 200 ppm, era de aproximadamente un 70 %. *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp* no fueron aglutinados por el tartrato de D-fagomina. Cuando las bacterias se aglutinan, pierden su capacidad de adherirse a otras células o a un sustrato.

Ejemplo 3: actividad antiadherente de la D-fagomina frente a *Streptococcus mutans*

[0063] Se llevó a cabo un ensayo de adherencia sobre una superficie de vidrio. La bacteria usada en el ensayo fue *Streptococcus mutans* procedente de cultivos de una noche ($1 \cdot 10^{10}$ UFC/ml). La bacteria se cultivó durante 18 h a 37 °C en medio de PBS. Las bacterias del cultivo de una noche (0,25 ml) se cultivaron durante 18 h a 4 °C en una placa de vidrio con el medio específico (0,5 ml). Después de las 18 h, se añadieron 0,25 ml de D-fagomina (a 10 ppm, 20 ppm y 40 ppm). En la placa de control se añadió únicamente PBS. Después de 90 min las células se transfirieron (0,5 ml) a un tubo de falcon, después se lavaron dos veces con PBS (0,5 ml cada vez). El lavado de cada bacteria se recogió en un tubo de falcon y se mantuvo a 4 °C. Las células (100 µl) se sembraron en las placas con medio de TSA. Las células adheridas se rasparon. En cada pocillo se añadieron 0,5 ml de PBS estéril. Las placas con 100 µl se inocularon. Se contaron las placas.

Resultados:

[0064]

Tabla 1. Resultados de los recuentos del vidrio y del sobrenadante.

<i>Streptococcus mutans</i>			
Concentración	Sobrenadante	vidrio	Total
10 ppm	$4,15 \cdot 10^4$	$1,39 \cdot 10^4$	$5,54 \cdot 10^4$
20 ppm	$4,12 \cdot 10^4$	$1,18 \cdot 10^4$	$5,30 \cdot 10^4$
40 ppm	$5,17 \cdot 10^4$	$2,56 \cdot 10^2$	$5,20 \cdot 10^4$
Control, medio	$3,45 \cdot 10^4$	$2,10 \cdot 10^4$	$5,55 \cdot 10^4$

Control, manosa 0,05 M	4,58 10 ⁴	8,70 10 ³	5,45 10 ⁴
------------------------	----------------------	----------------------	----------------------

Tabla 2. Resultados de los recuentos del vidrio y del sobrenadante.

<u>Streptococcus mutans</u>				
Concentración	G / S	PG / CG	G / MG	G / Total
10 ppm	3,36 10 ⁻¹	1,60	1,60	2,52 10 ⁻¹
20 ppm	2,86 10 ⁻¹	5,61 10 ⁻¹	1,35	2,22 10 ⁻¹
40 ppm	4,94 10 ⁻³	1,22 10 ⁻²	2,94 10 ⁻²	4,91 10 ⁻³
Control, medio	6,09 10 ⁻¹		2,41	3,78 10 ⁻¹
Control, manosa 0,05 M	1,90 10 ⁻¹	4,14 10 ⁻¹		1,60 10 ⁻¹
G: vidrio S: sobrenadante PG / CG: vidrio con producto / vidrio con control (sin producto); unidades formadoras de colonias en vidrio por la acción de la D-fagomina o de la manosa 0,05 M / unidades formadoras de colonias en vidrio sin producto G / MG: vidrio / vidrio con manosa; unidades formadoras de colonias en vidrio por la acción de la D-fagomina o medio / unidades formadoras de colonias en vidrio por la acción de la manosa 0,05 M G / total; unidades formadoras de colonias en vidrio / unidades formadoras de colonias totales inoculadas.				

[0065] Se encontró que la D-fagomina, a 10 ppm, a 20 ppm y a 40 ppm, tenía actividad antiadherente con respecto al control.

Ejemplo 4: adhesión de Salmonella y de Escherichia coli al mucus en presencia de D-fagomina

[0066] Mucus: células epiteliales de la mucosa

10 Adhesión al mucus. Protocolo

Día 1

[0067] Las bacterias se inocularon en un tubo con 3 ml con medio de Luria. Las bacterias se cultivaron durante 24 h a 37 °C. El tubo se incubó durante una noche (1 10⁸ - 1 10⁹ UFC/ml).

Preparación de la placa con mucus

[0068] Se descongeló el mucus (1 ml) a la temperatura ambiente. Se preparó medio de PBS (100 ml). El mucus descongelado se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 minutos. El mucus (1 ml) se transfirió a una alícuota con PBS estéril (99 ml) (1:100). Cada pocillo se inocula con 2,5 ml de la mezcla y la placa se mantiene en la nevera (4 °C) durante una noche.

Día 2

25

Lavado de la placa con mucus

[0069] La placa se sacó de la nevera. Se extrajeron 2 ml de cada pocillo. Se añadió PBS (1 ml), después se extrajo, al final había 0,5 ml en el pocillo.

30

Ensayo

[0070] Los tubos que se cultivaron durante una noche se diluyeron (1 10⁷ UFC/ml).

[0071] El volumen final en cada pocillo era de: 0,5 ml de PBS más 0,5 ml de la suspensión bacteriana más 0,5 ml de D-fagomina (o de PBS en el caso del control).

[0072] Se prepararon dos placas (cepas por duplicado). Concentración de producto en los pocillos (10 ppm, 20 ppm, 40 ppm). Concentración de manosa 0,05 M (pocillo de control).

40

[0073] Los pocillos se inocularon y las placas se incubaron a 37 °C durante 90 minutos.

[0074] Después de los 90 minutos, se observó el sobrenadante de cada pocillo (10 µl) bajo un microscopio óptico.

[0075] Se añadió 1 ml de cada pocillo a eppendorfs. Los eppendorfs se mantuvieron en la nevera. Se elaboraron dos lavados con PBS. Los pocillos lavados de la misma cepa se recogieron en un tubo de falcon y se mantuvieron a 4 °C. Se añadió PBS (1 ml) a cada pocillo y las placas se inocularon con 100 µl de cada tubo a las diluciones

adecuadas.

Día 3

5 **[0076]** Se realizó el recuento de las placas

Tabla 3. Recuento del sobrenadante con D-fagomina a 10 ppm, a 20 ppm, a 40 ppm

	Sobrenadante (UFC/ml)	UFC en el mucus / ml	Sobrenadante / mucus UFC/ml	UFC/ml totales	Bacterias en el sobrenadante (%)
10 ppm					
<u>Salmonella mutans 1</u>	$3,35 \cdot 10^8$	$3,00 \cdot 10^7$	$1,12 \cdot 10^1$	$3,65 \cdot 10^8$	91,8
<u>Salmonella mutans 2</u>	$1,64 \cdot 10^8$	$4,50 \cdot 10^7$	3,63	$2,90 \cdot 10^8$	78,4
<u>Escherichia coli 1</u>	$9,88 \cdot 10^7$	$2,50 \cdot 10^7$	3,95	$1,24 \cdot 10^8$	94,5
<u>Escherichia coli 2</u>	$1,75 \cdot 10^8$	$9,00 \cdot 10^6$	$1,95 \cdot 10^1$	$1,84 \cdot 10^8$	95,1
20 ppm					
<u>Salmonella mutans 1</u>	$1,10 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^6$	$5,51 \cdot 10^1$	$1,12 \cdot 10^8$	98,2
<u>Salmonella mutans 2</u>	$2,84 \cdot 10^8$	$1,34 \cdot 10^7$	$2,11 \cdot 10^1$	$2,97 \cdot 10^8$	95,5
<u>Escherichia coli 1</u>	$1,05 \cdot 10^8$	$4,00 \cdot 10^6$	$2,63 \cdot 10^1$	$1,09 \cdot 10^8$	96,3
<u>Escherichia coli 2</u>	$1,00 \cdot 10^8$	$9,95 \cdot 10^5$	$1,01 \cdot 10^2$	$1,01 \cdot 10^8$	99,0
40 ppm					
<u>Salmonella mutans 1</u>	$3,80 \cdot 10^8$	$7,00 \cdot 10^6$	$5,43 \cdot 10^1$	$3,87 \cdot 10^8$	98,2
<u>Salmonella mutans 2</u>	$7,35 \cdot 10^7$	$1,39 \cdot 10^7$	5,27	$8,74 \cdot 10^7$	84,1
<u>Escherichia coli 1</u>	$1,20 \cdot 10^8$	$1,00 \cdot 10^6$	$1,20 \cdot 10^2$	$1,21 \cdot 10^8$	99,2
<u>Escherichia coli 2</u>	$7,00 \cdot 10^7$	$9,95 \cdot 10^5$	$7,04 \cdot 10^1$	$7,10 \cdot 10^7$	98,6

Tabla 4. Recuento del sobrenadante con manosa

	Sobrenadante (UFC/ml)	UFC en el mucus / ml	Sobrenadante / mucus UFC/ml	UFC/ml totales	Bacterias en el sobrenadante (%)
Manosa al 0,05 %					
<u>Salmonella mutans 1</u>	$3,95 \cdot 10^8$	$1,00 \cdot 10^6$	$3,59 \cdot 10^2$	$3,96 \cdot 10^8$	99,7
<u>Salmonella mutans 2</u>	$3,74 \cdot 10^8$	$1,50 \cdot 10^7$	$2,49 \cdot 10^1$	$3,89 \cdot 10^8$	96,1
<u>Escherichia coli 1</u>	$2,98 \cdot 10^8$	$2,50 \cdot 10^6$	$1,19 \cdot 10^2$	$3,01 \cdot 10^8$	99,2
<u>Escherichia coli 2</u>	$2,96 \cdot 10^8$	$2,45 \cdot 10^6$	$1,21 \cdot 10^2$	$2,98 \cdot 10^8$	99,2

10

Tabla 5. Recuento del sobrenadante con medio de cultivo

	Sobrenadante (UFC/ml)	UFC en el mucus / ml	Sobrenadante / mucus UFC/ml	UFC/ml totales	Bacterias en el sobrenadante (%)
Medio de cultivo					
<u>Salmonella mutants 1</u>	$1,20 \cdot 10^6$	$3,96 \cdot 10^6$	$3,03 \cdot 10^{-3}$	$3,97 \cdot 10^8$	0,30
<u>Salmonella mutants 2</u>	$1,40 \cdot 10^6$	$3,85 \cdot 10^7$	$3,64 \cdot 10^{-3}$	$3,99 \cdot 10^8$	0,35
<u>Escherichia coli 1</u>	$1,50 \cdot 10^8$	$3,90 \cdot 10^6$	$3,85 \cdot 10^{-3}$	$3,91 \cdot 10^8$	0,38
<u>Escherichia coli 2</u>	$1,45 \cdot 10^6$	$3,97 \cdot 10^6$	$3,66 \cdot 10^{-3}$	$3,98 \cdot 10^8$	0,36

[0077] Los microorganismos están significativamente en el sobrenadante, no en el mucus. En presencia de la D-fagomina, los microorganismos se aglutinan entre sí y no se aglutinan con el mucus, independientemente de la concentración de la D-fagomina.

Ejemplo 5: adhesión de Lactobacillus y de Bifidobacterium al mucus en presencia de D-fagomina

Adhesión al mucus.

20

Protocolo

Día 1

[0078] Las bacterias se inocularon en el tubo con 3 ml con medio de Luria. Las bacterias se cultivaron durante 24 h a 37 °C. El tubo se incubó durante una noche (10^7 - 10^8 UFC/ml).

Preparación de la placa con mucus

[0079] Se descongeló el mucus (1 ml) a la temperatura ambiente. Se preparó medio de PBS (100 ml). El mucus descongelado (1 ml) se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 minutos. El mucus (1 ml) se transfirió a una alícuota con PBS estéril (99 ml). Cada pocillo se inocula con 2,5 ml de la mezcla y la placa se mantiene en la nevera (4 °C) durante una noche

Día 2

Lavado de la placa con mucus

[0080] La placa se sacó de la nevera y se llevó a cabo el lavado. Se extrajeron 2 ml de cada pocillo. Se añadió PBS (1 ml), después se extrajo, al final había 0,5 ml en el pocillo.

Ensayo

[0081] Los tubos que se cultivaron durante una noche, se diluyeron (10^7 UFC/ml).

[0082] El volumen final en cada pocillo era de: 0,5 ml de PBS más 0,5 ml de la suspensión bacteriana más 0,5 ml de D-fagomina (o de PBS en el caso del control). Se prepararon dos placas (cepas por duplicado). Concentración de producto en los pocillos (10 ppm, 20 ppm, 40 ppm). Concentración de manosa 0,05 M (pocillo de control). Los pocillos se inocularon y las placas se incubaron a 37 °C durante 90 minutos. Después de los 90 minutos, se observó el sobrenadante de cada pocillo (10 µl) bajo un microscopio óptico. Se añadió 1 ml de cada pocillo a eppendorfs. Los eppendorfs se mantuvieron en la nevera. Se elaboraron dos lavados con PBS. Los pocillos lavados de la misma cepa se recogieron en un tubo de falcon y se mantuvieron a 4 °C. Se añadió PBS (1 ml) a cada pocillo y las placas se inocularon con 100 µl de cada tubo a las diluciones adecuadas.

Día 3

Se realizó el recuento de las placas

Resultados

[0083]

Tabla 6. Recuento del sobrenadante con D-fagomina a 10 ppm, a 20 ppm, a 40 ppm, medio de cultivo y manosa.

<u>Lactobacillus acidophilus</u>			
Concentración	Sobrenadante	Mucus	Total
10 ppm	$2,68 \cdot 10^6$	$2,23 \cdot 10^6$	$4,91 \cdot 10^6$
20 ppm	$2,87 \cdot 10^6$	$2,23 \cdot 10^6$	$5,10 \cdot 10^6$
40 ppm	$3,35 \cdot 10^6$	$1,58 \cdot 10^6$	$4,93 \cdot 10^6$
Medio de cultivo (control)	$4,50 \cdot 10^6$	$4,00 \cdot 10^5$	$4,90 \cdot 10^6$
Manosa 0,05 M (control)	$3,30 \cdot 10^6$	$1,70 \cdot 10^6$	$5,00 \cdot 10^6$

Tabla 7. Recuento del sobrenadante con D-fagomina a 10 ppm, a 20 ppm, a 40 ppm, medio de cultivo y manosa.

<u>Bifidobacterium</u>			
Concentración	Sobrenadante	Mucus	Total
10 ppm	$1,20 \cdot 10^7$	$6,86 \cdot 10^4$	$1,21 \cdot 10^7$
20 ppm	$1,20 \cdot 10^7$	$7,99 \cdot 10^4$	$1,21 \cdot 10^7$
40 ppm	$1,20 \cdot 10^7$	$2,45 \cdot 10^5$	$1,22 \cdot 10^7$
Medio de cultivo (control)	$1,20 \cdot 10^7$	$7,00 \cdot 10^4$	$1,21 \cdot 10^7$
Manosa 0,05 M (control)	$1,07 \cdot 10^7$	$3,05 \cdot 10^5$	$1,10 \cdot 10^7$

Tabla 8. Recuento del sobrenadante con D-fagomina a 10 ppm, a 20 ppm, a 40 ppm, medio de cultivo y manosa.

<u>Lactobacillus acidophilus</u>				
	M / S	Producto M / Control M	M / Manosa M	M / Total
10 ppm	$8,33 \cdot 10^{-1}$	5,58	1,31	$4,55 \cdot 10^{-1}$
20 ppm	$7,78 \cdot 10^{-1}$	5,58	1,31	$4,38 \cdot 10^{-1}$
40 ppm	$4,70 \cdot 10^{-1}$	3,94	$9,27 \cdot 10^{-1}$	$3,20 \cdot 10^{-1}$
Medio de cultivo (control)	$8,89 \cdot 10^{-2}$		$2,35 \cdot 10^{-1}$	$8,16 \cdot 10^{-2}$
<u>Lactobacillus acidophilus</u>				
Manosa 0,05 M (control)	$5,15 \cdot 10^{-1}$	4,25	1,31	$3,40 \cdot 10^{-1}$
M: Mucus, S: sobrenadante, Producto, D fagomina o Manosa				

Tabla 9. Recuento del sobrenadante con D-fagomina a 10 ppm, a 20 ppm, a 40 ppm, medio de cultivo y manosa.

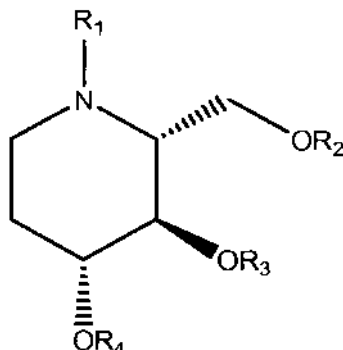
<u>Bifidobacterium</u>				
	M / S	Producto M / Control M	M / Manosa M	M / Total
10 ppm	$5,71 \cdot 10^{-3}$	$9,80 \cdot 10^{-1}$	$2,25 \cdot 10^{-1}$	$5,68 \cdot 10^{-3}$
20 ppm	$6,67 \cdot 10^{-3}$	1,14	$2,62 \cdot 10^{-1}$	$2,00 \cdot 10^{-2}$
40 ppm	$2,04 \cdot 10^{-2}$	3,50	$8,05 \cdot 10^{-1}$	$6,62 \cdot 10^{-3}$
Medio de cultivo (control)	$5,83 \cdot 10^{-3}$		$2,30 \cdot 10^{-1}$	$5,80 \cdot 10^{-3}$
Manosa 0,05 M (control)	$2,85 \cdot 10^{-2}$	4,35		$1,86 \cdot 10^{-2}$
M: Mucus, S: sobrenadante				

5 **[0084]** La D-fagomina no interfiere negativamente en la adherencia del Lactobacillus al mucus. En vista de los resultados del medio de cultivo, la D-fagomina beneficia la adherencia de Lactobacillus al mucus.

[0085] La D-fagomina no interfiere negativamente en la adherencia del Bifidobacterium al mucus.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una sal veterinaria del mismo o una sal comestible apropiada del mismo,



(I)

- 5 donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son H para su uso en la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana o de un desequilibrio en la microflora causado por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en Streptococcus mutans, Salmonella typhimurium y Escherichia coli.
- 10 2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto se usa en la prevención de la infección bacteriana.
3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde la infección bacteriana causa una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad dental, una enfermedad periodontal, una
- 15 enfermedad urinaria y una enfermedad intestinal.
4. Combinación de un compuesto de fórmula (I) o de una sal apropiada farmacéuticamente, veterinaria o comestible aceptable del mismo, donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son H, con un sacárido, un iminociclitol, probióticos o un agente antibacteriano, para su uso según se ha definido en la reivindicación 1.
- 20 5. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde la combinación es para una administración secuencial, simultánea o por separado.
6. Composición farmacéutica o veterinaria que comprende una combinación de un compuesto de fórmula (I) o de
- 25 una sal farmacéuticamente apropiada o veterinaria aceptable del mismo, donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son H, con un sacárido, un iminociclitol, probióticos o un agente antibacteriano, junto con excipientes o portadores farmacéuticos o veterinarios, para su uso según se ha definido en la reivindicación 1.
7. Alimento, alimento para mascotas o composición de pienso que comprende una combinación de un compuesto de
- 30 fórmula (I) o de una sal comestible aceptable del mismo, donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son H, con un sacárido un iminociclitol o probióticos, para su uso según se ha definido en la reivindicación 2.