

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 736**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2003 E 09157883 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2272522**

54 Título: **Composiciones terapéuticas para usar en la profilaxis o el tratamiento de las diarreas**

30 Prioridad:

28.06.2002 FI 20021275
14.04.2003 FI 20030564

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

15.01.2018

73 Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

ANGSTRÖM, JONAS;
TENEBERG, SUSANN;
SAARINEN, JUHANI;
SATOMAA, TERO;
ROCHE, NIAMH;
NATUNEN, JARI;
MILLER-PODRAZA, HALINA;
KARLSSON, KARL-ANDERS y
ABUL-MILH, MAAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 649 736 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

Composiciones terapéuticas para usar en la profilaxis o el tratamiento de las diarreas

5 ÁMBITO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se refiere a los campos de la bioquímica de carbohidratos y de la microbiología clínica. La presente invención ofrece una composición terapéutica en la cual se incluyen fracciones purificadas de compuestos que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos para usarla como medicamento.

10 La presente invención describe especialmente una sustancia o receptor que contiene oligosacáridos y se une a los agentes patógenos causantes de la diarrea humana. La presente invención está basada en amplios estudios sobre múltiples y diferentes bacterias patógenas que tienen diversos mecanismos patológicos de adhesión. Los presentes inventores encontraron múltiples receptores comunes que se pueden regular específicamente, disminuyendo así las posibilidades de una terapia efectiva mediante secuencia(s) receptora(s) única(s). Se halló que las composiciones terapéuticas especiales que contienen al menos dos secuencias oligosacáridas distintas eran particularmente útiles.

15 La presente invención se refiere especialmente a la *Escherichia coli* diarreica y a su empleo, p.ej. en composiciones farmacéuticas y nutricionales para la profilaxis y el tratamiento de los problemas debidos a la presencia de agentes patógenos causantes de diarrea humana, en particular de *Escherichia coli* diarreica. La presente invención también se refiere al uso de los receptores para diagnosticar la diarrea humana causada por agentes patógenos, en especial por la *Escherichia coli* diarreica.

25 ANTECEDENTES LA PRESENTE INVENCION

El o los mecanismos por los cuales las bacterias se adhieren a las superficies celulares epiteliales son de primordial interés respecto a la colonización e infección bacteriana. El estado técnico previo que describe las uniones de varias bacterias no refiere el uso de combinaciones de receptores según la presente invención contra las infecciones, sobre todo contra las infecciones intestinales. La presente invención también es útil para las infecciones gastrointestinales.

30 Unión de EPEC mediante carbohidratos

Se han usado mutantes de células CHO para estudiar el efecto de la glicosilación en la unión de la EPEC. Dado que un mutante carente de ácido siálico y Gal tenía menor actividad fijadora que un mutante carente de ácido siálico, los autores sugirieron que la secuencia de la unión podría ser Gal β 3GlcNAc o Gal β 4GlcNAc y ácido siálico. La idea del empleo de Gal β 3GlcNAc o Gal β 4GlcNAc también fue patentada. Se sugirió que el ácido siálico puede ser necesario para la separación celular mediada por EPEC (Vanmale, R.P. y otros, 1995), pero la glicosilación de la superficie celular incluye varias clases de glicoproteínas y glicolípidos, y las vías de biosíntesis para las glicosilaciones son tan complicadas que las mutaciones tienen múltiples efectos biosintéticos en las glicosilaciones, los cuales aún no han sido caracterizados correctamente. La presente invención demuestra que no todas las secuencias de oligosacárido ácido siálico tienen una actividad efectiva y análogamente que los disacáridos solos no tienen una actividad efectiva en todas las estructuras. La presente invención se refiere al uso de estructuras efectivas más específicas que no se podía determinar sobre la base de los datos anteriores. En otro estudio, el mismo científico inhibió la unión de una cepa de EPEC a células Hep-2 mediante las neoglicoproteínas N-acetil lactosamina-ASB y Lex-ASB en el intervalo de concentración de 0,4-0,8 mg/ml (Vanmaele, R.P. y otros, 1995). Conforme a la presente invención las secuencias de disacáridos o de Lex no son suficientes para unirse fuertemente a la EPEC, de acuerdo con la presente invención se prefieren secuencias de oligosacáridos más extensas o más específicas. La presente invención también describe el uso simultáneo de composiciones de dos o varias secuencias de oligosacáridos para la terapia de todos los tipos de diarrea debidos a infecciones causadas por de diversos agentes patógenos, incluso cuando el agente patógeno es indeterminado. La presente invención se refiere concretamente a unos conjugados polivalentes terapéuticamente útiles que son efectivos a bajas concentraciones pero no comprende estructuras proteicas no naturales, pues éstas son antígenos o alérgenos potentes.

La patente WO96/39190 indica las especificidades de unión de la toxina termolábil de ETEC E. coli. Se cita lactosa, Gal β 3GalNAc, GalNAc β 4Gal y NeuNAc α 3Gal unidas a un soporte sólido inerte. Los resultados con soporte sólido y epítomos de receptor parcialmente débiles no son relevantes para la presente invención. Aquí los dos primeros epítomos de disacáridos resultaron ser inactivos como inhibidores monovalentes. La solicitud de patente no describe los epítomos más largos y efectivos, ni los conjugados polivalentes según la presente invención.

60 Se ha usado una pequeña variedad de glicolípidos comerciales para analizar la especificidad de una cepa de EPEC.

En orden decreciente de actividad se observó unión de asialo-GM1, asialo-GM2, globósido y lacto-N-tetraosa, pero en cambio los gangliósidos, la lactosilceramida, la globotriaosilceramida (Gal α 4Gal β 4Glc β Cer) y el glicolípido de Forssmann dieron resultado negativo. La unión del asialo-GM1 se estudió con varias cepas. Se consideró que el epítomo de unión activo era GalNAc β 4Gal o GalNAc β 3Gal, este último con menor actividad. Los autores describen también la unión a las neoglicoproteínas con asialo-GM1 y GalNAc, pero no la inhibición de la unión al asialo-GM1

- por neoglicoproteínas a una concentración 25 micromolar o a oligosacáridos indefinidos a una concentración 1 mM (Jagannatha, H.M. y otros, 1991). Los autores no observaron las diversas especificidades de unión que son obvias a partir de la presente invención, en la cual se ensayaron varias cepas. Estas especificidades incluyen la unión de lactosilceramida, la unión de Gala4Gal (globotriosa y antígeno de Forssman negativo) o las uniones de las bacterias dependientes de ácido siálico. Sus resultados indicaron concretamente que las uniones contradictorias ahí descritas no eran inhibibles por secuencias oligosacáridas monovalentes o polivalentes, y por tanto este estudio no mostró los tipos de unión terapéuticamente útiles que revela la presente invención. La falta de verificación de todas las uniones y de la inhibición puede estar relacionada con fallos técnicos en el proceso.
- Se analizaron diversas fracciones oligosacáridas de la leche humana para ver si inhibían las cepas de EPEC a una concentración de 3 mg/ml. Se observó actividad inhibitoria en la fracción pentasacárida, posiblemente en la fracción de difucosil-lactosa, en las fracciones de lacto- y neolactotetraosa, en la fracción heptasacárida y en la fracción hexasacárida. Las fracciones se designaron según los componentes principales esperados. Las composiciones de las fracciones se determinaron mediante el análisis de los monosacáridos, que no revela las estructuras exactas de los componentes. No se evaluaron las composiciones reales de las fracciones ni la presencia de posibles sacáridos minoritarios o de otros tipos de sacáridos (Cravioto, A. y otros, 1991). Como el compuesto o los compuestos activos no fueron identificados, los datos no habrían conducido a la presente invención.
- Se ha demostrado que la lactoferrina de la leche humana, la IgA secretora y el componente secretor libre inhiben la unión de la EPEC a glicoproteínas de las células HELA, sin indicar las estructuras de los carbohidratos (Nascimento de Araujo y Giugliano 2001).
- La inhibición de la unión de la toxina EHEC a Gal α 4Gal β 4Glc y los datos sobre la unión de otras toxinas de *E.coli* a Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer no han demostrado la curación de los trastornos. Hay sugerencias sobre el empleo de conjugados de fase sólida que contienen Gal α 4Gal β 4Glc para inhibir toxinas en las terapias antidiarreicas. Los ensayos clínicos con utilización de epítomos simples fracasaron. Los conjugados polivalentes conforme a la presente invención se refieren específicamente a unos conjugados polivalentes solubles para la inhibición efectiva de agentes patógenos, en particular de las bacterias *E. coli* causantes de diarrea. Como forma de ejecución concreta la presente invención se refiere a la prevención de *E. coli* no secretora de toxinas. No se indican los oligosacáridos bloqueantes de toxinas para los tipos de *E. coli*.
- Se demostró que los factores de colonización purificados de ciertas cepas de ETEC se unían a asialo-GM1 (Gal β 3GalNAc β 4Lac-Cer), pero no a gangliósidos de control sialilados (Oroe, y otros, 1990). Se demostró que un factor de colonización se unía a varias galactoglicoproteínas en el intestino del conejo. Esta unión pudo ser inhibida por asialo-GM1, GM1, GM2, pero no tan efectivamente por GM3 ni por la unión mediante adhesinas a GalNAc β 4Gal-neoglicoproteína. La glicoproteína de meconio humano y sus formas asialo y afuco inhibieron la unión de modo más débil y la glicoforina bovina con la máxima debilidad. Al igual que la unión de la lectina de *Maackia amuriensis*, la unión de la glicoproteína de meconio también dependía probablemente de polilactosamina. Se consideró que los restos de ácido siálico no eran relevantes para las uniones (Neeser, J.R. y otros, 1989; Wennerås, C. y otros, 1995). Sin embargo este estudio no indica ninguna solución multiepitópica definida que tenga utilidad para el tratamiento de diarreas u otras infecciones. No se definió la especificidad para la polilactosamina, si es que había presencia de ella.
- La presente invención demuestra que no todas las secuencias del tipo de las polilactosaminas - como la estructura ramificada - son activas. No se define el uso de combinaciones de especificidades.
- Los gangliósidos de la leche humana GM1 y GM3, y más débilmente el GD3, inhibían la unión de una cepa ETEC y de una cepa EPEC a las células cancerosas humanas Caco-2, mientras que la lactosilceramida, la GD3-lactona y el ácido N-acetilneuramínico dieron resultado negativo. La presente invención demuestra una unión de lactosilceramida y uniones dependientes de ácido siálico. Este estado técnico anterior indica una potencial especificidad única, no bien caracterizada, que, si existe, probablemente ni siquiera está entre las especificidades de unión reveladas en la presente invención.
- La unión de EPEC a las células HeLa fue inhibida por N-acetilgalactosamina 100 mM y una proteína de membrana bacteriana fue purificada por cromatografía de afinidad empleando GalNAc (Scatelsky, y otros, 1988). Sin embargo la revelación de uniones débiles a un monosacárido no permite sacar conclusiones sobre la importancia biológica de dicha unión.
- Las EPEC se pueden unir a secuencias Man, alfa-metil-Man y a secuencias de N-glicanos que contienen Man. Los compuestos más activos contenían la estructura de Man α 1-3Man (Neeser, J.R. y otros, 1986). Un estudio anterior identificó Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc, Man α 1-paranitrofenil y Man α 1-3(Man α 1-6)Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-OMe como buenos ligantes para el tipo 1 de *E. coli* 346 en las vellosidades intestinales (Firon y otros, 1982). Sin embargo las publicaciones no determinan el uso del epítipo junto con otras moléculas de unión específicas.
- La hemoaglutinación de eritrocitos por una cepa de ETEC fue inhibida por mucina de tipo II (Sigma), por medio de una preparación de glicoproteínas de glóbulos rojos, por gangliósidos de tipo II y por ácido siálico (1 mg/ml). La hemoaglutinación se pudo evitar con proteasa, sialidasa, peryodato, urea y cloruro de guanidio. En este estudio no

se describe la naturaleza del ácido siálico potencialmente implicado en la unión bajo las condiciones experimentales (Barthus y otros, 1985).

5 Se purificó CFA/I y se vio que era una proteína polimérica con un Mw aproximado de 23.800. La proteína purificada tenía acción hemoaglutinante al agregarle ácido. Solo el ácido N-acetilneuramínico pudo inhibir la hemoaglutinación. Se sugirió que el efecto del NeuNAc no era específico (Evans y otros, 1979). Para ETEC se han descrito receptores de glicoproteínas potencialmente sialilados, sensibles a sialidasa (Pieroni, P. y Worobec, E.A. 1988, Wennerås y otros, 1990).

10 Se ha referido que la unión de la *E. coli* enteroagregativa (EAEC) a las células HeLa no puede ser inhibida por unas fracciones proteicas de la leche humana, que no fueron caracterizadas (Nascimento de Araújo, y Giugliano 2000). La especificidad de la unión hacia los carbohidratos incluidos, de haberlos, no ha sido descrita.

15 En la patente US20030405503 se ha propuesto el oligosacárido monovalente Gal α 4Gal β 4Glc para inhibir la toxina shiga y toxinas análogas, pero el inhibidor no parece ser útil en forma monovalente. Se lograron menores efectos al inhibir las toxinas con inhibidor monovalente al 5% de concentración, que corresponde a 100 mM de oligosacárido aproximadamente. Una concentración tan alta puede tener efectos deshidratantes u otras secuelas inesperadas. La presente invención se refiere además a la inhibición de *E. coli* no toxígena causante de diarrea con Gal α 4Gal β 4Glc monovalente, cuyo efecto se ve a una concentración útil de 0,3 mM e inhibición a bajas concentraciones de los oligosacáridos globo-receptores.

20 En dos solicitudes de patente se describe el empleo de lacto-N-neotetraosa para la estimulación de Bifidobacterium [US5906982] y la inhibición de *E. coli* y algunas otras bacterias [US6083934]. La inhibición no es contra la unión de la *E. coli*, pero tiene lugar durante el cultivo de las bacterias. La presente invención no demuestra la utilidad de la sustancia en combinación con otros sacáridos. Estas solicitudes de patente no demuestran la inhibición de especies o tipos de *E. coli* diarreaica según la presente invención. También se ha reivindicado la lacto-N-tetraosa para mejorar la cualidad de las heces infantiles en una solicitud de patente de Lundblad y Biocarb, pero dicha invención no iba dirigida al tratamiento de la diarrea, en concreto de las diarreas causadas por *E. coli* según la presente invención.

30 *E. coli* uropatógena

Se han llevado a cabo muchos estudios que describen la unión de la *E. coli* uropatógena. Esta bacteria se une, por ejemplo, a secuencias de Gal α 1-4Gal. La patente PCT/SE81/00065 describe la actividad de unión de la *E. coli* que causa enfermedades del tracto urinario, pero no intestinales. Los datos no indican la unión a Gala4Gal de una *E. coli* diarreaica. Las bacterias uropatógenas son diferentes de los agentes patógenos, tales como EHEC, ETEC, EPEC, EAEC o EIEC, causantes de la diarrea intestinal. Las uniones y los mecanismos de infección de las bacterias varían entre las cepas y tipos de bacterias, y los resultados de una indicación no pueden generalizarse a otras indicaciones.

40 Las especificidades de unión de las bacterias que infectan diferentes órganos se adaptan a los receptores tisulares específicos que hay en ciertos tejidos. En humanos y animales las glicosilaciones son en general específicas de los tejidos y de las especies. Una posible situación en la que pueda surgir una reactividad cruzada entre especies debe abordarse identificando las estructuras exactas de los receptores en los tejidos diana y las especificidades de las bacterias que intervienen en las reacciones cruzadas.

45 De manera general, en el estado técnico anterior no se describen combinaciones útiles de actividades de receptores especificadas para el tratamiento efectivo de infecciones, especialmente de tipo intestinal. El estado técnico anterior se concentra en especificidades simples que no suelen darse simultáneamente en una sola cepa bacteriana. Debido a las variaciones en cada cepa bacteriana las especificidades de unión pueden diferir entre los ensayos. Además el estado técnico anterior no indica terapias útiles mediante el empleo de secuencias oligosacáridas monovalentes o de secuencias polivalentes, tal como se describe en la presente invención.

50 El estado técnico anterior no sugiere un uso terapéutico simultáneo de varios inhibidores de la unión de agentes patógenos mediada por carbohidratos. Las combinaciones terapéuticamente útiles de la unión de agentes patógenos mediada por carbohidratos se podría tener en cuenta

- 55
- 1) si una determinada cepa de una bacteria patógena (o de una célula patógena) tiene varias especificidades de unión; y
 - 2) si estas especificidades de unión están presentes simultáneamente en el agente patógeno; y
 - 3) si las correspondientes secuencias oligosacáridas receptoras están presentes en un tejido diana relevante; y
 - 60 4) si las secuencias oligosacáridas receptoras de importancia están disponibles para las especificidades de unión del agente patógeno.

65 Al considerar la utilidad de combinaciones terapéuticas de receptores deben determinarse los efectos de los posibles oligosacáridos inhibidores, solos y combinados. La presente invención indica sustancias y composiciones útiles para la inhibición de los agentes patógenos. El estado técnico anterior trata de uniones potenciales y no permite ninguna determinación de los inhibidores efectivos de la unión de patógenos, tal como se indica en la presente invención.

Identificación del oligosacárido receptor relevante en el tracto gastrointestinal humano

La presente invención describe la presencia de secuencias de oligosacáridos unidas a glicoproteínas, que pueden servir como receptores primarios o de primer contacto en el epitelio gastrointestinal humano. Se presentan varias secuencias de nuevos receptores. Una combinación de datos de unión de agentes patógenos con nueva información sobre los receptores de primer contacto más importantes nos permitió determinar los inhibidores útiles para la unión de los agentes patógenos. El análisis de receptores según la presente invención reveló la presencia de varios tipos de receptores nuevos en los epitelios gastrointestinales, los cuales, como receptores de primer contacto, están más disponibles para un contacto primario con los agentes patógenos.

Especies zoonóticas de *Helicobacter*

Hay más de 20 especies de *Helicobacter* identificadas hasta la fecha (On, 2001). Las especies han sido aisladas de diferentes huéspedes, incluyendo primates, cerdos, felinos, caninos, aves de corral y roedores (On, 2001). En sus huéspedes las *Helicobacter* spp. se han identificado tanto en el nicho gástrico como en el enterohepático del tracto gastrointestinal, en los cuales han sido relacionadas con un amplio espectro de resultados clínicos (Fox y otros, 2000; Nilsson y otros, 2001).

Carbohidratos que se unen al agente patógeno gástrico humano *H. pylori*

El *Helicobacter pylori* es la especie más ampliamente estudiada del género y está asociada con la patología gástrica (Hunt 1996). Esta bacteria tiene en particular la notable capacidad de unirse tanto a Lewis^b (Le^b) (Borén y otros, 1993) como a antígenos sialil-diméricos-Le^x que pueden ser enormemente relevantes para el mantenimiento de una infección crónica (Gerhard y otros, 2001; Madhavi y otros, 2002). Se ha referido que glicoconjugados basados tanto en lípidos como en proteínas - tales como p.ej. glicoconjugados sialilados (Evans y otros, 1988), sulfatida y GM3 (Saitoh y otros, 1991), poliglicosilceramidas (Miller-Podraza y otros, 1996; 1997a), lactosilceramida (Ångström y otros, 1998) y gangliotetraosilceramida (Lingwood y otros, 1992; Ångström y otros, 1998) - sirven como receptores para la unión de este microorganismo. Otros receptores potenciales del *Helicobacter pylori* incluyen el polisacárido heparán sulfato (Ascensio y otros, 1993), así como el fosfolípido fosfatidiletanolamina (Lingwood y otros, 1992). Recientemente se ha descrito la unión a lactotetraosilceramida (Teneberg y otros, 2002) y a lactosaminas tipo 2 (PCT/FI02/00043).

Las patentes US de Zopf y otros: 5.883.079 (marzo de 1999), 5.753.630 (mayo de 1998) y 5.514.660 (mayo de 1996) describen compuestos que contienen Neu5Acα3Gal como inhibidores de la adhesión de *H. pylori*. La molécula de sialil-lactosa inhibe la unión de *Helicobacter pylori* a líneas celulares gastrointestinales humanas (Simon y otros, 1997) y también es efectiva en el modelo animal de infección del mono rhesus (Mysore y otros, 1999). El compuesto se halla en ensayos clínicos. La patente US 5.446.681 de Krivan y otros (noviembre de 1995) describe conjugados antibióticos de receptores bacterianos que comprenden un gangliósido asialo acoplado a un antibiótico de penicilina.

Se reivindica especialmente el tratamiento de *Helicobacter pylori* con el conjugado de amoxicilina-asialo-GM1. Las secuencias de oligosacáridos/glicolípidos descritas en la invención no pertenecen a las ganglioseries de glicolípidos. Las patentes US de Krivan y otros: 5,386,027 (enero de 1995) y 5,217,715 (junio de 1993) describen el uso de secuencias de oligosacáridos o de glicolípidos para inhibir varias bacterias patógenas, pero sin indicar las especies de *Helicobacter* reveladas.

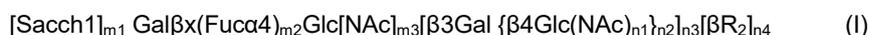
Las referencias anteriores enumeran receptores de carbohidrato del *H. pylori*, que no es el objetivo de la presente invención. La invención se refiere además al tratamiento de la diarrea.

Se ha señalado anteriormente que tanto el *H. pylori* como el *H. mustelae* se unen a la gangliotetraosilceramida, lo cual se confirmó en este estudio (Milh y otros). Estas especies no se encuentran entre las especies de *zHelicobacter* reveladas, pero se ensayaron como especies de control.

La patente WO 00/51644 describe composiciones con el empleo de secuencias oligosacáridas útiles para tratar la diarrea, incluyendo estados semejantes iniciados o mediados por la *E. coli* enteropatógena (EPEC).

RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

Aquí se describe en primer lugar como referencia básica una composición terapéutica que comprende una fracción o fracciones purificadas de al menos dos compuestos, que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos seleccionada entre los receptores de agentes patógenos definidos por la fórmula



en la cual x es la posición de enlace 3 o 4, Sacch1 es GlcNAcβ3, Gala3, GalNAcβ4, Gala4 o Neu5Xα3/6, donde X es independientemente Ac o Gc;

n1, n2, n3, n4, m1, m2 y m3 son independientemente el número entero 0 o 1;

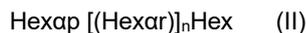
con la condición de que m2 puede ser 1 solo cuando x es 3, m1 es 0 y m3 es 1; m3 puede ser 0 solo cuando Sacch1 es Neu5Xα3, Gala3, GalNAcβ4 o Gala4;

cuando n4 es 1 m3 es 0 y n3 es 0, y

cuando n4 es 0 m1 es 1 o m2 es 1 o n3 es 1;

5 R₂ es una ceramida o un análogo de una ceramida que contienen un ácido graso hidroxilado y Sacch1 es Gala o GalNAcβ con la condición de que, si se utilizan al menos dos receptores, éstos tengan al menos una variable diferente escogida del grupo formado por Sacch1, x, m2 y n4, con la condición de que no pueden seleccionarse dos receptores de ácido siálico o dos receptores neolacto;

10 y con la condición de que, si la composición contiene solo un receptor según la fórmula (I), éste va junto con al menos un receptor de alfa-hexosa definido por la fórmula



15 en la cual Hex es Gal o Man, n es independientemente 0 o 1, p y r son posiciones de enlace 3 o 6 entre restos de Man, con la condición de que si Hex es Man, p es 3 y r es 6, y si p es 6 r es 3; y si Hex es Gal, p es 4 y n es 0, con la condición de que cuando Hex es Gal no está con el receptor Gala4Gal según la fórmula I; para usar como medicamento. La fórmula general (I) no forma parte de la presente invención.

20 La presente invención se refiere pues a una composición terapéutica que contiene una más o fracciones purificadas de al menos dos compuestos que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos, seleccionada entre receptores de lactosilceramida elegidos entre los receptores de agentes patógenos definidos por la fórmula (Ib), la cual ha sido derivada de la fórmula general (I). La fórmula (Ib) se expresa como:



25 en la cual

n4 y m3 son independientemente el número entero 0 o 1;

30 donde la secuencia activadora A1 de tipo natural del extremo no reductor se selecciona del grupo GalNAcβ4, Gala4, Neu5Xα3, Neu5Xα6, GalNAcβ3Galα4, Galβ3GalNAcβ4 Galβ4GlcNAcβ3, GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc, Galβ3GlcNAcβ3, Neu5Xα3Galβ4GlcNAcβ3, Neu5Xα6Galβ4GlcNAcβ3 y Galβ3 (Fuca3) GlcNAcβ3, en las que X es independientemente Ac o Gc y A2 es una ceramida que incluye un ácido graso hidroxilado; con la condición de que las secuencias oligosacáridas comprendan al menos A1 o A2 o ambas.

35 A1 se elige preferiblemente del grupo formado por Gala4, Neu5Xα3, Neu5Xα6, Galβ4GlcNAcβ3 o Galβ3GlcNAcβ3.

La presente invención también se refiere a dicha composición terapéutica para usarla en el tratamiento de la diarrea.

40 La diarrea puede ser una diarrea provocada por uno de los cinco tipos principales de *E. coli* causantes de diarrea, concretamente EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxígena), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva), e incluso por cepas de *E. coli* de tipo natural, no tipificadas o tipificables, causantes de diarrea.

45 La presente invención se refiere igualmente a dicha composición terapéutica para emplearla en el tratamiento de las infecciones gastrointestinales.

Otra forma de ejecución se refiere al empleo de dicha composición terapéutica para neutralizar agentes patógenos o bacterias en el interior o en la superficie de productos alimenticios.

50 Otra forma más de ejecución se refiere a dicha composición terapéutica para preparar una composición nutracéutica, farmacéutica, nutricional o fórmula infantil destinada al tratamiento de la diarrea o de infecciones gastrointestinales, cuando la diarrea está provocada por uno de los cinco tipos principales de *E. coli* causantes de diarrea, en concreto por EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxígena), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva), e incluso por cepas de *E. coli* de tipo natural, no tipificadas o tipificables, causantes de diarrea.

55 La presente invención se refiere asimismo a una composición terapéutica que contiene fracciones purificadas de al menos dos compuestos que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos, elegida entre los receptores de lactosilceramida definidos por la fórmula



60 en la cual x es una posición de enlace 3 o 4, R₂ es una ceramida o un análogo de una ceramida que comprenden un ácido graso hidroxilado y R₁ es Galα, Galβ, GalNAcβ, GlcNAcβ o un oligosacárido más largo que comprende Galα, Galβ, GalNAcβ o GlcNAcβ en el extremo reductor o Neu5Xα, donde X es Ac o Gc, con la condición de que, cuando R₂ es GlcNAcβ o Neu5Xα, x es 3.

Otra forma de ejecución se refiere a dicha composición terapéutica para preparar una composición nutracéutica, una composición nutricional o una fórmula infantil destinada tratar la diarrea o las infecciones gastrointestinales, cuando la diarrea está provocada por uno de los cinco tipos principales de *E. coli* causantes de diarrea, específicamente por EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigénica), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva), e incluso por cepas de *E. coli* de tipo natural, no tipificadas o tipificables, causantes de diarrea.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Unión de cepas de *Escherichia coli* diarreica de tipo natural a mezclas de glicosfingolípidos. (A) Glicosfingolípidos detectados con anisaldehído. (B y C) Autorradiogramas obtenidos después de la unión de aislados de *E. coli* diarreico de tipo natural radiomarcados. Los glicosfingolípidos se separaron en placas de gel de sílice con recubrimiento posterior de aluminio, usando cloroformo/metanol/agua (60: 35: 8 en volumen) como sistema disolvente, y el ensayo de unión se llevó a cabo del modo descrito en "Procedimientos experimentales". Las bandas fueron de: banda 1, glicosfingolípidos no ácidos de heces de ratón, 40 µg; banda 2, glicosfingolípidos no ácidos procedentes de eritrocitos de cobaya, 40 µg; banda 3, glicosfingolípidos de Forssman, (GalNAc α 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer), 4 µg; banda 4, gangliotriaosilceramida (GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer), 4 µg; banda 5, gangliotetraosilceramida (Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer), 4 µg; banda 6, glicosfingolípidos no ácidos de meconio humano, 40 µg; banda 7, glicosfingolípidos no ácidos de estómago humano, 40 µg; banda 8, globósido (GalNAc β Gal α 4Gal (β 4Glc β 1Cer), 4 µg; banda 9, glicosfingolípidos ácidos de eritrocitos humanos, 40 µg. El tiempo de autorradiografía fue de 12 h.

FIG. 2. Unión de la cepa diarreica de *Escherichia coli* CCUG 38077 a glicosfingolípidos puros en el cromatograma de capa fina. (A) Detección química por anisaldehído. (B) Autorradiograma obtenido mediante la unión de la cepa CCAG 38077 de *E. coli* marcada con S³⁵. Los glicosfingolípidos se separaron en placas de gel de sílice con recubrimiento posterior de aluminio, usando cloroformo/metanol/agua (60: 35: 8, en volumen) como sistema disolvente, y el ensayo de unión se llevó a cabo del modo descrito en "Procedimientos experimentales". Las bandas fueron de: banda 1, lactotetraosilceramida (Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), 4 µg; banda 2, NeuAc-GM3 (NeuAc α 3Gal β 4Glc β 1Cer), 4 µg; banda 3, NeuGc-GM3 (NeuGc α 3Gal β 4Glc β 1Cer), 4 µg; banda 4, NeuAc α 3-sialilparaglobósido (NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), 4 µg; banda 5, NeuGc-sialilparaglobósido (NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), 4 µg; banda 6, sialil-Le^a hexanglicosilceramida (NeuAc α 3Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 11Cer), 4 µg; banda 7, NeuGc-neolactoheptaosilceramida (NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer), 4 µg; banda 8, gangliósido GD1a (NeuAc α 3Gal β 3GalNAc β 4 (NeuAc α 3)Gal β 4Glc β 1Cer), 4 µg. El tiempo de autorradiografía fue de 12 h.

FIG. 3. Efecto de la preincubación con oligosacáridos. Una cepa de *E. coli* 44 de tipo natural radiomarcada se incubó a temperatura ambiente con una mezcla de globotetraosa (1,5 mM) y 3'-sialil-lactosa (1,5 mM) en PBS durante 1 hora. Luego las suspensiones se usaron en el ensayo de unión mediante un cromatograma. (A) Unión de la cepa de *E. coli* 44 radiomarcada. (B) Unión de la cepa de *E. coli* 44 incubada con globotetraosa y 3'-sialil-lactosa. Las bandas 1-5 fueron de diluciones en serie de globósido (GalNAc β Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer) y 3'-sialilparaglobósido (NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer). Banda 1, 4 µg de cada compuesto; banda 2, 2 µg de cada compuesto; banda 3, 1 µg de cada compuesto; banda 4, 0,5 µg de cada compuesto; banda 5, 0,2 µg de cada compuesto; banda 6, B7 heptaglicosilceramida tipo 1 (Gal α 3(Fuc α 2)Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer; control negativo), 4 µg. Los glicosfingolípidos se separaron en placas de gel de sílice con recubrimiento posterior de aluminio, usando cloroformo/metanol/agua (60: 35: 8, en volumen) como sistema disolvente, y el ensayo de unión se realizó del modo descrito en "Procedimientos experimentales". El tiempo de autorradiografía fue de 12 h. (C) Curvas de unión obtenidas después de cuantificar la unión por densitometría. Los autorradiogramas en (A) y (B) se analizaron usando el programa NIH Image.

FIG. 4. Glicosfingolípidos separados en un cromatograma de capa fina después de la detección química (A) y autorradiogramas obtenidos después de la unión de diferentes *Helicobacter spp* (B-I). Bandas: 1, fracción de glicosfingolípidos ácidos de granulocitos humanos, 40 µg; 2, Gal β 4Glc β 1Cer (lactosilceramida) de intestino de perro, 2 µg; 3, Gal α 3Gal β 4Glc β 1Cer (isoglobotriaosilceramida) de intestino de perro, 2 µg; 4, Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer (gangliotetraosilceramida) de heces de ratón, 2 µg; 5, Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (glicosfingolípidos Le_a-5) de meconio humano, 2 µg; 6, Fuc α 2Gal β 3 (Fuc α 4) GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (glicosfingolípidos Le_b-6) de meconio humano, 2 µg; 7, GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer (globotetraosilceramida) de eritrocitos humanos, 2 µg; 8, Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (lactotetraosilceramida) de meconio humano, 2 µg.

FIG. 5. Inhibición de la unión de *E. coli* enteropatógena a glicosfingolípidos por oligosacáridos solubles. Una cepa de *E. coli* 37 de tipo natural radiomarcada se incubó a temperatura ambiente durante 1 h con una mezcla de globotriaosa (1,5 mM), neolactotetraosa (1,5 mM) y 6'-sialil-lactosa (1,5 mM) en PBS. Después las suspensiones se usaron en el ensayo de unión mediante un cromatograma. (A) Unión de la cepa de *E. coli* 37 radiomarcada. (B) Unión de la cepa de *E. coli* 37 incubada con una mezcla de globotriaosa, neolactotetraosa y 6'-sialil-lactosa. Las bandas 1-4 fueron de diluciones en serie de globotriaosilceramida (Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer) y NeuGc-neo lactohexaosilceramida (NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer). Banda 1, 2 µg de cada compuesto; banda 2, 1 µg de cada compuesto; banda 3, 0,5 µg de cada compuesto; banda 4, 0,2 µg de

cada compuesto. Las bandas 5-8 fueron de diluciones en serie de NeuGc-neolactotetraosilceramida (NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 11Cer). Banda 5, 2 μ g de cada compuesto; banda 6, 1 μ g de cada compuesto; banda 7, 0,5 μ g de cada compuesto; banda 8, 0,2 μ g de cada compuesto. Los glicosfingolípidos se separaron en placas de gel de sílice con soporte de aluminio, usando cloroformo/metanol/agua (60: 35: 8, en volumen) como sistema disolvente, y el ensayo de unión se llevó a cabo del modo descrito en "Procedimientos experimentales". El tiempo de autorradiografía fue de 12 h. (C) Curvas de unión obtenidas después de cuantificar la unión por densitometría. Los autorradiogramas en (A) y (B) se analizaron empleando el programa NIH Image. Círculos abiertos: unión a globotriaosilceramida (figura 6A); círculos rellenos: unión a globotriaosilceramida después de incubar los oligosacáridos (figura 6B). Cuadrados abiertos: unión a NeuGc-neolactoheptaosilceramida (figura 6A); cuadrados rellenos: unión a NeuGc-neolactoheptaosilceramida después de incubar los oligosacáridos (Fig. 6B). Triángulos abiertos: unión a NeuGc-neolactotetraosilceramida (Fig. 6A); triángulos rellenos: unión a NeuGc-neolactotetraosilceramida después de incubar los oligosacáridos (Fig. 6B).

FIG. 6. La E. coli enterohemorrágica no se une a los glicosfingolípidos de las globoseries ni a los glicosfingolípidos que llevan ácido siálico. Unión de la cepa de *E. coli* enterohemorrágica W135A de tipo natural a mezclas de glicosfingolípidos. Los glicosfingolípidos se separaron en placas de gel de sílice con soporte de aluminio, usando cloroformo/metanol/agua (60: 35: 8, en volumen) como sistema disolvente, y el ensayo de unión se llevó a cabo del modo descrito en "Procedimientos experimentales". Los bandas fueron de: banda 1, glicosfingolípidos no ácidos de eritrocitos del grupo sanguíneo O, 40 μ g; banda 2, glicosfingolípidos no ácidos de intestino bovino, 40 μ g; banda 3, glicosfingolípidos ácidos de intestino bovino, 40 μ g; banda 4, glicosfingolípidos no ácidos de intestino ovino, 40 μ g; banda 5, glicosfingolípidos ácidos de intestino ovino (fase superior de Folch), 40 μ g; banda 6, glicosfingolípidos ácidos del intestino ovino (fase inferior de Folch 9, 40 μ g; banda 7, glucoesfingolípidos no ácidos del intestino del gato, 40 μ g; banda 8, glicosfingolípidos ácidos del intestino del caballo 40 μ g; banda 9, glicosfingolípidos ácidos de granulocitos eosinófilos humanos, 40 μ g. El tiempo de autorradiografía fue de 12 h.

FIG. 7. Pérdida selectiva de unión a isoglobotriaosilceramida tras el subcultivo. Unión de la *E. coli* CCUG 38092 enteroinvasiva a glicosfingolípidos puros en cromatograma de capa fina. (A) Autorradiograma obtenido mediante la unión de la cepa de *E. coli* CCUG 38092 marcada con S³⁵. (B) Autorradiograma obtenido mediante la unión de la cepa de *E. coli* CCUG 38092 marcada con S³⁵ después del subcultivo. Los glicosfingolípidos se separaron en placas de gel de sílice con soporte de aluminio, usando cloroformo/metanol/agua (60: 35: 8, en volumen) como sistema disolvente, y el ensayo de unión se llevó a cabo del modo descrito en "Procedimientos experimentales". Los bandas fueron de: banda 1, galactosilceramida (Gal β 1Cer), 4 μ g; banda 2, lactosilceramida con ceramida no hidroxilada (Gal β 4Glc β 1Cer), 4 μ g; banda 3, NeuGc-GM3 (NeuGc α 3Gal β 4Glc β 1Cer), 4 μ g; banda 4, isoglobotriaosilceramida (Gal α 3Gal β 4Glc β 1Cer), 4 μ g; banda 5, gangliotetraosilceramida (Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer), 4 μ g; banda 6, globósido (GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer), 4 μ g. El tiempo de autorradiografía fue de 12 h.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

La unión de virus y bacterias patógenas a los tejidos humanos depende de los receptores de carbohidratos. Se han estado ensayando varios carbohidratos en ensayos clínicos o preclínicos por su posible efecto en la inhibición de las infecciones causadas por bacterias o virus patógenos. Por ejemplo, se ha propuesto un oligosacárido sialilado para la inhibición del agente patógeno gástrico humano *H. pylori* y se ha sugerido que otro oligosacárido es eficaz contra las bacterias causantes de la otitis media, pero no se han obtenido resultados del primer ensayo tras varios años de estudio y también se anunció que el otro ensayo no había tenido éxito. También fracasaron dos ensayos en fase 3 sobre conjugados de oligosacáridos inhibidores de toxinas bacterianas. Estos fallos están relacionados en parte con una pobre comprensión de los exactos mecanismos patógenos que hay detrás de las enfermedades. La presente invención incluye amplios estudios sobre los receptores y mecanismos moleculares de la patogénesis, que permiten el tratamiento y diagnóstico de varios agentes patógenos. La presente invención se refiere sobre todo al tratamiento de enfermedades tales como diversos tipos de diarreas causadas por la unión de *E. coli*.

En una forma de ejecución específica, la invención también se puede emplear para el tratamiento de infecciones del ganado o de animales de compañía. Las especificidades de unión de las bacterias que infectan animales difieren de las de los agentes patógenos humanos. No obstante, los mecanismos generales que usan varias especificidades al mismo tiempo y el empleo de conjugados polivalentes, especialmente conjugados polivalentes solubles conforme a la invención, también se prefieren para su uso con animales. Las especificidades de unión también son en parte de reacciones cruzadas y algunas de las combinaciones de receptores descritas por la presente invención también son útiles para terapias animales y contra algunas cepas bacterianas diseminadas por animales tales como las vacas. La presente invención muestra secuencias receptoras que también han sido descritas en animales que conviven con el hombre y que posiblemente juegan un papel en la transferencia de la infección, p.ej. del ganado a las personas.

La presente invención describe composiciones de carbohidratos y sustancias que inhiben agentes patógenos y se pueden usar terapéuticamente contra ellos. La unión de agentes patógenos tales como bacterias patógenas, toxinas, virus, hongos o parásitos a tejidos humanos o animales depende principalmente de los carbohidratos del receptor.

(La expresión "células patógenas" significa en este caso agentes patógenos que comprenden células eucariotas o procariotas tales como bacterias patógenas, hongos y parásitos). La presente invención se refiere concretamente al tratamiento de la infección causada por un agente patógeno o una célula patógena que tiene varias especificidades de unión. La presente invención describe composiciones de hidratos de carbono y sustancias que inhiben agentes patógenos. Las presentes composiciones y sustancias de carbohidratos se pueden emplear para inhibir la unión del agente patógeno mediada por receptores de carbohidratos y prevenir o inhibir la interacción. La presente invención se refiere en concreto a la inhibición de una célula patógena que se une a células humanas/animales o superficies de tejidos, utilizando varias especificidades de unión simultáneas.

El carbohidrato receptor se encuentra a menudo en la superficie de las células de un ser humano o animal infectado por un agente patógeno. Alternativamente, el carbohidrato receptor se halla en la superficie del agente patógeno y es reconocido por el huésped animal o humano. El carbohidrato receptor puede ser reconocido por las proteínas de unión a carbohidratos, como las lectinas, o por los enzimas que se unen a carbohidratos, por ejemplo glicosidasas, glicosiltransferasas, o por enzimas transglicosilantes o anticuerpos. Alternativamente dos secuencias oligosacáridas pueden reconocerse entre sí mediante interacciones carbohidrato-carbohidrato.

Prevención general de agentes patógenos mediante un grupo de receptores generales definidos, sobre todo usando combinaciones de secuencias oligosacáridas inhibitorias de agentes patógenos

La presente invención resuelve los problemas de ineficacia del empleo terapéutico de oligosacáridos. La presente invención revela un uso simultáneo de varias especificidades de unión mostradas por agentes patógenos comunes.

La presente invención se refiere preferiblemente al empleo de al menos dos secuencias oligosacáridas diferentes inhibitorias de agentes patógenos, con mayor preferencia de al menos tres secuencias oligosacáridas diferentes de unión a agentes patógenos, para el tratamiento de enfermedades debidas a la presencia de un agente patógeno. En una forma de ejecución preferida se usan cuatro o más secuencias oligosacáridas diferentes. La presente invención se refiere específicamente al tratamiento de la infección por un patógeno o una célula patógena que posee varias especificidades de unión a carbohidratos. Las especificidades de unión a carbohidratos según la presente invención pueden ser inhibidas por carbohidratos monovalentes o polivalentes. Preferentemente, el agente patógeno causante de la infección tiene al menos tres especificidades diferentes de unión a carbohidratos susceptibles de ser inhibidas y con mayor preferencia al menos cuatro especificidades de unión a carbohidratos susceptibles de ser inhibidas de acuerdo con la presente invención. La presente invención se refiere especialmente al tratamiento de infecciones relevantes cuando los oligosacáridos receptores se encuentran en el tejido diana de la patogénesis. El uso preferido de dos o más secuencias oligosacáridas se basa en la relevancia de las composiciones empleadas, en la viabilidad inhibitoria de las composiciones y en sus efectos sinérgicos especiales contra uno o varios agentes patógenos.

La presente invención se refiere en especial al tratamiento de diarreas causadas por *E. coli*. La presente invención muestra combinaciones útiles de secuencias oligosacáridas activas del receptor para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias *E. coli* diarreicas, particularmente por las siguientes especies de *Escherichia coli*: EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigena), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva). La presente invención expone una amplia variedad de cepas bacterianas de *E. coli* y señala un grupo de ocho actividades receptoras que son comunes a todas las bacterias *E. coli* causantes de diarrea. El estado técnico anterior se refiere a un número limitado de secuencias receptoras y a un número limitado de cepas de agentes patógenos concretos tales como EPEC o ETEC y contiene datos contradictorios sobre las especificidades. Las diferencias entre las cepas de *E. coli* no permiten hacer ninguna generalización respecto a las especificidades de unión de los diferentes tipos o cepas de bacterias. La relevancia de las especificidades de unión a grupos más grandes de cepas o a los principales tipos de *E. coli* solo puede evaluarse estudiando numerosas cepas, tal como se demuestra en la presente invención.

El conocimiento preciso de las especificidades de unión comunes a los principales agentes patógenos y a los tipos de patógenos causantes de diarreas permite un diseño racional de terapias efectivas.

La presente invención ofrece un nuevo tratamiento general para la diarrea. Según la presente invención, la diarrea tratada es la causada por *E. coli*, es decir, la infección producida por las principales bacterias diarreicas (o causantes de diarrea) de *Escherichia coli*, especialmente los subgrupos que incluyen EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigena), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva). Los cinco subgrupos engloban la mayor parte de las diarreas clínicamente relevantes causadas por *E. coli* diarreica. El estado técnico anterior no describe terapias basadas en carbohidratos para los cinco tipos principales de diarreas causadas por *E. coli*. El tratamiento general para ellos es especialmente útil por los problemas de resistencia que surgen al usar antibióticos tradicionales. No es probable que las terapias de antiadhesión a base de carbohidratos tengan los mismos problemas, porque las cantidades de los posibles receptores existentes en el sistema gastrointestinal son limitadas. La terapia general de diarrea de amplio espectro según la presente invención también es útil cuando el agente patógeno causante de la diarrea del paciente no está diagnosticado.

De acuerdo con la presente invención hay varias secuencias de oligosacáridos receptores que son comunes en las bacterias *E. coli* causantes de diarrea. Estos receptores son útiles para el diagnóstico o el tratamiento de diarreas debidas a *E. coli* diarreicas. La presente invención describe por primera vez terapias generales eficaces contra todos los tipos principales de bacterias *E. coli* causantes de diarrea. La presente invención se refiere especialmente al uso de al menos dos o varias de las secuencias oligosacáridas del receptor contra *E. coli* diarreica. Además, la presente invención se refiere al uso de combinaciones específicas de secuencias oligosacáridas activas de los receptores para el diagnóstico de la *E. coli* diarreica o para la prevención o el tratamiento de infecciones causadas por *E. coli* diarreica.

La presente invención también se refiere al tratamiento de infecciones intestinales cuando un paciente está infectado por una bacteria resistente a los antibióticos tradicionales. La presente invención se refiere asimismo al uso de las secuencias de oligosacáridos receptores según la presente invención junto con antibióticos tradicionales, a fin de mejorar los efectos terapéuticos de los mismos.

Esta propuesta se puede aplicar junto con el análisis de las ocho especificidades de unión al receptor de las cepas patógenas específicas o de subgrupos concretos preferidos de las mismas, conforme a lo descrito en la presente invención.

La presente invención también se refiere a terapias generales contra los tipos de *E. coli* causantes de diarrea. Las patentes o estudios anteriores solo se refieren a tipos únicos de bacterias *E. coli* causantes de diarrea. Al estudiar muchas cepas de los diferentes tipos de agentes patógenos se vio por primera vez que las ocho especificidades de unión eran comunes a todos los tipos principales de *E. coli* causantes de diarrea, es decir EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigénica), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva). La presente invención se refiere al uso de un solo componente de las ocho especificidades de unión al receptor contra al menos tres de los tipos de bacteria *E. coli*, con mayor preferencia contra al menos cuatro de los tipos de *E. coli* y sobre todo contra todos los cinco tipos de *E. coli*. De forma similar, la presente invención se refiere al uso de combinaciones de las ocho especificidades de unión al receptor contra al menos tres y con mayor preferencia contra todos los tipos principales de *E. coli* causantes de diarrea.

La presente invención también se refiere a las combinaciones específicas de las especificidades de unión que son particularmente útiles para prevenir una infección. Las combinaciones están basadas en

- el conocimiento de las propiedades de las secuencias oligosacáridas como inhibidores bacterianos
- el conocimiento de la presencia de estructuras receptoras relevantes en el epitelio intestinal
- el conocimiento de los diferentes niveles de receptores en la cascada de infección
- el conocimiento de los receptores que son específicamente útiles contra los agentes patógenos, para evitar las interacciones con la flora normal
- el diseño de inhibidores especiales de bajo coste para las especificidades de unión
- el diseño de combinaciones específicas de receptores para las infecciones locales, cuando las cepas específicas tienen una actividad de unión a un subgrupo de dichas especificidades de unión

La presente invención también se refiere a la terapia de tipos o especies de *E. coli* causantes de diarreas, que son importantes pero están menos estudiados. La invención se refiere concretamente al tratamiento de las infecciones causadas por EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa). La invención también se refiere al tratamiento de diarreas causadas por EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva). Estas infecciones causan diarreas, sobre todo en los niños de países en vías de desarrollo, y las nuevas terapias son de gran importancia para tratarlas. Se resalta la necesidad de sustancias terapéuticas bloqueantes de la EAEC y la EIEC, porque falta conocimiento sobre las especificidades de las bacterias.

En una forma de ejecución específica, la presente invención se refiere al tratamiento de la diarrea provocada por agentes patógenos que no secretan toxinas, preferiblemente por *E. coli* no secretora de toxinas. Los oligosacáridos bloqueantes de toxinas no deberían tener ningún efecto sobre tales agentes patógenos. Preferiblemente, la *E. coli* no secretora de toxinas no libera toxinas como la verotoxina, que reconozcan carbohidratos basados en Gala4Gal.

En otra forma de ejecución, la *E. coli* no secretora de toxinas no expresa toxinas termolábiles. La *E. coli* no secretora de toxinas es preferiblemente EPEC, EAEC o EIEC, con mayor preferencia EAEC o EIEC.

La presente invención averigua sorprendentemente que los carbohidratos Gala4Gal se pueden emplear para inhibir *E. coli* no secretoras de toxinas. La presente invención se refiere al empleo de los receptores globósidos, solos, para inhibir la unión de cualquier tipo de *E. coli* a los tejidos y sobre todo para el tratamiento de *E. coli* no secretoras de toxinas. Según una forma de ejecución preferida, la presente invención se refiere a la inhibición de la fijación de un agente patógeno secretor de toxinas, preferiblemente de *E. coli* patógena, por un oligosacárido de acuerdo con la presente invención que inhibe específicamente la unión del agente patógeno en ausencia de la toxina que se une al oligosacárido, y, según otra forma de ejecución, la presente invención se refiere al tratamiento de la infección y a la eliminación del agente patógeno en presencia de la toxina que se une al oligosacárido inhibidor.

El grupo de ocho especificidades de unión descritas incluye nuevos receptores para los tipos y especies de *E. coli* menos estudiados. La presente invención se refiere al uso de estos receptores solos y como parte de composiciones contra los tipos específicos de *E. coli*. En una forma de ejecución preferida, se usan al menos dos o al menos tres tipos de receptores oligosacáridos contra la EAEC y/o la EIEC. La presente invención también se refiere al empleo de combinaciones específicas de las especies de oligosacáridos receptores conforme a la presente invención contra la EAEC y/o la EIEC.

La presente invención también se refiere a nuevos oligosacáridos terapéuticos y a combinaciones de oligosacáridos contra la ETEC.

La presente invención también se refiere a nuevos oligosacáridos terapéuticos y a combinaciones de oligosacáridos contra la EPEC.

La presente invención también se refiere a nuevos oligosacáridos terapéuticos y a combinaciones de oligosacáridos contra la EHEC.

Las enfermedades diarreicas preferidas para el tratamiento según la presente invención incluyen, por ejemplo, las diarreas acuosas, las diarreas sanguinolentas y las diarreas graves. Las indicaciones concretas incluyen además la diarrea del viajero, las diarreas infantiles, particularmente en los países en vías de desarrollo, y las enfermedades relacionadas con las diarreas graves, incluyendo la diarrea hemorrágica y el síndrome hemolítico-urémico (SUH), en particular cuando están causadas por la EHEC. La presente invención también se refiere al tratamiento de diarreas persistentes, especialmente las causadas por la EAEC. Las diarreas persistentes son concretamente las que duran 14 días o más. La presente invención también se refiere a las diarreas de la shigelosis, sobre todo cuando están causadas por la EIEC. Las diarreas de tipo shigelosis se parecen mucho a las enfermedades causadas por *Shigella* spp. (y los agentes patógenos que las causan se parecen mucho a *Shigella* spp.), incluyendo las diarreas acuosas y sanguinolentas. Puede ser difícil o imposible diferenciar las infecciones por shigelosis y EIEC. La diarrea del viajero es una infección corriente, especialmente para las personas que viajan a países en vías de desarrollo y es causada por varios tipos de *E. coli*, especialmente por las ETEC.

En los países en vías de desarrollo cientos de millones de niños se infectan por *E. coli* causantes de diarrea. Las diarreas infantiles de los países en vías de desarrollo están causadas específicamente por múltiples tipos de *E. coli*, incluyendo EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigena), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva). Hoy en día no existe ningún tratamiento general específico para las diarreas. El incremento de la resistencia a los antibióticos tradicionales es un problema creciente. La presente invención se refiere en particular a los tratamientos y al análisis de las diarreas infantiles en los países en vías de desarrollo. Para el tratamiento de diarreas infantiles en países en vías de desarrollo, las composiciones y sustancias terapéuticas se pueden incluir en las soluciones hidratantes (que contienen, por ejemplo, sal y sacarosa) usadas en los tratamientos de las diarreas. Las composiciones terapéuticas también pueden usarse junto con tabletas de carbón o mezcladas en ellas. Las composiciones y sustancias según la presente invención se pueden emplear en combinación con terapias tradicionales para las infecciones, en particular con los tratamientos de infecciones gastrointestinales tales como las diarreas causadas por *E. coli*.

La presente invención también se refiere a infecciones generalmente más leves, en las cuales no están involucradas las bacterias EHEC. Es preferible no tratar con antibióticos tradicionales estas infecciones generalmente más leves. Las infecciones más leves pueden ser producidas por cepas de ETEC, EAEC y EIEC. La terapia de las diarreas por EHEC anteriormente propuesta, pero clínicamente infructuosa, mediante globotriosa-síllice para bloquear la toxina, no inhibía la unión de las bacterias a los receptores de glicolípidos naturales. La presente invención demostró que la unión a los globósidos es extremadamente rara o inexistente entre los EHEC, lo cual constituye una excepción a la especificidad de unión general de la *E. coli* causante de la diarrea.

Grupos generales de receptores oligosacáridos preferidos, útiles para el tratamiento de infecciones debidas a *E. coli* y otras bacterias causantes de diarrea

La presente invención revela motivos estructurales comunes de los subtipos de receptores de *E. coli* causante de diarrea. Un grupo receptor está basado en la estructura común Gal β 3/4Glc (NAc)₀₋₁; este epítipo de la cadena principal incluye lactosa (Gal β 4Glc) y lactosaminas similares Gal β 3GlcNAc (lactosamina tipo 1, receptores Lacto), Gal β 4GlcNAc (lactosamina tipo 2, receptores Neolacto). Los epítipos de la cadena principal no son de por sí muy efectivos o como disacáridos son prácticamente inactivos. La presente invención revela la presencia de diversas combinaciones de estructuras activadas, basadas en las estructuras de la cadena principal. No obstante la presente invención se refiere preferiblemente a los tipos naturales de los epítipos activados del receptor existentes en los tejidos humanos. Estas estructuras son especialmente preferidas, ya que los productos terapéuticos producidos a partir de ellas no son tóxicos y existen enzimas naturales para la producción de los receptores.

El epítipo de lactosa y las estructuras de N-acetilactosamina forman un esqueleto común que reconocen de modo similar numerosas lectinas y muchos enzimas en glicobiología. Los epítipos disacáridos comparten conformaciones comunes en las interacciones con las proteínas que reconocen estructuras galactosiladas. Por ejemplo, la fucosil-

transferasa III humana puede reconocer las tres secuencias como aceptores. La presente invención advierte que las secuencias de disacáridos pueden ser activadas por varias modificaciones naturales de los glicanos. Las partes activadoras pueden estar unidas al resto de galactosa o a la estructura de glucopiranososa, que puede ser portadora de la modificación de N-acetilo. Las modificaciones dirigen los inhibidores de carbohidrato a varios receptores en la bacteria. Los presentes inventores averiguaron que ciertas combinaciones de los carbohidratos bloqueadoras del receptor activo son necesarias para el bloqueo efectivo de los agentes patógenos.

La estructura de la cadena principal del receptor es activada por varias derivatizaciones, tales como el alargamiento del extremo reductor por enlace $\beta 3$ a galactosa o a lactosa o a otra lactosamina, especialmente con lactosamina de tipo 1 y tipo 2, que proporciona estructuras naturales tales como Gal $\beta 3$ 4GlcNAc $\beta 3$ Gal $\beta 4$ Glc (Lacto-N-neotetraosa), Gal $\beta 3$ GlcNAc $\beta 3$ Gal $\beta 4$ Glc (Lacto-N-tetraosa), Gal $\beta 3$ 4GlcNAc $\beta 3$ Gal y Gal $\beta 3$ GlcNAc $\beta 3$ Gal. Además, la estructura de la cadena principal del receptor también se puede activar mediante una estructura ceramídica que contiene un ácido graso hidroxilado específico (tal como está descrito para *H. pylori* en Angstrom y otros, 1998); esto se demostró mediante las lactosilceramidas especiales aquí descritas para la fijación de lactosilceramida.

Además, la lactosamina, en particular la Gal $\beta 4$ GlcNAc, o las estructuras de lactosa se pueden activar agregando monosacáridos naturales específicos al extremo no reductor. Una estructura terminal no reductora especialmente activadora incluye ácidos siálicos, preferiblemente NeuNAc o NeuGc unidos mediante enlaces $\alpha 3$ o $\alpha 6$; en una forma de ejecución preferida mediante enlaces $\alpha 6$. Las estructuras más preferidas de la unión a ácidos siálicos incluyen sialil-lactosas-NeuNAc $\alpha 6$ Gal $\beta 3$ 4Glc, NeuNAc $\alpha 3$ Gal $\beta 4$ Glc, NeuGc $\alpha 6$ Gal $\beta 4$ Glc, NeuGc $\alpha 3$ Gal $\beta 4$ Glc y las respectivas sialil-lactosaminas NeuNAc $\alpha 6$ Gal $\beta 3$ 4GlcNAc, NeuNAc $\alpha 3$ Gal $\beta 4$ GlcNAc, NeuGc $\alpha 6$ Gal $\beta 4$ GlcNAc, NeuGc $\alpha 3$ Gal $\beta 4$ GlcNAc, e incluso sus formas alargadas a base de LNT y LNT. Incluso los epítomos de ácido siálico truncados tienen una actividad de unión hacia *E. coli*. La estructura de ácido N-glicolilneuramínico resultó en particular fuertemente activadora.

Las otras estructuras activadoras en el lado del extremo no reductor son GalNAc $\beta 4$ o Gal $\beta 3$ GalNAc $\beta 4$, que dan estructuras receptoras de tipo natural descritas aquí como grupo específico de receptores gangliósidos. Además, la estructura activadora en el lado del extremo no reductor también incluye Gala4 y GalNAc $\beta 3$ Gala4, que proporcionan receptores de tipo natural llamados receptores globósidos. Los ganglio- y globo-receptores tienen actividad incluso como disacáridos terminales. Una forma preferida del globo-receptor se clasifica por consiguiente como receptores de hexosa unidos mediante enlace α , incluyendo la estructura mínima Gala4Gal.

Los presentes inventores advierten que los receptores de lactosamina, en particular los Neolacto-receptores, pueden representar estructuras de GlcNAc $\beta 3$ terminales.

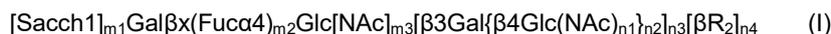
La presente invención se refiere asimismo a la activación de lactosamina de tipo 1 mediante la estructura de Fuca4 unida a GlcNAc, formando la denominada estructura Lewis a Gal $\beta 3$ (Fuca4)GlcNAc. Los receptores de fucosilo, con estructuras de activación reductoras tales como lactosilceramida, son especialmente preferidos.

La activación por la estructura Gala4 terminal resultó ser tan efectiva que la estructura Gala4Gal es activa incluso sin el extremo reductor Glc/GlcNAc. Por consiguiente el epítipo activador mínimo es Gala4Gal, con mayor preferencia Gal $\alpha 4$ Gal β . Esta estructura comparte la estructura Gal común y también es activa en forma de epítomos trisacáridos tales como Gal $\alpha 4$ Gal $\beta 4$ Glc y Gal $\alpha 4$ Gal $\beta 4$ GlcNAc. La presente invención se refiere además a los epítomos parciales Neu5Gc $\alpha 3$ Gal, Neu5Ac $\alpha 6$ Gal, Neu5Gc $\alpha 6$ Gal y Neu5Ac $\alpha 3$ Gal y, en una forma de ejecución aparte, a GalNAc $\beta 4$ Gal.

Además de los receptores de lactosamina, la presente invención describe específicamente los receptores Gala4Gal y los receptores Man $\alpha 3$ 6Man. Los dos tipos de receptor de hexosa unida mediante enlace alfa son especialmente preferidos porque son receptores naturales de bajo coste.

Las fórmulas combinadas de la presente invención para el tratamiento de la diarrea son:

Se revela una composición terapéutica que lleva una fracción o fracciones purificadas de al menos dos compuestos que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos seleccionada entre los receptores de agentes patógenos definidos por la fórmula



en la cual x es la posición de enlace 3 o 4, Sacch1 es GlcNAc $\beta 3$, Gala3, GalNAc $\beta 4$, Gala4 o Neu5X $\alpha 3/6$, donde X es independientemente Ac o Gc;

n1, n2, n3, n4, m1, m2 y m3 son independientemente el número entero 0 o 1;

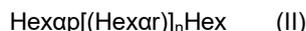
con la condición de que m2 puede ser 1 solo cuando x es 3, m1 es 0 y m3 es 1; m3 puede ser 0 solo cuando Sacch1 es Neu5X $\alpha 3$, Neu5X $\alpha 6$, Gala3, GalNAc $\beta 4$ o Gala4;

cuando n4 es 1 m3 es 0 y n3 es 0, y

cuando n4 es 0 m1 es 1 o m2 es 1 o n3 es 1;

R2 es una ceramida o un análogo de una ceramida que contienen un ácido graso hidroxilado y Sacch1 es Gala o GalNAc β con la condición de que, si se utilizan al menos dos receptores, éstos tengan al menos una variable

diferente escogida del grupo formado por Sacch1, x, m2 y n4, con la condición de que no pueden seleccionarse dos receptores de ácido siálico o dos receptores neolacto; con la condición de que, si solo se usa un receptor según la fórmula (I), éste va junto con al menos un receptor de alfa-hexosa definido por la fórmula



en la cual Hex es Gal o Man, n es independientemente 0 o 1, p y r son posiciones de enlace 3 o 6 entre restos de Man, con la condición de que si Hex es Man, p es 3 y r es 6, y si p es 6 r es 3; y si Hex es Gal, p es 4 y n es 0, con la condición de que cuando Hex es Gal no se usa con el receptor Gala4Gal según la fórmula I.

Se describe una composición terapéutica que lleva una o más fracciones purificadas de al menos dos compuestos que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos escogida entre los receptores de agentes patógenos según la fórmula I, con la condición de que cuando la secuencia activadora terminal no reductora es Gala4, GalNAcβ4, Neu5Xα3 o Neu5Xα6 las composiciones pueden comprender las secuencias oligosacáridas más cortas Gala4Gal, GalNAcβ4Gal, Neu5Xα3Gal o Neu5Xα6Gal, respectivamente, sin el extremo terminal reductor Glc o GlcNAc. Se revela que cuando la secuencia activadora terminal es Gala4, la composición puede comprender el epítipo parcial Gala4Gal. La composición opcionalmente contiene además un receptor de manosa que incluye la secuencia de oligosacáridos Manα3[(Manα6)]nMan, donde n es 0 o 1.

Estructuras activadas a base de lactosa

En una forma de ejecución específica, la presente invención se refiere a composiciones y al empleo de secuencias oligosacáridas de tipo natural que llevan lactosa. Este grupo incluye secuencias oligosacáridas de tipo lácteo como LNT, LNnT y sialil-lactosas, las secuencias base glicolípidas de tipo natural Galα4Galβ4Glc, GalNAcβ4Galβ4Glc y el receptor de lactosilceramida con el ácido graso hidroxilado. Los grupos lactosamina Galβ4GlcNAc y Galβ3GlcNAc se pueden considerar grupos activadores del resto de lactosa de LNT y LNnT y de las estructuras más alargadas de estas últimas. No se observó que el resto de lactosa tuviera una actividad bloqueante de la adhesión contra la *E.coli* causante de diarrea. Sin embargo el resto de lactosa se puede activar para obtener sustancias preferidas de elevada actividad, agregando al lado no reductor las unidades monosacáridas altamente activadoras GalNAcβ4, Gala4 o Neu5Xα3, Neu5Xα6 o las unidades alargadas disacáridas GalNAcβ3Galα4, Galβ3GalNAcβ4 o Galβ4GlcNAcβ3 o Galβ3GlcNAcβ3 o trisacáridas Neu5Xα3Galβ4GlcNAcβ3, Neu5Xα6Galβ4GlcNAcβ3 o GlcNAcβ3. En otras formas de ejecución el grupo activador terminal no reductor es la estructura Lewis a Galβ3(Fuca3)GlcNAcβ3 o Galα4Galβ34GlcNAcβ3 o GalNAcβ4Galβ4GlcNAcβ3. La estructura activadora terminal no reductora se elige preferiblemente entre las secuencias de frecuente aparición Gala4, Neu5Xα3, Neu5Xα6 o entre las unidades disacáridas más alargadas Galβ4GlcNAcβ3 o Galβ3GlcNAcβ3. Como estructura activadora en el extremo reductor se puede usar una estructura ceramídica que comprenda un ácido graso hidroxilado de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere a una composición terapéutica que contiene una más o fracciones purificadas de al menos dos compuestos que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos, elegida entre los receptores de agentes patógenos definidos por la fórmula simplificada (Ib)



en la cual n4 y m3 son independientemente el número entero 0 o 1; donde la secuencia activadora A1 de tipo natural del extremo no reductor se escoge del grupo GalNAcβ4, Gala4, Neu5Xα3, Neu5Xα6, GalNAcβ3Galα4, Galβ3GalNAcβ4 Galβ4GlcNAcβ3, GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc, Galβ3GlcNAcβ3, Neu5Xα3Galβ4GlcNAcβ3, Neu5Xα6Galβ4GlcNAcβ3 y Galβ3(Fuca3)GlcNAcβ3, con mayor preferencia del grupo Gala4, Neu5Xα3, Neu5Xα6, Galβ4GlcNAcβ3 y Galβ3GlcNAcβ3, en las que X es independientemente Ac o Gc, y A2 es una ceramida que incluye un ácido graso hidroxilado de acuerdo con la presente invención; con la condición de que las secuencias oligosacáridas comprendan al menos A1 o A2 o ambas.

Cuando solo se emplean secuencias oligosacáridas que contienen únicamente dos A1, ambas secuencias de A1 no están preferiblemente sialiladas.

Además la composición contiene opcionalmente una secuencia oligosacárida receptora de manosa que comprende la secuencia de oligosacáridos Manα3[(Manα6)]nMan, en la cual n es 0 o 1.

Se revela una composición terapéutica que contiene una más o fracciones purificadas de al menos dos compuestos que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos, elegida entre los receptores de agentes patógenos definidos por la fórmula



en la cual x es la posición de enlace 3 o 4, Sacch1 es GlcNAc β 3, Gala3, GalNAc β 4, Gala4 o Neu5X α 3/6, donde X es independientemente Ac o Gc;

n4, m1, m2 y m3 son independientemente el número entero 0 o 1,

con la condición de que m2 puede ser 1 solo cuando x es 3,

5 cuando Sacch1 es GlcNAc β 3 m3 es 1 y x es 4, y

m3 puede ser 0 solo cuando m1 es 1 o cuando n4 es 1,

cuando n4 es 0 m1 es 1 o m3 es 1;

A2 es una ceramida o un análogo de una ceramida que contienen un ácido graso hidroxilado, con la condición de seleccionar al menos dos receptores que tengan al menos una variable diferente escogida del grupo formado por

10 Sacch1, x, m2 y n4, preferiblemente con la condición de no seleccionar dos receptores de ácido siálico.

Además la composición contiene opcionalmente un receptor de manosa que comprende la secuencia oligosacárida Man α 3[(Man α 6)]_nMan, en la cual n es 0 o 1.

15 Se revela una composición que lleva al menos dos compuestos descritos arriba por la fórmula 1c cuando m2 es 0. Se revela una composición que lleva al menos dos compuestos descritos arriba por la fórmula 1c cuando n4 es 0.

Se revela una composición terapéutica que contiene una más o fracciones purificadas de al menos dos compuestos que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos, elegida entre los receptores de

20 agentes patógenos definidos por la fórmula



25 donde x es la posición de enlace 3 o 4, Sacch1 es Gala4, Neu5X α 3 o Neu5X α 6, donde X es independientemente Ac o Gc;

m1 y m3 son independientemente el número entero 0 o 1,

con la condición de que m1 es 1 o m3 es 1,

con la condición de seleccionar al menos dos receptores que tengan al menos una variable diferente Sacch1 o x,

30 preferiblemente con la condición de no escoger dos receptores de ácido siálico. Según una forma de ejecución preferida Neu5X es Neu5Ac.

Las secuencias oligosacáridas a base de lactosa más preferidas para las composiciones y reveladas para los usos incluyen las sustancias preferidas según la fórmula 1c: Gala4Gal β 4Glc, NeuNAc α 3Gal β 4Glc, NeuNAc α 6Gal β 4Glc, Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc y Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc. Se revela que las estructuras sialiladas preferidas conforme a

35 la fórmula 1c incluyen las sialil-lactosaminas NeuNAc α 3Gal β 4GlcNAc, NeuNAc α 6Gal β 4GlcNAc. Por lo tanto las siete secuencias oligosacáridas altamente preferidas incluyen Gal α 4Gal β 34Glc, NeuNAc α 3Gal β 4Glc, NeuNAc α 6Gal β 4Glc, NeuNAc α 3Gal β 4GlcNAc, NeuNAc α 6Gal β 4GlcNAc, Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc y Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc.

Se revela que las estructuras sialiladas preferidas incluyen uno o todos los sialil-oligosacáridos comunes de la leche bovina NeuNAc α 3Gal β 34Glc, NeuNAc α 6Gal β 34Glc y NeuNAc α 6Gal β 4GlcNAc. Los oligosacáridos de leche bovina se pueden facilitar como una fracción de leche bovina, según lo descrito por Nakamura y otros, 2003. En otra forma de ejecución se prefieren las secuencias oligosacáridas que contienen ácido N-glicolilneuramínico. Las secuencias oligosacáridas de N-glicolilo preferidas comprenden NeuNGc α 3Gal β 4Glc, NeuNGc α 6Gal β 4Glc, NeuNGc α 3Gal β 34GlcNAc y NeuNGc α 6Gal β 4GlcNAc.

45 En una forma de ejecución preferida, las secuencias oligosacáridas a base de lactosa para las composiciones y los usos según la presente invención incluyen las secuencias oligosacáridas neutras Gal α 4Gal β 4Glc, Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc (LNnT) y Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc (LNT).

50 En una forma de ejecución preferida se usa al menos un oligosacárido sialilado preferido - sobre todo una fracción de leche bovina que comprenda oligosacáridos sialilados - junto con al menos un oligosacárido neutro preferido.

En una forma de ejecución preferida la composición no es leche humana ni una fracción de oligosacáridos de leche humana. Debido a su escasez material y por los riesgos de infección, la leche humana no es una fuente preferida de oligosacáridos. Según una forma de ejecución preferida, la composición de dos secuencias oligosacáridas no es una fracción de oligosacáridos de leche humana que pueda contener una mezcla de LNT y LNnT. Las combinaciones binarias preferidas de los oligosacáridos neutros más preferidos incluyen aquellas que llevan LNnT y Gal α 4Gal β 4Glc y las que llevan LNT y Gal α 4Gal β 34Glc. En otra forma de ejecución preferida, las composiciones que llevan LNnT se prefieren a las que contienen LNT, cuando una cepa bacteriana de infección regional usa la especificidad de LNnT.

60 También se prefiere usar la LNnT en composiciones inhibidoras monovalentes, sobre todo cuando los inhibidores se usan a bajas concentraciones.

Uso de la estructura preferida en forma de sustancias únicas

Se describe el uso de una única sustancia de acuerdo con la fórmula 1d, opcionalmente con otras estructuras según la presente invención, para la inhibición de la *E. coli* causante de diarrea, preferiblemente de la *E. coli* diarreica humana. La inhibición se refiere a cualquier tipo de *E. coli* diarreica no secretora de toxinas, conforme a la presente invención. En una forma de ejecución preferida se usan oligosacáridos monovalentes, con mayor preferencia a una concentración final menor de 2 mM, sobre todo a una concentración inferior a 1 mM. En una forma de ejecución concreta se usa un oligosacárido de globotriosa a una concentración por debajo de 0,3 mM o por debajo de 0,1 mM, pero preferiblemente por encima de 0,01 mM. Se revela que dichos oligosacáridos se emplean como conjugados polivalentes solubles que llevan un solo oligosacárido y opcionalmente otros carbohidratos. Con mayor preferencia el oligosacárido se usa como conjugado polivalente con un oligosacárido o polisacárido soluble, de acuerdo con la invención. La presente invención se refiere además al empleo de los epítomos oligosacáridos individuales, conforme a la presente invención, para el tratamiento de diarreas causadas por cualquier tipo individual de *E. coli* según la presente invención, preferiblemente por los tipos EAEC y EIEC de *E. coli*.

Las estructuras preferidas son múltiples preferidas de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, como epítomos de unión frecuente de acuerdo con la invención. La disponibilidad de los sacáridos para la producción comercial efectiva y la presencia y aceptabilidad naturales como secuencias de tipo natural hace que el sacárido sea más preferible. Las mezclas de oligosacáridos más preferidas de acuerdo con la invención se prefieren adicionalmente como inhibidores monovalentes de la adhesión bacteriana. Los resultados mostraron que los receptores Globo, los receptores de Lacto, los receptores de ácido siálico y los receptores de Neolacto son inhibibles a bajas concentraciones específicamente por oligosacáridos monovalentes correspondientes. El uso de los oligosacáridos específicos monovalentes libres como inhibidores de la adhesión de la *E. coli* causante de diarrea no se ha demostrado previamente. Además, se mostraron combinaciones activas de los oligosacáridos preferidos libres, por ejemplo, se demostró que las mezclas de globooligosacáridos, LNnT y sialiloligosacáridos son inhibidores activos de baja concentración simultáneamente en la *E. coli* causante de diarrea. La presente invención también muestra por primera vez la presencia simultánea de múltiples actividades de unión a la *E. coli* diarreica específica.

Además, estos forman un grupo estructuralmente definido de estructuras de lactosa activadas efectivas contra diferentes estructuras receptoras de bacterias diarreicas humanas. La presente invención se refiere además al uso de tipos de receptores de diferentes contactos en infección como se describe en la invención. Los primeros receptores de contacto están presentes en el nivel de glicoproteínas y posiblemente glicolípidos mayores, mientras que los segundos receptores de contacto están presentes más cerca de la membrana en glicolípidos como se describe en la invención.

Las estructuras preferidas lo son de manera múltiple según la presente invención, por ejemplo como epítomos de unión frecuente conforme a la presente invención. La disponibilidad de los sacáridos para una producción comercial efectiva y su existencia nativa y su aceptación en forma de secuencias de tipo natural los hace más preferibles. Las mezclas de oligosacáridos más preferidas de acuerdo con la presente invención lo son también como inhibidores monovalentes de la adhesión bacteriana. Los resultados demostraron que los globo-receptores, los receptores de Lacto, los receptores de ácido siálico y los receptores de Neolacto pueden ser inhibidos específicamente por los correspondientes oligosacáridos monovalentes a bajas concentraciones. El uso de los oligosacáridos monovalentes específicos libres como inhibidores de la adhesión de *E. coli* causante de diarrea no ha sido probado anteriormente.

Además se indicaron combinaciones activas de los oligosacáridos libres preferidos; se demostró, por ejemplo, que las mezclas de globo-oligosacáridos, LNnT y sialil-oligosacáridos son simultáneamente inhibidores activos a baja concentración de la *E. coli* causante de diarrea. La presente invención también muestra por primera vez la presencia simultánea de múltiples actividades de unión en una *E. coli* diarreica específica. Éstas forman además un grupo ordenadamente definido de estructuras de lactosa activadas que son efectivas contra varias estructuras receptoras de bacterias diarreicas humanas. Además la presente invención se refiere al uso de diferentes tipos de receptores según el nivel de contacto en la infección, tal como se describe en la presente invención. Los primeros receptores de contacto se encuentran al nivel de las glicoproteínas y probablemente de los glicolípidos más grandes, mientras que los segundos receptores de contacto se hallan más cerca de la membrana en los glicolípidos, tal como se describe en la presente invención.

Se revela una composición terapéutica que contiene una más o fracciones purificadas de al menos dos compuestos que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos según la fórmula I, elegida entre los grupos a) and b):

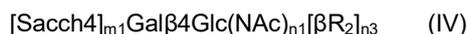
a) al menos un receptor de primer contacto de los tipos de lacto, neolacto, fucosa o ácido siálico, definidos por la fórmula



x es la posición de enlace 3 o 4,

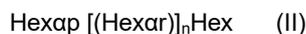
Sacch1 es Neu5X α 3/6, donde X es independientemente Ac o Gc, lo cual significa que el ácido siálico es Neu5Ac o Neu5Gc o GlcNAc β 3, donde n1, n2, n3, m1, m2 y m3 son independientemente el número entero 0 o 1; con la condición de que m2 solo puede ser 1 cuando x es 3, y m3 solo puede ser 0 cuando Sacch1 es Neu5X α 3/6, y

b) al menos un receptor de segundo contacto de los tipos de lactosilceramida, ganglio o Gala4Gal, definidos por la fórmula



en la cual n1 y n3 son independientemente el número entero 0 o 1, con la condición de que cuando n3 es 1 n1 es 0; m1 es 1 o 0, con la condición de que cuando n3 es 0 m1 es 1; R₂ es una ceramida o un análogo de una ceramida que contienen un ácido graso hidroxilado y Sacch1 es Gala o GalNAc β .

Y opcionalmente al menos un receptor de alfa-hexosa definido por la fórmula

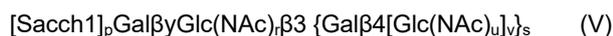


en la cual Hex es Gal o Man, n es independientemente 0 o 1, p y r son posiciones de enlace 3 o 6 entre restos de Man, con la condición de que si Hex es Man, p es 3 y r es 6, y si p es 6 r es 3; y si Hex es Gal, p es 4 y n es 0, con la condición de que cuando Hex es Gal no se usa con el receptor Gala4Gal según la fórmula IV; para usar como medicamento.

Los receptores de primer contacto más preferidos incluyen los sialil-receptores, los lacto-receptores y los neolacto-receptores. Entre los receptores de segundo contacto se prefieren especialmente los receptores Gala4Gal. Según una forma de ejecución específica el receptor de manosa se incluye en el grupo de los receptores de primer contacto como estructuras ricas en manosa presentadas por glicoproteínas.

Especificidades de unión frecuentes entre los agentes patógenos gástricos, en particular la *E. coli* causante de diarrea

Se revela el uso de las especificidades de unión más frecuentes de *E. coli* causante de diarrea. Las especificidades de unión más frecuentes comprenden los globo-receptores, los sialil-receptores, los lacto-receptores y los neolacto-receptores. Las estructuras frecuentes incluyen secuencias oligosacáridas según la fórmula:



en la cual p, r, s, u y v son independientemente 0 o 1, e y es la posición de enlace 3 o 4; x es la posición de enlace 3 o 4, donde Sacch1 es NeuNX α 3 o NeuNX α 6 o Gala4 o GlcNAc β 3, con la condición de que r solo puede ser 0 cuando s es 0 y Sacch es NeuNX α 3 o NeuNX α 6 o Gala4.

Alternativamente los globo-receptores pueden ser otras secuencias Gala4Gal terminales.

Entre las especificidades de unión frecuentes, los globo-receptores representan una unión particularmente fuerte y estable. Los sialil-receptores, los lacto-receptores y los neolacto-receptores se prefieren igualmente debido a las uniones fuertes y estables que indican una mayor importancia durante las infecciones. Los presentes inventores también pudieron probar que las especificidades de unión hacia las respectivas secuencias de glicolípidos pueden ser inhibidas incluso por pequeñas concentraciones de oligosacáridos monovalentes. Las especificidades preferidas de unión frecuente incluyen formas de unión fuertemente activadas de las secuencias, con mayor preferencia de los oligosacáridos de leche humana y animal lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT), sialil-lactosas NeuNAc α 3Lac, NeuNAc α 6Lac, sialil-lactosaminas NeuNAc α 3LacNAc, NeuNAc α 6LacNAc y las formas alargadas NeuNAc α Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, NeuNAc α 6Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc. Las secuencias oligosacáridas de tipo natural humano Gal α 4Gal β 4Glc y las secuencias de tipo pectínico reducidas con ácido carboxílico Gal[α 4Gal]_n también son preferidas.

La presente invención se refiere preferiblemente al uso de al menos dos secuencias oligosacáridas que tienen unas de especificidades de unión diferentes de las empleadas con frecuencia para la inhibición del agente patógeno, con preferencia *E. coli*, con mayor preferencia la *E. coli* diarreaica no secretora de toxinas o la *E. coli* causante de diarreas

menos graves. En una forma de ejecución preferida se emplean al menos tres tipos de receptor oligosacárido y con mayor preferencia todos los cuatro tipos frecuentes de receptor oligosacárido.

5 En otra forma de ejecución preferida, al menos uno de los tipos de receptor empleados es un globo-receptor. En otra forma de ejecución al menos uno de los tipos de receptor utilizados es un receptor de ácido siálico. Preferiblemente el receptor de ácido siálico y el globo-receptor se usan juntos, sobre todo con un Lacto-receptor o un Neolacto-receptor.

10 En otra forma de ejecución preferida se emplea un Lacto-receptor junto con un Neolacto-receptor y además con un globo-receptor o con un receptor de ácido siálico.

15 En otra forma de ejecución preferida se emplea un receptor de ácido siálico junto con un Neolacto-receptor o con un Lacto-receptor y opcionalmente con un globo-receptor. En una forma de ejecución preferida se usan conjuntamente los receptores oligosacáridos de tipo lácteo Lacto, Neolacto y ácido siálico.

20 La presente invención se refiere además al uso de cualquiera de las combinaciones preferidas de epítomos de unión frecuente con al menos una de las otras especificidades de unión, incluyendo los receptores de lactosilceramida, los receptores de manosa, los receptores de fucosilo y los ganglio-receptores. Según una forma de ejecución preferida, cualquiera de las combinaciones preferidas de receptores frecuentes se usa conjuntamente con los receptores de lactosilceramida.

En una forma de ejecución preferida, cualquiera de las combinaciones preferidas de receptores frecuentes se usa conjuntamente con los receptores de manosa.

25 En una forma de ejecución preferida, cualquiera de las combinaciones preferidas de receptores frecuentes se usa conjuntamente con los ganglio-receptores.

30 Los datos de la presente invención se obtuvieron principalmente utilizando numerosas cepas diferentes de *E. coli* causante de diarrea. La generalidad de los receptores intestinales se estudió adicionalmente según lo revelado con varios tipos de especies zoonóticas de *Helicobacter*. Los presentes inventores pudieron encontrar al menos cinco especificidades de unión coincidentes con las especificidades de *E. coli*, incluyendo receptores de lactosilceramida, Lacto-receptores, Neolacto-receptores, ganglio-receptores y receptores de ácido siálico. Es probable que estos receptores sean comunes en humanos y en muchos animales de compañía y de ganadería.

35 Receptores generales con actividad contra posibles agentes patógenos zoonóticos

40 Se revela que el grupo de receptores es preferiblemente de "receptores generales" en las diarreas con potencial zoonótico. La expresión más estable de los receptores generales fue la manifestada por los receptores basados en galactosa neutra. Entre esta familia, los receptores de lactosa/lactosamina forman una clase especial de receptores estructuralmente similares.

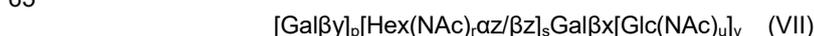
Se revela una composición terapéutica, en la cual al menos uno de dichos compuestos comprende una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos, seleccionada entre otro grupo de receptores de agentes patógenos:



50 donde p, r, s, u y v son independientemente 0 o 1, e y es la posición de enlace 3 o 4, x es la posición de enlace 3 o 4 y z es la posición de enlace 3 o 4, y Hex es Gal o Glc, de manera que
 cuando v es 1 y u es 0 x es 4,
 cuando v es 0 s es 1 y preferiblemente p también es 1,
 cuando s es 0 p también es 0 y v es 1,
 cuando p es 1 e y = 3 Hex es Gal β o Glc β and r = 1, o p es 1 e y = 4 y Hex es Glc β y r = 1, de manera que el
 55 Gal terminal va unido a GlcNAc β por β 3 o β 4 o a GalNAc β por β 3,
 cuando p es 0 y z es 4 Hex es Gal β y r es 1, de modo que la estructura monosacárida terminal es GalNAc β 4,
 o cuando p es 0 y z = 3 el extremo es HexNAc/Hexa/ β 3; cuando hay un Gal β 3/4 terminal no reductor, éste puede estar sustituido además con SA α 3/6, donde SA es un ácido siálico, preferiblemente NeuNAc, ácido N-acetilneuramínico, o NeuNGc, ácido N-glicolilneuramínico,
 60 preferiblemente junto con vehículos y coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Receptores generales a base de galactosa neutra, preferidos según la presente invención

Se revela que los receptores generales basados en galactosa β 3/4 incluyen estructuras según la fórmula:



donde p, r, s, u y v son independientemente 0 o 1, e y es la posición de enlace 3 o 4, x es la posición de enlace 3 o 4 y z es la posición de enlace 3 o 4, y Hex es Gal or Glc, de manera que

cuando v es 1 y u es 0 x es 4,

cuando v es 0 s es 1 y preferiblemente p también es 1,

cuando s es 0 p también es 0 y v es 1,

cuando p es 1 e y = 3 Hex es Gal β o Glc β and r = 1, o p es 1 e y = 4 y Hex es Glc β y r = 1, de manera que el Gal terminal va unido a GlcNAc β por β 3 o β 4 o a GalNAc β por β 3,

cuando p es 0 y z es 4 Hex es Gal β y r es 1, de modo que la estructura monosacárida terminal es GalNAc β 4, o cuando p es 0 y z = 3 el extremo es HexNAc/Hexa/ β 3.

Principales tipos de receptores generales revelados

La fórmula anterior se divide a la vez en unos grupos estructurales principales que incluyen

1. Receptores de carbohidratos del tipo lactosa/lactosamina

Este grupo comprende además receptores de lactosa y receptores de lactosamina que incluyen Lacto-receptores y Neolacto-receptores

2. Ganglio-receptores

3. Receptores de ácido siálico

Receptores generales preferidos de lactosa/lactosamina



donde p, r, s, u y v son independientemente 0 o 1, e y es la posición de enlace 3 o 4, x es la posición de enlace 3 o 4 y a es alfa o beta, y Hex es Gal o Glc, de manera que

cuando p es 1 Hex es Glc β y r = 1, cuando a es β (el Gal terminal va unido a GlcNAc β 3 por β 3 o β 4),

cuando p es 0 preferiblemente

Hex es Gal, r es 0 y a es alfa (la estructura terminal es Gala3) o

Hex es Glc, r es 1 y a es beta (la estructura terminal es GlcNAc β 3).

Se revela que los receptores generales de tipo lactosa/lactosamina tienen la fórmula:



en la cual p, s, u y v son independientemente 0 o 1, e y es la posición de enlace 3 o 4, x es la posición de enlace 3 o 4, de manera que

al menos p es 1 o v es 1,

cuando p es 1 s es 1,

cuando u es 0 y s es 0 y p es 0 x es 4 y el extremo reductor Glc va unido a una ceramida que incluye un ácido graso hidroxilado.

Se revela que los receptores generales de lactosa/lactosamina incluyen los tetrasacáridos de la leche humana Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc y Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc y lactosilceramidas. Las estructuras de lactosamina reveladas también incluyen secuencias oligosacáridas y oligosacáridos del grupo Gal β 4GlcNAc, Gal β 3GlcNAc, Gal β 4Glc, Gal β 4GlcNAc β 3Gal, Gal β 3GlcNAc β 3Gal y GlcNAc β 3Gal β 34Glc, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc y Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc.

Las ocho especificidades receptoras son útiles para el tratamiento efectivo de los agentes patógenos diarreicos emergentes y presentes. Si el patógeno no es *E. coli*, la presencia general de la unión a manosa está demostrada en los trabajos con Salmonella del estado técnico anterior. La presente invención permite predecir que la secuencia oligosacárida Gala4Gal, la cual incluye especificidades de unión e incluso las especificidades de unión del tipo de los receptores de fucosilo se encontrarán en agentes patógenos del intestino humano causantes de diarreas.

Al considerar conjuntamente los grupos de receptores preferidos, los Lacto-receptores y los Neolacto-receptores pertenecen a los receptores de primer contacto, receptores frecuentes y receptores generales, lo cual que el uso de los Lacto-receptores y los Neolacto-receptores y su uso combinado, sobre todo en formas activadas tales como LNT y LNnT, sea especialmente preferido según la presente invención.

Los presentes inventores identificaron ocho especificidades de unión diferentes para una gran cantidad de bacterias *E. coli* causantes de diarrea y varios receptores correspondientes en tejidos intestinales humanos. Las secuencias oligosacáridas incluyen una o varias de las secuencias oligosacáridas del receptor escogidas entre los siguientes grupos:

Ocho secuencias oligosacáridas distintas de receptores de los agentes patógenos intestinales

- a) Receptores de lactosilceramida: por ejemplo los que se unen a lactosilceramida e isoglobotriaosilceramida cuando las ceramidas llevan ácidos grasos hidroxilados.
- 5 b) Ganglio-receptores: por ejemplo los que se unen a gangliotriaosilceramida y gangliotetraosilceramida.
- c) Receptores Gala4Gal: por ejemplo los que se unen a galabiosaosilceramida, globotriaosilceramida, globotetraosilceramida y el glicoesfingolípido de Forssman.
- d) Lacto-receptores: por ejemplo los que se unen a lactotetraosilceramida.
- 10 e) Neolacto-receptores: por ejemplo los que se unen a neolactotetraosilceramida, neolactohexaosilceramida, NeuGca3-neolactohexaosilceramida y secuencias oligosacáridas que comprenden GlcNAcβ3Gal, especialmente GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc.
- f) Fucosil-receptores: por ejemplo los que se unen al Le^a-5 glicoesfingolípido.
- h) Receptores de ácido siálico: por ejemplo los que se unen a varias secuencias oligosacáridas con ácido siálico diferente, especialmente el ácido N-acetilneuramínico, NeuAcα, y/o el ácido N-glicolilneuramínico, NeuGca.
- 15 g) Receptores de manosa: representados por el neoglicolípido Manα3(Manα6)Man.

Secuencias oligosacáridas preferidas entre los grupos de receptores

20 La presente invención se refiere preferentemente al uso de un oligosacárido libre o de derivados del mismo que no sean glicolípidos, exceptuando los glicolípidos de lactosilceramida que llevan ácido graso hidroxilado, tal como se describe a continuación. En general los glicolípidos pueden difundirse a los tejidos y de hecho aumentan la unión del agente patógeno, y las formulaciones para prevenirla se consideran difíciles de producir. En las ceramidas de los glicolípidos de lactosilceramida según la presente invención el grupo hidroxilo permite un contacto más fuerte entre los glicolípidos, que los mantendría juntos más efectivamente, por ejemplo en formulaciones de tipo membrana, y evitaría su difusión al epitelio intestinal. Los conjugados polivalentes preferidos descritos por la presente invención no son neoglicoproteínas tales como los conjugados de albúmina, que son inmunógenos potentes y pueden usarse para provocar respuestas inmunológicas. Preferiblemente los conjugados polivalentes según la presente invención no son inmunógenos y preferiblemente no contienen proteínas o porciones peptídicas inmunógenas.

30 Receptores de lactosilceramida

Los receptores de lactosilceramida de la *E. coli* causante de diarrea dependen de la presencia de ácido graso hidroxilado en la ceramida. La presente invención se refiere al uso de lactosilceramidas que contienen ácidos grasos hidroxilados contra las infecciones por *E. coli*. Según la presente invención los receptores de lactosilceramida son moléculas que llevan un resto de lactosa, de forma que el resto de lactosilo va unido a una estructura de ceramida que comprende un tipo natural de ácido graso hidroxilado o, alternativamente, receptor de lactosilceramida se refiere a una estructura mimética de lactosilceramida en la cual el resto de lactosilo está unido a una estructura análoga de ceramida que comprende un grupo hidroxilo. El grupo hidroxilo del ácido graso hidroxilado o de la estructura análoga de ceramida forma preferentemente un enlace de hidrógeno con restos de Glc unidos a ceramida o a la estructura mimética de ceramida. La lactosilceramida o la estructura mimética se pueden sustituir en la posición 3 o 4 del resto Gal por secuencias oligosacáridas de tipo natural. Los glicolípidos de los receptores de lactosilceramida también incluyen glicolípidos de las series lacto y neolacto que contienen un ácido graso hidroxilado. En otras formas de ejecución la presente invención también se refiere al uso de glicolípidos de las series globo y ganglio que llevan un resto de lactosilo y un graso hidroxilado. La presente invención también se refiere al uso de análogos de secuencias oligosacáridas de las series lacto o neolacto unidas a la estructura mimética de ceramida que comprende el grupo hidroxilo. La presente invención también se refiere al uso de análogos de secuencias oligosacáridas de las series globo o ganglio unidas a una estructura mimética de ceramida que comprende el grupo hidroxilo. En una forma de ejecución preferida, la presente invención se refiere al uso de formas no sialiladas de receptores de lactosilceramida según la presente invención. Las formas de ejecución preferidas incluyen moléculas conforme a la siguiente fórmula



donde x es la posición de enlace 3 o 4,

R₂ es una ceramida o un análogo de ceramida que comprende un ácido graso hidroxilado y

55 R₁ es Galα, Galβ, GalNAcβ, GlcNAcβ o un oligosacárido más largo que comprende uno de estos restos en el extremo reductor o Neu5Xα, donde X es Ac o Gc, con la condición de que, si R₂ es GlcNAcβ o Neu5Xα, x es 3.

La presente invención se refiere a sustancias y composiciones que llevan conjugados polivalentes de los receptores de lactosilceramida y particularmente los conjugados polivalentes de una estructura mimética de lactosilceramida según la presente invención. Se prefieren especialmente los conjugados polivalentes de estructuras miméticas de lactosilceramida cuando la lactosilceramida o la estructura mimética de lactosilceramida está unida a un polisacárido, opcionalmente por medio de un grupo espaciador. En una forma de ejecución específica se prefiere usar conjugados polivalentes en vez de glicolípidos de lactosilceramida. El uso de glicolípidos es más difícil porque hay que evitar la difusión de los receptores a los tejidos. No obstante la prevención se puede conseguir, por ejemplo, incorporando los glicolípidos a una matriz médica de carbono o a una membrana estable o a estructuras micelares.

Se comprueba que un solo receptor de lactosilceramida puede presentar dos o incluso tres o más especificidades de unión al receptor, de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también se refiere al uso de lactosilceramida que comprende ácidos grasos hidroxilados y a análogos y derivados de ella para la terapia de enfermedades gastrointestinales, en particular las diarreas y más en concreto las diarreas causadas por bacterias *E. coli*. En formas de ejecución preferidas la infección es causada por ETEC, EPEC, EHEC, EIEC o EAEC, con mayor preferencia por EHEC, EIEC o EAEC. En una forma de ejecución preferida la presente invención se refiere al uso de una fracción de leche que contiene lactosilceramida, en la cual hay contenido un ácido graso hidroxilado. La leche es preferentemente de un animal de granja tal como una vaca o cualquier otro animal productor de leche con lactosilceramida que lleve un ácido graso hidroxilado. El estado técnico anterior referido anteriormente se ha dirigido al uso de algunos glicolípidos de la leche, pero no advierte la utilidad de los glicolípidos que llevan ácido graso hidroxilado contra las bacterias *E. coli* causantes de diarrea. Los receptores de lactosilceramida conforme a la presente invención son especialmente útiles para productos alimenticios o piensos funcionales como aditivos nutricionales.

Ganglio-receptores

Se revela que las series de ganglio-receptores comprenden secuencias oligosacáridas según la fórmula



donde $n1$, $n2$ y $n3$ son independientemente el número entero 0 o 1, preferiblemente con la condición de que al menos $n1$ o $n3$ sea 1 y con la condición de que no haya ningún ácido siálico unido a la secuencia oligosacárida.

Las secuencias oligosacáridas reveladas son $\text{Gal}\beta 3 \text{GalNAc}\beta 4 \text{Gal}\beta 4 \text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 3 \text{GalNAc}\beta 4 \text{Gal}$, $\text{Gal}\beta 3 \text{GalNAc}$, $\text{GalNAc}\beta 4 \text{Gal}$ y $\text{GalNAc}\beta 4 \text{Gal}\beta 4 \text{Glc}$. Incluso la secuencia oligosacárida GM1 se puede usar según la presente invención en nuevas terapias combinadas, pero es menos preferida por la complejidad de su estructura.

El análisis de una amplia variedad de series de gangliósidos y la comparación de estructuras en los ejemplos de la presente invención permite la determinación de $\text{Gal}\beta 3 \text{GalNAc}$ como una nueva secuencia de nuevos oligosacáridos receptores preferidos entre las secuencias oligosacáridas de las series de ganglio-receptores. Los datos indican que la $\text{Gal}\beta 3 \text{GalNAc}$ terminal de la secuencia GM1 también se puede unir a la *E. coli* causante de diarrea. La unión al disacárido terminal no ha sido demostrada con anterioridad y los epítomos tetrasacáridos se pueden emplear en formulaciones que permiten una presentación más efectiva del disacárido terminal. Según una forma de ejecución de la presente invención la $\text{Gal}\beta 3 \text{GalNAc}$ no se une preferiblemente a la lactosa por $\beta 4$. Por regla general el epítomo disacárido es más barato de producir que el epítomo tetrasacárido. Con mayor preferencia la secuencia oligosacárida es $\text{Gal}\beta 3 \text{GalNAc}\beta$, con la condición de que el epítomo disacárido no esté unido a lactosa o a $\text{Gal}\beta 3 \text{GalNAc}\beta 4 \text{Gal}$ y de que el extremo reductor Gal no esté unido a glucosa.

Los nuevos receptores gangliósidos comprenden el disacárido terminal $\text{Gal}\beta 3 \text{GalNAc}$, con la condición de que el disacárido no esté unido a lactosa por $\beta 4$. Por regla general el epítomo disacárido es más barato de producir que el epítomo tetrasacárido. Con mayor preferencia la secuencia oligosacárida es $\text{Gal}\beta 3 \text{GalNAc}\beta$, con la condición de que el epítomo disacárido no esté unido a lactosa o a $\text{Gal}\beta 3 \text{GalNAc}\beta 4 \text{Gal}$ y de que el extremo reductor Gal no esté unido a glucosa. El disacárido terminal y las secuencias tetrasacáridas no se han descrito anteriormente como receptores de las bacterias *E. coli* causantes de diarrea, ni como receptores de las bacterias EPEC. El empleo de disacáridos terminales se prefiere al de los receptores tetrasacáridos conocidos, debido a la síntesis más rentable.

Receptores $\text{Gal}\alpha 4 \text{Gal}$

Los epítomos revelados son $\text{Gala}4 \text{Gal}$, $\text{Gal}\alpha 4 \text{Gal}\beta 4 \text{Glc}$ y $\text{Gal}\alpha 4 \text{Gal}\beta 4 \text{GlcNAc}$. La presente invención también indica que las formas de las secuencias $\text{Gala}4 \text{Gal}$ sustituidas en 3', como el globósido y el antígeno de Forssman, pueden reconocerse de modo corriente. Los receptores $\text{Gala}4 \text{Gal}$ preferidos incluyen una o varias secuencias oligosacáridas según la fórmula



en la cual $n1$, $n2$ y $n3$ son independientemente el número entero 0 o 1, preferiblemente con la condición de que $n1$ sea 1 o $n3$ sea 1 y el resto GalNAc esté además opcionalmente sustituido por otro monosacárido o por restos de oligosacáridos, preferiblemente similares a secuencias oligosacáridas naturales como las del antígeno de Forssman. Los receptores oligosacáridos más preferidos son $\text{Gala}4 \text{Gal}$, $\text{Gal}\alpha 4 \text{Gal}\beta 4 \text{Glc}$ y $\text{Gal}\alpha 4 \text{Gal}\beta 4 \text{GlcNAc}$, ya que son más sencillos de producir por síntesis; se prefiere especialmente el disacárido $\text{Gala}4 \text{Gal}$ y las secuencias oligosacáridas a base de pectina según la presente invención u otras secuencias oligosacáridas naturales análogas, tales como la secuencia oligosacárida existente en la planta oca.

Lacto-receptores

Se revela que los receptores de las lactoseries comprenden uno o varias secuencias oligosacáridas según la fórmula



10 donde n_1 , n_2 y n_3 son independientemente el número entero 0 o 1. En formas de ejecución preferidas al menos n_3 es 1. Las secuencias oligosacáridas más preferidas, citadas aquí como receptores de gran afinidad, incluyen las secuencias oligosacáridas $\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}$, $\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$ y $\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}$. El uso de lactotetraosa $\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$, opcionalmente junto con otro oligosacárido tal como $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ y/o $\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ y/o $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$, se prefiere especialmente para usos terapéuticos y en particular para productos alimenticios, piensos y otros usos nutricionales.

15 Se revela que la secuencia completa de LNT $\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ se usa preferiblemente para la inhibición efectiva de la unión a Lacto. Los datos de los ejemplos aclararon que el epítipo disacárido $\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}$, propuesto en el estado técnico anterior, no podía mantener por sí solo una unión análogamente efectiva como el epítipo del respectivo glicolípido, cuando el epítipo de unión fue bloqueado por $\beta 6\text{-GlcNAc}$ en una estructura neoglicolípida. Se revela el empleo de $\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ como inhibidor monovalente e inhibidor polivalente soluble de *E. coli* causante de diarrea. Se advierte que la sustancia puede ser útil, incluso como sustancia única, ya que constituye una especificidad de unión frecuente.

Neolacto-receptores

25 Se revela que los receptores de las neolactoseries comprenden uno o varias secuencias oligosacáridas según la fórmula



30 donde n_1 , n_2 , n_3 y n_4 son independientemente el número entero 0 o 1; cuando n_1 es 1, el GlcNAc terminal no reductor de esta fórmula también puede estar sustituido por otro resto de monosacárido o restos de oligosacáridos, preferiblemente por $\text{Gal}\beta 4$ o por $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4$. Preferiblemente al menos n_4 es 1 o n_1 es 1. Las secuencias oligosacáridas más preferidas, señaladas aquí como receptores de gran afinidad, comprenden las secuencias oligosacáridas $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$, $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}$, $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$, $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$, $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ y $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$. Las estructuras preferidas de $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$ incluyen secuencias oligosacáridas unidas por $\beta 6$ a partir del extremo reductor, sobre todo $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 6\text{Gal}$, $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 6\text{GalNAc}$, $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 6\text{GlcNAc}$, $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 6\text{Glc}$ y $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 6\text{Man}$. Se revela que el empleo de neolactotetraosa $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ se prefiere especialmente para usos terapéuticos y en particular para productos alimenticios, piensos y otros usos nutricionales.

45 Se revela que la secuencia completa de LNnT $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ se usa preferiblemente para la inhibición efectiva de la unión a Neolacto. Los datos de los ejemplos demostraron que el epítipo disacárido $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$, propuesto en el estado técnico anterior, no podía mantener por sí solo una unión efectiva. El $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3(\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 6)\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$ ramificado no pudo mantener la unión, a pesar de tener dos de los epítopos disacáridos, pues la galactosa central está bloqueada por la ramificación. Al cambiar el epítipo de unión por una estructura $\beta 6$ en los neoglicolípidos $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ a $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 6\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$, la unión también fue muy débil. Se revela el empleo de $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ y $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ como inhibidores monovalentes e inhibidores polivalentes solubles de *E. coli* causante de diarrea. Se advierte que la sustancia puede ser útil, incluso como sustancia única, ya que constituye una especificidad de unión frecuente.

50 Una forma de ejecución preferida de la presente invención se refiere a los usos de secuencias de unión a neolacto que incluyen estructuras terminales tales como $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$ y $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$. Se revela que la secuencia disacárida terminal $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}$ también se puede usar conforme a la presente invención, aunque con menor actividad.

55 Se revela que las poli-N-acetil-lactosaminas lineales unidas por $\beta 3$, $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}[\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}]_n\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$, en las que n es un número entero $n > 1$, son receptores de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea; el Gal terminal se puede sustituir por otros restos de monosacáridos, por ejemplo $\text{Neu5X}\alpha 3$ o $\text{GlcNAc}\beta 3$. Los inhibidores monovalentes preferidos comprenden $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$, descrito a partir de la leche de búfala, el oligosacárido de la leche corriente $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ y mezclas que comprenden $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ y $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$.

Receptores de fucosilo

65 Se revela que los receptores de fucosilo comprenden una o varias secuencias oligosacáridas según la fórmula



en la cual n_1 , n_2 y n_3 son independientemente el número entero 0 o 1. Se revela que n_3 es 1. Se revelan las secuencias $\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$ y $\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$.

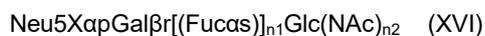
El uso del pentasacárido Lewis a $\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ se prefiere especialmente para usos terapéuticos y en particular para productos alimenticios, piensos y otros usos nutricionales.

Receptor de ácido siálico

En el sentido más amplio el receptor de ácido siálico puede ser cualquier tipo de ácido siálico en glicoconjugados de tipo natural. El ácido siálico es preferiblemente ácido N-glicolil-neuramínico o ácido N-acetilneuramínico.

La presente invención reconoce el ácido siálico específico capaz de unirse efectivamente a los agentes patógenos causantes de diarrea, en particular a las bacterias *E. coli* causantes de diarrea.

Se revelan secuencias oligosacáridas receptoras de ácido siálico según la fórmula



donde X es independientemente Ac o Gc, lo cual significa que el ácido siálico es Neu5Ac or Neu5Gc, n_1 y n_2 son 0 or 1, p es la posición de enlace 3 or 6,

r y s son las posiciones de enlace 3 or 4, con la condición de que cuando r es 3 s es 4 y cuando r es 4 s = 3. Se

revelan secuencias oligosacáridas que incluyen una o varias del siguiente grupo: Neu5X α 3Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc,

y Neu5X α 3Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc, Neu5X α 3Gal β 4(Fuc α 3)Glc, Neu5X α 3Gal β 3GlcNAc, Neu5X α 3Gal β 4GlcNAc,

Neu5X α 3Gal β 4Glc y Neu5X α 6Gal β 4GlcNAc, Neu5X α 6Gal β 4Glc, en las que X es Ac o Gc. Se revela el uso de

uno o varios oligosacáridos de tipo lácteo tales como Neu5X α 3Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc, Neu5X α 3Gal β 4Glc

NAc β 3Gal β 4Glc, hexasacárido sialil-Lewis a Neu5X α 3Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc o hexasacárido sialil-

Lewis x Neu5X α 3Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc β 3Gal β 4Glc o sialil-lactosas Neu5X α 3Gal β 4(Fuc α 3)Glc, Neu5X α 3Gal β 4Glc

Neu5X α 6Gal β 4Glc para usos terapéuticos y en particular para productos alimenticios, piensos y otros usos

nutricionales. Si las secuencias oligosacáridas son para uso humano, se revela el empleo de un tipo humano de

oligosacáridos naturales en los cuales X es Ac y Neu5X es por tanto Neu5Ac. Se revela que, para inhibir con

mayor eficacia las cepas de reacción cruzada entre humanos y animales, X es Gc y el ácido siálico es NeuGc.

Se revelan las especificidades exactas de unión de ácido siálico a las sialil-lactosas Neu5X α 3Gal β 4Glc, Neu5X α 6Gal β 4Glc, a las sialil-lactosaminas Neu5X α 3Gal β 4GlcNAc, Neu5X α 6Gal β 4GlcNAc y a sus formas alargadas Neu5X α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, Neu5X α 6Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, que no habían sido identificadas anteriormente. La presente invención también demostró la inhibición efectiva de las especificidades de unión a unas concentraciones razonables bajas de oligosacáridos.

En otra forma de ejecución, la presente invención se refiere específicamente al uso de Neu5X α 3-sialil-lactosa o sialil-lactosamina, especialmente Neu5X α 3Gal β 4Glc, Neu5X α 3Gal β 4GlcNAc, Neu5X α 6Gal β 4GlcNAc y Neu5X α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc para inhibir la *E. coli* causante de diarrea. En otra forma de ejecución, la presente invención se refiere específicamente al empleo de Neu5X α 6-sialil-lactosa o sialil-lactosamina, en particular de Neu5X α 6Gal β 4Glc,

Neu5X α 6Gal β 4GlcNAc y Neu5X α 6Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc para inhibir la *E. coli* causante de diarrea. Sobre todo se

prefieren las estructuras Neu5X α 6 por su gran actividad. En una forma de ejecución concreta se usan oligosacáridos

que contienen NeuNAc, porque se hallan como secuencia natural en humanos y en la leche humana. En otra forma

de ejecución se usan oligosacáridos que contienen NeuGc. Se prefieren especialmente los sialil-oligosacáridos de

leches animales, en particular las sialil-lactosas y el Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc de la leche bovina; también se prefiere

una fracción purificada que contiene cantidades incrementadas de uno o varios de los sialil-oligosacáridos de leche

bovina. Se prefiere especialmente una fracción que contiene estructuras Neu5X α 6. La presente invención advierte

por primera vez la utilidad de los sialil-oligosacáridos contra la diarrea humana, especialmente las diarreas según la

invención, especialmente las causadas por *E. coli*. Se comprende que los sialil-oligosacáridos también se pueden

usar como sustancias únicas o en mezclas con otras.

Se advierte que los sialil-oligosacáridos son inhibidores monovalentes útiles de *E. coli* y que se pueden usar como conjugados polivalentes solubles. Los oligosacáridos de ácido siálico se pueden usar para inhibir la *E. coli* atóxica.

Se revelan composiciones que contienen secuencias del tipo de ácido polisialico, incluyendo preferiblemente la secuencia oligosacárida Neu5NAc α 8NeuNAc, denominadas aquí composiciones de ácido polisialico. Las secuencias

de ácido polisialico en las composiciones de ácido polisialico pueden comprender adicional o alternativamente la

secuencia oligosacárida Neu5NAc α 9NeuNAc. Se revela que la secuencia de ácido polisialico no se encuentra en

una secuencia de tipo glicolípido. Se revela que la sustancia de ácido polisialico que comprende las secuencias

oligosacáridas Neu5NAc α 8NeuNAc y/o Neu5NAc α 9NeuNAc también cumple los siguientes criterios:

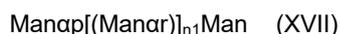
1. al menos el 95% de los oligosacáridos de ácido siálico tienen como mínimo una longitud de diez restos de ácido siálico o
2. al menos el 95% de los oligosacáridos de ácido siálico tienen como mínimo una longitud de tres restos de ácido siálico o
3. al menos el 95% de los oligosacáridos de ácido siálico tienen una longitud inferior a diez restos de ácido siálico y preferiblemente se trata de una composición de oligosacáridos que lleva al menos un 95% de oligosacáridos de ácido siálico cuya longitud es inferior a cinco restos de ácido siálico o
4. al menos 80% de los oligosacáridos de ácido siálico tienen como mínimo una longitud de dos restos de ácido siálico, pero inferior a seis restos de ácido siálico.

Los polisacáridos de ácido polisialico o los oligosacáridos/precusores para la producción de oligosacáridos pueden ser generados por bacterias, por ejemplo por *E. coli* productora de ácido colónico. Las sustancias oligosacáridas del tipo de ácido polisialico comprenden las secuencias oligosacáridas Neu5NAc α 8NeuNAc y/o Neu5NAc α 9NeuNAc; preferiblemente las secuencias oligosacáridas del tipo de ácido polisialico contienen oligosacáridos terapéuticos que llevan las secuencias oligosacáridas Neu5NAc α 8NeuNAc y/o Neu5NAc α 9NeuNAc. Las sustancias oligosacáridas del tipo de ácido polisialico comprenden preferiblemente dos hasta diez restos de ácido siálico.

La presente invención también se refiere a sustancias oligosacáridas del tipo de ácido polisialico o a composiciones de ácido polisialico para usos terapéuticos o como medicamentos. Las sustancias y las composiciones se destinan especialmente a usos terapéuticos no vacunales y a medicamentos. La presente invención también se refiere al uso de sustancias oligosacáridas del tipo de ácido polisialico para preparar medicamentos y composiciones terapéuticas contra las diarreas y a composiciones para usos *ex vivo*, tal como se describe en la presente invención.

Receptor de manosa

Se revelan estructuras ManaMan.
Se revelan secuencias oligosacáridas receptoras de manosa según la fórmula



donde n es independientemente 0 o 1, p y r son las posiciones de enlace 3 o 6 entre los restos Man, con la condición de que cuando p es 3 r es 6 y cuando p es 6 r es 3. Se revela que las secuencias oligosacáridas receptoras de manosa incluyen las estructuras: Man α 3(Man α 6)Man y Man α 3Man. Se revela que la secuencia de oligosacáridos es Man α 3Man β 4GlcNAc o Man α 3Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc. En una forma de ejecución preferida, el resto del extremo reductor Man α 3(Man α 6)Man se halla en forma de cadena abierta, en forma reducida o en forma de cadena abierta modificada, por ejemplo mediante aminación reductora para obtener un espaciador o vehículo. Se revela el uso de una secuencia oligosacárida que lleva manano o fosfomanano. El manano o fosfomanano incluye preferiblemente manosa unida por enlace α . El manano o fosfomanano procede preferiblemente de una levadura inocua como la de panadería (*S. cerevisiae*).

Resultados sobre las especificidades de unión de las especies de Helicobacter causantes de diarrea

El principal objetivo de la presente invención es proporcionar terapias para las diarreas causadas por diversos tipos de agentes patógenos. Se revelan especies de *Helicobacter* causantes de diarrea para encontrar tipos de receptores que podrían ser compartidos con tipos de bacterias totalmente diferentes y que incluso podrían estar implicados en infecciones zoonóticas propagadas por otras especies. Las especies zoonóticas de *Helicobacter* son objetivos para desarrollar también terapias animales, sobre todo para prevenir las infecciones zoonóticas. Se revelan unas clases especiales de receptores que están relacionados con el riesgo de infecciones zoonóticas. Estos incluyen una familia de receptores basados en galactosa con posibles modificaciones de ácido siálico.

También se revelan especies de *Helicobacter* no *H. pylori*, especialmente las de las infecciosas enterohepáticas que causan diarreas y enfermedades hepáticas. Estas bacterias, llamadas *zHelicobacter* (*zHelicobacterias* en plural), suelen ser zoonóticamente activas e infectan tanto a los humanos como a los animales, por ejemplo al ganado y a las mascotas, preferentemente a los gatos y perros como animales de compañía. Se revela el tratamiento de las infecciones gástricas causadas por *zHelicobacterias*. El estado técnico anterior se refiere a diferentes especies de bacterias gástricas tales como *H. pylori*, *H. mustelae* (un agente patógeno gástrico no zoonótico de los hurones) y varias especies distintas de las *Helicobacter* que infectan el tracto intestinal, por ejemplo varios tipos de *Escherichia coli* causantes de diarreas. Las distintas especies de bacterias tienen especificidades de unión diferentes y los receptores de *zHelicobacterias* no son conocidos del estado técnico anterior. Entre las bacterias que infectan distintas regiones del tracto gastrointestinal o las que pertenecen a familias totalmente diferentes como *Helicobacter* y *E. coli* cabría esperar diferencias especialmente grandes. Se revela que los perfiles de especificidad de unión son distintos entre *zHelicobacter* y *H. pylori*. Las bacterias zoonóticas revelan un grupo específico de receptores de las mismas.

El grupo de *zHelicobacter* no incluye la especie *Helicobacter pylori* específicamente humana. La presente invención tampoco se refiere a la infección de hurones por *H. mustelae*, ya que no es una infección de un animal de compañía

o del ganado con riesgo de zoonosis por contacto con humanos. Las *zHelicobacterias* están infectando a humanos y/o preferentemente animales de compañía y humanos, y tienen capacidad zoonótica para infectar a humanos, sobre todo a personas con un sistema inmunitario débil. También se revela aquello que caracteriza las especificidades de unión de *zHelicobacter* a los carbohidratos, pues son capaces de mediar en las acciones infecciosas entre especies de bacterias.

Resumen de resultados

Se revelan las especificidades de unión analizadas de varias especies de *zHelicobacter* respecto a una biblioteca de glicolípidos en un ensayo de cromatografía sobre capa fina.

Se ha determinado anteriormente que tanto *H. pylori* como *H. mustelae* se unen a gangliotetraosilceramida. La unión ha sido demostrada para *H. felis*, *H. canis* y *H. hepaticus* y *H. bilis* (tabla 3). Además, en común con *H. pylori*, hemos encontrado que las *Helicobacter* spp. ensayadas, tanto gástricas como enterohepáticas, fueron capaces de unirse a lactotetraosilceramida, lactosilceramida con fitoesfingosina y/o ácidos grasos hidroxilados e isoglobotriaosilceramida. En cambio la unión al glicoesfingolípido Le^b solo se observó para *H. pylori* CCUG 17875 (tabla 3).

La unión de ciertas cepas de *H. pylori* a gangliósidos de migración lenta en la porción ácida de los glicoesfingolípidos de granulocitos humanos depende del ácido siálico (Miller-Podraza y otros, 1999) y por tanto esta porción se utilizó para el reconocimiento de ácido siálico. Las estructuras sialiladas de los granulocitos humanos son principalmente NeuNAcα3Gal y NeuNAcα6Gal. La unión a esta porción se observó para *H. hepaticus* CCUG 33637 (ejemplificada en la fig. 4B, banda 1) y para *H. pylori* CCUG 17874, y ocasionalmente para *H. mustelae* CCUG 25715 (tabla 3). La capacidad de unión al ácido siálico ensayada con otras sustancias también la tienen algunas especies de *H. bilis*.

Además se observó que las especies de *zHelicobacter* se unían a un glicolípido de polilactosamina. El epítipo de unión se encuentra en la cadena principal de polilactosamina, ya que la eliminación del terminal específico no afecta esencialmente a la unión.

La presente invención observó que las especificidades de los carbohidratos también se podían reconocer mediante otros varios métodos, además de los ensayos de glicolípidos. La unión se pudo observar en ensayos con el empleo de glicoconjugados de tipo proteico, incluso en ensayos tradicionales de tipo celular basados en células de varias especies. Estos ensayos dan resultados que corrobora el análisis de glicolípidos.

Estructuras de carbohidratos preferidas de receptores basados en β-galactosa para usar contra infecciones zoonóticas de zHelicobacter

Se revela que la especificidad de unión más corriente del perfil del receptor de especies de *Helicobacter* basado en galactosa β3/4 incluye estructuras según la fórmula:



en la cual p, r, s, u y v son independientemente 0 o 1 e y es la posición de enlace 3 o 4, x es la posición de enlace 3 o 4 y z es la posición de enlace 3 o 4, y Hex es Gal o Glc, de manera que

cuando v es 1 y u es 0 x es 4,
cuando v es 0 s es 1 y preferiblemente p también es 1,
cuando s es 0 p también es 0 y v es 1,
cuando p es 1 e y = 3 Hex es Galβ o Glcβ y r = 1, o p es 1 e y = 4 y Hex es Glcβ y r = 1, de manera que el Gal terminal está unido a GlcNAcβ por β3 o β4 o a GalNAcβ unido por β3,
cuando p es 0 y z es 4 Hex es Galβ y r es 1, de manera que la estructura monosacárida terminal es GalNAcβ4, o p = 0 y z = 3, de manera que el terminal es HexNAc/Hexα/β3,
cuando hay un terminal no reductor Galβ3/4, éste puede estar además sustituido por SAα3/6, donde SA es un ácido siálico, preferiblemente NeuNAc, ácido N-acetilneuramínico.

Receptores basados en β-galactosa, una fórmula combinada:

Se revela que los receptores basados en galactosaβ3/4 corresponden colectivamente a una secuencia oligosacárida según la fórmula



en la cual p, r, s, u y v son independientemente 0 o 1 e y es la posición de enlace 3 o 4, x es la posición de enlace 3 o 4 y z es la posición de enlace 3 o 4 o 6, y Hex es Gal, Glc o SA (ácido siálico), de manera que

cuando v es 1 y u es 0 x es 4,
cuando v es 0 s es 1 y preferiblemente p también es 1,

cuando s es 0 p también es 0 y v es 1,
 cuando p es 1 e y = 3 Hex es Gal β o Glc β y r = 1, o p es 1 e y = 4 y Hex es Glc β y r = 1 (el Gal terminal está unido a GlcNAc β por β 3 o β 4 o a GalNAc β unido por β 3),
 cuando Hex es SA z es 3 o 6, preferiblemente 3,
 cuando p es 0 y z es 4 Hex es Gal β y r es 1 (la estructura monosacárida terminal es GalNAc β 4), o p = 0 y z = 3 (el terminal es HexNAc/Hexa/ β 3), o
 Hex es SA, z es 3 o 6 y la estructura terminal es SAa3Gal o SAa6Gal.

Se revela que la actividad del receptor tipo Gal β es una secuencia oligosacárida neutra que no incluye ácido siálico. Según una forma de ejecución el p terminal = 0, Hex es ácido siálico (SA), preferiblemente NeuNAc (ácido N-acetilneuramínico) unido por α 3 o α 6.

Receptores basados en galactosa neutra preferidos según la presente invención

Se revela que la especificidad de unión más corriente del perfil del receptor de especies de *zHelicobacter* basado en galactosa β 3/4 incluye estructuras según la fórmula:



en la cual p, r, s, u y v son independientemente 0 o 1 e y es la posición de enlace 3 o 4, x es la posición de enlace 3 o 4 y z es la posición de enlace 3 o 4, y Hex es Gal o Glc, de manera que
 cuando v es 1 y u es 0 x es 4,
 cuando v es 0 s es 1 y preferiblemente p también es 1,
 cuando s es 0 p también es 0 y v es 1,
 cuando p es 1 e y = 3 Hex es Gal β o Glc β y r = 1, o p es 1 e y = 4 y Hex es Glc β y r = 1, de manera que el Gal terminal está unido a GlcNAc β por β 3 o β 4 o a GalNAc β unido por β 3,
 cuando p es 0 y z es 4 Hex es Gal β y r es 1, de manera que la estructura monosacárida terminal es GalNAc β 4, o p = 0 y z = 3, de manera que el terminal es HexNAc/Hexa/ β 3.

Principales tipos de receptor según la presente invención

La fórmula anterior se divide a la vez en unos grupos estructurales principales que incluyen

- 4. Receptores de carbohidratos del tipo lactosa/lactosamina
 Este grupo comprende también receptores de lactosa y receptores de lactosamina, incluyendo Lacto-receptores y Neolacto-receptores
- 5. Ganglio-receptores
- 6. Receptores de ácido siálico

Receptores del tipo lactosa/lactosamina preferidos para *Helicobacter*

Se revela



en la cual p, r, s, u y v son independientemente 0 o 1 e y es la posición de enlace 3 o 4, x es la posición de enlace 3 o 4 y a es alfa o beta, y Hex es Gal o Glc, de manera que
 cuando p es 1 Hex es Glc β y r = 1, y a es β (el Gal terminal está unido a GlcNAc β 3 por β 3 o β 4),
 cuando p es 0 preferiblemente
 Hex es Gal, r es 0 y a es alfa (la estructura terminal es Gala3) o
 Hex es Glc, r es 1 y a es beta (la estructura terminal es GlcNAc β 3).

Se revela que los receptores de tipo lactosa/lactosamina para *zHelicobacter* corresponden a la fórmula:



en la cual p, s, u y v son independientemente 0 o 1 e y es la posición de enlace 3 o 4, x es la posición de enlace 3 o 4, de manera que
 al menos p es 1 o v es 1,
 cuando p es 1 s es 1,
 cuando u es 0 x es 4 y el extremo reductor Glc está preferiblemente unido a hidroxilo.

Se revela que las estructuras de lactosa/lactosamina incluyen los tetrasacáridos de leche humana Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc y Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc y lactosilceramidas.

Se revela que las estructuras de lactosamina también incluyen secuencias oligosacáridas y oligosacáridos del grupo Gal β 4GlcNAc, Gal β 3G1cNAc, Gal β 4Glc, Gal β 4GlcNAc β 3Gal, Gal β 3GlcNAc β 3Gal y GlcNAc β 3Gal β 4Glc, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc y Gal β 3G1cNAc β 3Gal β 4GlcNAc.

5 Los cinco subgrupos de receptores para la prevención de agentes patógenos, especialmente *zHelicobacter*

- a) Receptores de lactosa
- b) Lacto-receptores
- c) Neolacto-receptores
- 10 d) Ganglio-receptores
- e) Receptores de ácido siálico

Se revela el uso de los cinco tipos de receptor en combinaciones, empleando al menos 2 de ellos. Se revela el uso de cualquiera de los subtipos de receptor junto con otro tipo de receptor. Se revela el uso de un receptor de lactosa junto con un receptor de lactosamina y/o un ganglio-receptor y/o un receptor de ácido siálico. Se revela el uso de un receptor de lactosa/lactosamina junto con un ganglio-receptor y/o un receptor de ácido siálico.

Se revela una composición terapéutica que incluye una fracción o fracciones purificadas de al menos un compuesto y en otras formas de ejecución de al menos dos o al menos tres compuestos que son o contienen una secuencia de oligosacáridos inhibidora de agentes patógenos. Cuando se usan varias secuencias oligosacáridas, éstas se eligen preferiblemente entre al menos dos – y se revela que al menos dos – de los grupos de receptores de agentes patógenos arriba descritos.

20 Receptores de lactosa

En el sentido más amplio los receptores de lactosa son estructuras que comprenden la secuencia oligosacárida Ga1 β 4G1c. En una forma de ejecución preferida los receptores de lactosa son receptores de lactosilceramida en los cuales la estructura de lactosa va unida a una ceramida. Con mayor preferencia hay una estructura de ácido graso hidroxilado presente en la ceramida. Se revela el uso de receptores de lactosa, especialmente de lactosilceramidas que contienen ácidos grasos hidroxilados, contra las infecciones de *zHelicobacter*.

Los receptores de lactosilceramida según la presente invención son una molécula que incluye un resto de lactosa, en la cual el radical lactosilo está unido a una estructura de ceramida que comprende un tipo natural de ácido graso hidroxilado o, alternativamente, receptor de lactosilceramida se refiere a una estructura mimética de lactosilceramida en la cual el radical lactosilo está unido a una estructura análoga de ceramida que lleva un grupo hidroxilo. El grupo hidroxilo del ácido graso hidroxilado o de la estructura mimética de lactosilceramida forma con preferencia un enlace de hidrógeno con los restos Glc unidos a la ceramida o a la estructura mimética de ceramida. La lactosilceramida o la estructura mimética pueden ir sustituidas en la posición 3 o 4 del resto Gal con secuencias oligosacáridas de tipo natural. Los glicolípidos receptores de lactosilceramida también incluyen glicolípidos de las series lacto y/o neolacto que comprenden un ácido graso hidroxilado. En otras formas de ejecución la presente invención también se refiere al uso de glicolípidos de las lacto- y/o neolacto- y/o ganglioseries que contienen un radical lactosilo y un ácido graso hidroxilado. La presente invención también se refiere al uso de análogos de secuencias oligosacáridas de las lacto- o neolactoseries unidas a la estructura mimética de ceramida que lleva ácido graso hidroxilado. La presente invención también se refiere al uso de análogos de secuencias oligosacáridas de ganglioseries unidas a la estructura mimética de ceramida que lleva ácido graso hidroxilado. En una forma de ejecución preferida la presente invención se refiere al uso de formas no sialiladas de los receptores de lactosilceramida conforme a la presente invención. Se revelan moléculas según la fórmula siguiente



50 donde x es la posición de enlace 3 o 4,

R₂ es una ceramida o un análogo de ceramida que llevan un ácido graso hidroxilado y

R₁ es Gala, Gal β , GalNAc β , GlcNAc β o un oligosacárido más largo que comprende uno de estos restos en el extremo reductor o Neu5X α , preferiblemente con la condición de que si R₁ es GlcNAc β o Gala o Neu5X α , x es 3 y Neu5X es ácido siálico, preferiblemente Neu5Ac o Neu5Gc.

La presente invención se refiere asimismo a sustancias y composiciones que contienen conjugados polivalentes de receptor de lactosa según la presente invención y en particular conjugados polivalentes de una estructura mimética de lactosilceramida de acuerdo con la presente invención. Se prefieren especialmente los conjugados polivalentes de estructuras miméticas de lactosilceramida cuando la lactosilceramida o la estructura mimética de lactosilceramida están unidas a un polisacárido, opcionalmente mediante un grupo espaciador. En una forma de ejecución específica se prefiere el uso de conjugados polivalentes al uso de glicolípidos de lactosilceramida. El uso de glicolípidos es más difícil ya que es necesario evitar la difusión de los receptores hacia los tejidos. No obstante, la prevención se puede conseguir, por ejemplo, incorporando los glicolípidos a la matriz médica de carbono, a una membrana estable o a estructuras micelares.

Se observa que un único receptor de lactosilceramida puede presentar dos o incluso tres o más especificidades de unión según la presente invención al receptor.

La presente invención también se refiere al uso de lactosilceramida que comprende ácidos grasos hidroxilados y análogos y derivados de los mismos para la terapia de enfermedades gastrointestinales, sobre todo diarreas. En una forma de ejecución preferida la presente invención se refiere al uso de una fracción láctea que lleva lactosilceramida con contenido de ácido graso hidroxilado. La leche es preferentemente de un animal de granja, tal como una vaca o cualquier otro animal productor de leche con lactosilceramida que contenga un ácido graso hidroxilado. El estado técnico anterior discutido anteriormente se ha referido al uso de algunos glicolípidos lácteos, pero no ha advertido la utilidad de los glicolípidos que llevan ácido graso hidroxilado contra las bacterias *zHelicobacter* causantes de diarrea. Los receptores de lactosilceramida según la presente invención son especialmente útiles para productos alimenticios o piensos funcionales como aditivos nutricionales.

Uso de secuencias oligosacáridas parciales

Definición de las especificidades más importantes de unión a carbohidratos respecto a la cascada natural de infección

Como se describe a continuación, cualquier especificidad o especificidades de los carbohidratos existentes sobre la superficie de una célula patógena se pueden usar para inhibir la unión de un agente patógeno, por ejemplo mediante las carbohidrasas polivalentes solubles reveladas. No obstante, se prefieren especialmente como diana aquellas especificidades de unión a carbohidratos que están dirigidas a los receptores relevantes sobre el tejido infectado.

Este es un método preferido cuando se emplean sustancias monovalentes según la presente invención. Cuando se usan conjugados polivalentes solubles y las especificidades de carbohidratos más relevantes para la inhibición de una célula patógena, el conjugado polivalente o incluso oligovalente no necesita ser tan grande como los conjugados que se utilizan para lograr la inhibición estérica de otras interacciones del receptor según la presente invención. La presente invención muestra diversas estructuras nuevas de receptores de carbohidratos en las glicoproteínas del intestino humano y las conecta con las especificidades de unión demostradas por los ensayos. En algunos casos se ha descrito la especificidad de unión de una determinada *E. coli* intestinalmente patógena, pero solo la presente invención indica su importancia para las infecciones identificando los sacáridos receptores naturales en el intestino humano. En unos pocos casos, la combinación de las estructuras receptoras y la posible unión se han indicado en cierto modo por separado. Sin embargo, en estos casos, la identificación de potenciales receptores y especificidades de unión permite diseñar secuencias de oligosacáridos receptores más efectivas.

Especificidades de unión a carbohidratos más importantes del intestino humano

El análisis de las glicoproteínas del intestino humano reveló inesperadamente varias estructuras interesantes de receptores de carbohidrato. La combinación de datos de unión bacteriana y la presencia de receptor permite definir las estructuras terapéuticas y diagnósticas biológicamente más útiles. Las seis especificidades de unión dentro de esta categoría también tienen el objetivo de usar especificidades del receptor que no son tan corrientes en la flora bacteriana de utilidad normal.

N-glicanos con contenido de manosa

A partir de muestras de glicoproteínas del tracto gastrointestinal humano se identificaron estructuras extraordinarias como las de tipo N-glicano, que comprenden varias manosas y fosfato. Los N-glicanos que contienen multi-manosa no han sido identificados en el intestino humano. La presencia de un resto de fosfato también es una característica sorprendente. Se ha referido que los fosfomananos se unen a ciertos receptores biológicos de carbohidrato, pero hasta ahora no se ha identificado la existencia de dichas estructuras en el intestino humano, ni tampoco en tejidos los intestinales humanos como receptores naturales. Los presentes datos demuestran que una estructura ramificada de multi-manosa es un receptor de unión de las bacterias *E. coli* causantes de diarrea. Los datos previos también indican que ciertas bacterias tales como *Escherichia coli* o *Salmonella typhimurium* se pueden unir a los N-glicanos que contienen multi-manosa. Los datos actuales respecto a la presencia de N-glicanos de manosa en el intestino revelan la importancia de la unión de manosa a la patogénesis. Las sustancias que inhiben esta unión, tales como la manosa o los análogos de manosa que llevan carbohidratos oligómeros o conjugados de carbohidratos polivalentes, son particularmente efectivas porque pueden inhibir la importante unión entre la bacteria y el ser humano.

También se observa que los nuevos receptores de multi-manosa, particularmente los receptores de multi-manosa fosforilada, se pueden usar para analizar la unión del agente patógeno al receptor.

En una forma de ejecución específica también se observa que los nuevos receptores de multi-manosa, sobre todo los receptores de multi-manosa fosforilada, se pueden usar como receptores o sustratos de bacterias probióticas que se adhieren y unen o son capaces de degradar la estructura del receptor.

En una forma de ejecución específica también se observa que los nuevos receptores de multi-manosa, sobre todo los receptores de multi-manosa fosforilada, se pueden utilizar en métodos diagnósticos o analíticos para analizar las uniones de los agentes patógenos intestinales a la estructura del receptor y a derivados más pequeños o análogos de la misma.

5 Receptores que contienen ácido siálico y especificidades de unión del ácido siálico

En las glicoproteínas intestinales humanas no se han identificado posibles estructuras que contengan ácido siálico.

10 La presente invención muestra varias nuevas estructuras sialiladas y la unión de *E. coli* causante de diarrea a estas estructuras. La especificidad de unión al ácido siálico de cualquier *E. coli* causante de diarrea no se ha identificado en detalle. Los pequeños informes basados solo en unas pocas cepas no revelan las principales especificidades de unión al ácido siálico según la presente invención y estas especificidades no se han relacionado con las estructuras del receptor.

15 La presente invención demuestra sorprendentemente que incluso el ácido N-glicolil-neuramínico, no sintetizado por el cuerpo humano, puede ser fijado eficazmente en varias cadenas oligosacáridas por bacterias *E. coli* que infectan a seres humanos. Se ha sugerido que el ácido N-glicolil neuramínico procedente de alimentos puede estar presente en los tejidos humanos. Incluso en el caso de veganos, que no comen alimentos basados en animales, la unión de NeuGc es útil para inhibir la unión del ácido siálico o se puede usar como un conjugado polivalente para la inhibición estérica de otras uniones, tal como se describe en la presente invención.

20 Sorprendentemente se pudo demostrar que la especificidad de la unión dependiente de ácido siálico se podía inhibir mediante oligosacáridos monovalentes de sialil-lactosa.

25 La presente invención pudo demostrar la presencia de receptores de primer contacto sialilados, unidos a proteínas, en el tracto gastrointestinal humano. Los datos demuestran que los receptores de ácido siálico están presentes y disponibles para la unión de agentes patógenos, lo cual ratifica la importancia de los receptores para la patogénesis, sobre todo respecto a las infecciones por *E. coli* causante de diarreas.

30 Receptores Gal α 4Gal de *E. coli* causante de diarrea

35 Esta especificidad de unión no ha sido identificada para las bacterias *E. coli* causantes de diarrea. El uso de esta secuencia oligosacárida se ha conocido por separado o como conjugados polivalentes insolubles para la prevención contra las toxinas de tipo shiga de la EHEC. El fallo del método se debe probablemente a la falta de una inhibición efectiva de las uniones de la EHEC. El vehículo insoluble no permite la inhibición polivalente descrita por la presente invención mediante el uso de los conjugados polivalentes solubles.

40 La diferencia en la unión de la toxina tipo shiga para la adhesión también es evidente por la capacidad de inhibición que tienen las estructuras monovalentes y por la especificidad selectiva de la unión. Los epítomos preferidos para inhibir la toxina tipo shiga son los trisacáridos Gal α 4Gal β 4Glc y Gal α 4Gal β 4GlcNAc. Según la presente invención, la adhesina de *E. coli* causante de diarrea también reconoce el disacárido Gala4Gal, y esta secuencia puede ser producida más económicamente partiendo de polisacáridos naturales que partiendo de los trisacáridos. La presente invención también demuestra que las formas de Gala4Gal sustituidas en 3', tales como el globósido y el antígeno de Forssman, pueden ser comúnmente reconocidas por la adhesina, mientras que las características de reconocimiento del Gala4Gal sustituido varían con las toxinas. La adhesina puede encenderse y apagarse en una bacteria.

45 En contraste con el estado técnico anterior, la presente invención muestra con las toxinas una inhibición efectiva de la unión del Gala4Gal por oligosacáridos monovalentes. Se ha referido concretamente que la inhibición de la unión de la toxina tipo shiga no puede ser inhibida por Gala4Gal monovalente. El estado técnico anterior no describe la inhibición de una o varias actividades de unión de la EHEC con el uso conjunto de Gal α 4Gal. La presente invención demuestra además que también hay varias especificidades de unión implicadas en las infecciones por EHEC. En el estado técnico anterior no se ha descrito el empleo de dicha secuencia para el tratamiento de otras enfermedades diarreicas provocadas por otras bacterias *E. coli* causantes de diarrea. Las funciones de las toxinas, de las cuales las toxinas tipo Shiga solo representa una clase, varían en cuanto a las especificidades de reconocimiento de los carbohidratos y a las infecciones causadas por diferentes tipos de *E. coli*, tales como EPEC, ETEC, etc.

50 La importancia del epítomo para la infección natural es un tanto controvertida, pero el receptor puede estar presente en el intestino o en el epitelio intestinal. Se revela la búsqueda del epítomo a partir de las proteínas intestinales, con el fin de confirmar la importancia de las infecciones naturales. Aunque solo haya pequeñas cantidades de receptores naturales, las estructuras Gala4Gal se pueden emplear como conjugados polivalentes solubles, según la presente invención, para cubrir la superficie bacteriana y bloquear estéricamente otras adhesinas de la bacteria.

60

Receptores de fucosilo

La presente invención también describe una nueva unión a secuencias fucosiladas tales como la estructura de Lewis a. Una unión de tal tipo no ha sido descrita anteriormente para una bacteria *E. coli* causante de diarrea. La unión de Lewis a no ha sido descrita previamente, pero se conocen posibles estructuras de receptores a partir de glicolípidos del intestino humano. Se revela que la unión incluye el oligosacárido de la leche humana Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β 3Gal β 4G1c.

La presente invención fue capaz de demostrar la presencia de receptores de primer contacto fucosilados, unidos a proteínas en el tracto gastrointestinal humano. Los datos demuestran que los receptores de fucosilo están presentes y disponibles para la unión de agentes patógenos, lo cual pone de manifiesto la importancia de los receptores para la patogénesis, especialmente con respecto a las infecciones por *E. coli* causantes de diarrea.

Lacto-receptores y Neolacto-receptores

La presente invención pudo demostrar la presencia de receptores de primer contacto de tipo lacto y neolacto, unidos a proteínas en el tracto gastrointestinal humano. Los datos demuestran que los lacto-receptores y los neolacto-receptores están presentes y disponibles para la unión de agentes patógenos, lo cual revela la importancia de los receptores para la patogénesis, especialmente con respecto a las infecciones por *E. coli* causantes de diarrea.

Especificidades generales de unión igualmente presentes en la flora normal

Es sabido que la lactosilceramida y los ganglio-receptores se unen a la flora bacteriana normal. El empleo de estos receptores también puede reducir la flora normal o las bacterias probióticas y, por lo tanto, es más preferible usarlos en combinación con bacterias probióticas o sustancias probióticas. Estos receptores pertenecen a la categoría del receptor de segundo contacto y son más útiles en combinación con los otros receptores descritos como receptores de primer contacto, cuando se necesita el tratamiento más efectivo. Las estructuras Gala4Gal también se pueden considerar parcialmente como estructuras de unión a la flora normal. En otra forma de ejecución, las estructuras de Gala4Gal se usan junto con bacterias probióticas.

Unión de lactosilceramida

La lactosilceramida del receptor glicolípidico que incluye ácidos grasos hidroxilados es una nueva actividad receptora para la *E. coli* causante de diarrea. Esta especificidad incluye lactosilceramidas modificadas en 3', estructuras con modificación o alargamiento de la cadena de oligosacáridos en el carbono 3 del resto Gal de la lactosilceramida. La lactosilceramida que comprende ácidos grasos hidroxilados se conoce a partir del tejido intestinal y se considera un receptor general de la *E. coli* causante de diarrea.

Refinamiento de la especificidad de unión a lacto y nuevas indicaciones

Anteriormente se ha propuesto el Gal β 3GlcNAc para la inhibición de EPEC, empleando una neoglicoproteína que lleva este disacárido como un conjugado químico no natural. La presente invención demostró una unión eficaz a la secuencia oligosacárida más larga Gal β 3G1cNAc β 3Gal β 4Glc. Este tetrasacárido se puede usar para inhibir la unión a lacto de la *E. coli* causante de diarrea, también en el estado monovalente. La presente invención demuestra que la inhibición de la unión a lacto de la EHEC se puede usar para el tratamiento de enfermedades causadas por EHEC tales como el HUS, síndrome urémico hemolítico. La inhibición de la unión a lacto también es útil contra ETEC, EIEC y EAEC.

Refinamiento de la especificidad de unión a neolacto y nuevas indicaciones

Anteriormente se ha propuesto el Gal β 4G1cNAc para la inhibición de EPEC, empleando una neoglicoproteína que comprende este disacárido como conjugado químico no natural. La lacto-N-neotetraosa puede inhibir la unión de la EPEC a una línea celular epitelial cultivada, pero la relevancia de la unión no puede demostrarse basándose en este hallazgo. Las glicosilaciones de las células cultivadas varían y no son necesariamente parecidas a la glicosilación natural del tejido donde se origina. De acuerdo con la presente invención es posible usar lacto-N-neotetraosa para inhibir la unión de EPEC. Según la presente invención, la secuencia de disacáridos Gal β 4GlcNAc y las secuencias oligosacáridas que comprenden esta secuencia de disacáridos se pueden emplear para inhibir EHEC, ETEC y otras *E. coli* causantes de diarrea. La presente invención también muestra una nueva variación de la unión de Neolacto que incluye estructuras GlcNAc terminales tales como GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc y GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc. También se encontró por primera vez que las poli-N-acetil-lactosaminas lineales unidas por β 3, Gal β 4GlcNAc [β 3Gal β 4GlcNAc] $n\beta$ 3Gal β 4Glc, donde en n es un número entero ≥ 1 , son receptores de cepas de *E. coli* causantes de diarrea; la Gal terminal puede estar sustituida por otros restos de monosacáridos. Los inhibidores monovalentes preferidos comprenden GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, descrito a partir de la leche de búfala, y mezclas que llevan GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc y Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc.

Nuevas indicaciones para los inhibidores ganglio-receptores de agentes patógenos

La unión a gangliósidos ha sido demostrada para varias cepas de EPEC y ETEC. La presente invención amplía el espectro de unión de los gangliosacáridos a los tipos de *E. coli* EHEC y especialmente EIEC y EAEC.

Inhibición de agentes patógenos por receptores monovalentes

En general, se cree que las uniones de carbohidratos a sus receptores y especialmente las uniones de bacterias patógenas son bastante débiles como interacciones monovalentes. Se ha demostrado, por ejemplo, que la unión de la toxina tipo Shiga de *E. coli* a células cultivadas puede ser inhibida únicamente por conjugados de carbohidratos polivalentes de la secuencia Gala4Gal de muy alta densidad.

La presente invención muestra que en particular las frecuentes especificidades de unión de la *E. coli* causante de diarrea a Neolacto-receptores, Globo-receptores, Lacto-receptores y receptores de ácido siálico se pueden inhibir de manera específica. La inhibición se puede lograr a concentraciones bastante bajas de oligosacáridos monovalentes.

Los oligosacáridos tienen actividad inhibidora incluso a una concentración final de 0,3 mM bajo las condiciones de ensayo in vitro con receptores de glicolípidos naturales. Los intervalos generales de concentración útiles se estiman del modo siguiente a partir de los ensayos. El intervalo de concentración útil es aproximadamente inferior a 3 mM, preferiblemente inferior a 2 mM y con mayor preferencia igual o inferior a 1,5 mM. La presente invención se refiere además a concentraciones preferidas por debajo de 1,0 mM y por debajo de 0,5 mM; una concentración preferida es de 0,3 mM aproximadamente. El límite inferior de concentración preferido es superior a 0,005 mM, con mayor preferencia superior a 0,010 mM, más preferiblemente superior a 0,1 mM y sobre todo superior a 0,1 mM. La presente invención se refiere específicamente al uso de oligosacáridos monovalentes a una concentración útil tal como la descrita, concretamente a concentraciones por debajo de 2 mM y 1 mM. La concentración o la cantidad del oligosacárido se pueden optimizar adicionalmente para un oligosacárido específico, a fin de evitar el uso excesivo de los sacáridos. Los oligosacáridos se pueden emplear dentro de los intervalos de concentración preferidos para la inhibición monovalente, ajustando las concentraciones a unos valores de concentración similares a los de la leche humana o, por ejemplo, de la leche bovina. Algunas concentraciones y cantidades preferidas, basadas en los datos de la leche, se describen en otra parte de la presente invención. El uso de los oligosacáridos a las concentraciones usuales de la leche es especialmente útil, ya que estas concentraciones se pueden considerar seguras.

1. Las especificidades de unión a la adhesión bacteriana con oligosacáridos monovalentes.
2. Las especificidades de unión a la adhesión bacteriana se pueden inhibir a concentraciones relativamente bajas de secuencias de oligosacáridos monovalentes libres.

La inhibición selectiva de las especificidades de unión al receptor, sobre todo de las especificidades frecuentes de unión descritas en los ejemplos, indica además que:

1. Las especificidades de unión son independientes y
2. Las especificidades de unión frecuentes son independientes del vehículo glicolípido o de cualquier otra estructura soporte
3. Para la aplicación terapéutica, cada especificidad de unión hacia la familia de receptores descrita por la presente invención debe ser inhibida por separado.

Mediante la aplicación combinada de las especificidades de unión frecuentes, los presentes inventores demuestran además que los inhibidores oligosacáridos inhiben simultáneamente la unión de las bacterias. Los datos indican que

1. Una sola cepa o lote bacteriano puede expresar al mismo tiempo múltiples especificidades de unión inhibibles. El estado técnico anterior carece de ensayos que muestren la unión simultánea y la inhibición de la unión de las bacterias. Como la presente invención también reveló que las especificidades de unión pueden cambiar en una sola cepa y variar aleatoriamente entre las cepas, cualquier intento de combinar datos antiguos de diferentes ensayos realizados en diferentes momentos no tiene relevancia científica.
2. Los oligosacáridos ensayados no tienen interacciones mutuas que podrían evitar la inhibición simultánea.

Un método que utilice secuencias oligosacáridas monovalentes podría ahorrar costes de síntesis en la preparación del constructo. Los conjugados polivalentes también pueden comprender estructuras conectoras no naturales y no biodegradables que pueden producir efectos secundarios o problemas de regulación. En general es deseable que el oligosacárido monovalente sea activo a bajas concentraciones, para permitir un uso rentable del oligosacárido. En este contexto, oligosacárido monovalente se refiere también a los conjugados monovalentes del oligosacárido, como por ejemplo glicosilaminas o glicosilamidas o metilglicósidos u otros glicósidos, incluyendo otros N-glicósidos, C-glicósidos o S-glicósidos, o por ejemplo derivados activos cuyo extremo reductor está modificado por reducción o aminación reductora. Si el resto monosacárido del extremo reductor está reducido se puede usar como espaciador fuera del epítipo de carbohidrato con actividad de unión. Dicho método requeriría el uso de un oligosacárido cuya longitud fuera superior - al menos en un resto monosacárido - a la del epítipo receptor deseado en la secuencia oligosacárida.

La presente invención indica que se pueden hallar actividades de unión monovalente de afinidad inesperadamente elevada y que se pueden utilizar carbohidratos monovalentes a concentraciones relativamente bajas para inhibir las uniones. Las sustancias monovalentes preferidas comprenden una o varias secuencias terminales con extremo no reductor, escogidas del grupo: Gala4Gal, Gala4Gala4Gal, Gala4Galβ4Glc, Galα4Galβ4Glc, ácido siálico unido por enlace alfa, Neu5Acα, Neu5Acα3, Neu5Acα6, Neu5Acα3Gal, Neu5Acα6Gal, Neu5Acα9Neu5Ac, Neu5Acα8Neu5Ac, Galβ3GalNAc, GalNAcβ4Gal, Galβ3GlcNAc, Galβ3(Fuca4)GlcNAc, Galβ4GlcNAc, GlcNAcβ3Gal y GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc. Con mayor preferencia la(s) sustancia(s) monovalente(s) comprende(n) una o varias secuencias terminales con extremo no reductor, escogidas del grupo: Gala4Gal, Gala4Gala4Gal, Gala4Galβ4Glc, Galα4Galβ4GlcNAc, GalNAcβ3Galα4Gal, GalNAcβ3Galα4Galβ4Glc, Neu5Acα3Gal, Neu5Acα6Gal, Neu5Acα3Galβ4Glc, Neu5Acα6Galβ4Glc, Neu5Acα8Neu5Acα8Neu5Ac, Neu5Acα8Neu5Ac, Neu5Acα8/9Neu5Acα8/9Neu5Ac, Galβ3GalNAcβ4Galβ4Glc, GalNAcβ4Galβ4Glc, Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glc, Galβ3(Fuca4)GlcNAcβ3Galβ4Glc, Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc, GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc, Neu5Xα3Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glc, Neu5Xα3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc, Neu5Xα3Galβ3(Fuca4)GlcNAcβ3Galβ4Glc, Neu5Xα3Galβ4(Fuca3)GlcNAcβ3Galβ4Glc, Neu5Xα3Galβ4(Fuca3)Glc, Neu5Xα3Galβ4GlcNeu5Xα6Galβ4Glc. Sobre todo, la sustancia monovalente comprende una o varias secuencias terminales con extremo no reductor, escogidas del grupo: Gala4Gal, Galα4Galβ4Glc, Gala4Galβ4GlcNAc, GalNAcβ3Galα4Gal, GalNAcβ3Galα4Galβ4Glc, Neu5Acα3Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glc, Neu5Acα3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc, Neu5Acα3Galβ3(Fuca4)GlcNAcβ3Galβ4Glc, Neu5Acα3Galβ4(Fuca3)GlcNAcβ3Galβ4Glc, Neu5Acα3Galβ4(Fuca3)Glc, Neu5Acα3Galβ4Glc, Neu5Acα6Galβ4Glc, Galβ3GalNAcβ4Galβ4Glc, GalNAcβ4Galβ4Glc, Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glc, Galβ3(Fuca4)GlcNAcβ3Galβ4Glc, Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc y GlcNAcβ3Galβ4Glc1cNAc3Galβ4Glc.

Este grupo incluye secuencias Gala4Gal naturales, secuencias asialo-gangliósidas de tipo natural y oligosacáridos que están presentes en la leche animal o humana. Las sustancias monovalentes preferidas también comprenden las estructuras de secuencia oligosacárida Manα3Man y Manα3(Manα6)Man.

En otra forma de ejecución las secuencias oligosacáridas se seleccionan a partir de fuentes naturales baratas. Los oligosacáridos de pectina en los que se han reducido los grupos ácido carboxílico son un ejemplo de oligosacáridos de bajo costo; los oligosacáridos de pectina reducidos tienen las secuencias Gal[α4Ga1]_n, donde n es un número entero de 1 hasta 10 aproximadamente. Se advierte que podrían usarse oligosacáridos aún más grandes, pero éstos no son en general tan efectivos. Se han referido métodos para reducir pectina en forma de éster, por ejemplo como éster metanólico natural, o mediante una carbodiimida. Los polisacáridos grandes de pectina pueden degradarse a oligosacáridos, por ejemplo por hidrólisis química o enzimáticamente con pectinasas. Las secuencias oligosacáridas Gala4Gal o los análogos o secuencias oligosacáridas parciales de fuentes naturales, por ejemplo, de la planta de oca, también son preferidas para los usos según la presente invención. Las fuentes naturales baratas incluyen también el ácido polisialílico producido por las bacterias. Éste tiene las secuencias poliméricas Neu5Ac [α8Neu5Ac]_n o Neu5Ac[α9Neu5Ac]_n o Neu5Ac, con enlaces alternos α9 y α8. El ácido polisialílico puede comprender una unión intracatenaria y una forma de ejecución concreta se refiere al uso de ácido polisialílico como inhibidor polimérico. Los polisacáridos se pueden degradar a oligosacáridos o polisacáridos de bajo peso molecular por métodos conocidos del estado técnico. Para las aplicaciones de la presente invención se prefiere el manano y el fosfomanano de la levadura o los oligosacáridos derivados de los mismos, a partir de fuentes naturales de bajo costo. Las secuencias oligosacáridas naturales de bajo costo son especialmente preferidas para usos nutricionales, productos alimenticios y piensos.

Tratamiento de agentes patógenos desconocidos

Las composiciones y sustancias de carbohidratos están especialmente destinadas al tratamiento de las infecciones causadas por agentes patógenos no conocidos. En muchos casos no es posible diagnosticar el agente patógeno y el tratamiento debe iniciarse antes de que se puedan tener los resultados del diagnóstico. En países subdesarrollados puede ocurrir que los diagnósticos no estén disponibles o sean demasiado caros. La disponibilidad de diagnósticos también puede ser limitada en condiciones de guerra o en regiones distantes de poca población. Las composiciones y sustancias de acuerdo con la presente invención se pueden emplear para aliviar los síntomas de las infecciones producidas por numerosos agentes patógenos distintos. La presente invención se refiere sobre todo al tratamiento de enfermedades, preferentemente de enfermedades gastrointestinales tales como las diarreas, cuando el agente patógeno es una *E. coli* no tipificable como patógeno o no patógena.

Efectos sinérgicos de la manipulación de varias uniones de receptores de carbohidrato

El primer efecto sinérgico es la eficiencia inesperadamente alta de la inhibición o la unión a un solo agente patógeno representante de varias adhesinas que se unen a las superficies celulares de un paciente. En las pruebas usuales de inhibición con epítopos individuales de oligosacáridos el agente patógeno tiene en general otras especificidades de unión a los carbohidratos que pueden permitirle sobrevivir en el tejido. La prevención o inhibición de la unión es más efectiva cuando se inhiben tantos componentes de la unión como sea posible. Cuando se usa un conjugado polivalente, la parte de mayor afinidad del conjugado se dirige a posibles secuencias de oligosacáridos receptores con menor afinidad por la superficie del agente patógeno. Cuando la inhibición cubre la mayoría de los mecanismos de unión del agente patógeno, se supera un valor umbral de manera que la masa de agentes patógenos puede ser arrastrada por los líquidos del tejido, produciendo un efecto preventivo espectacular contra el agente patógeno.

Cuando la presente invención se usa para inhibir simultáneamente un microbio y una toxina implicados en la misma enfermedad, ésta se alivia por dos medios, es decir, la eliminación tanto de la bacteria como de la toxina.

5 El uso de dos o más secuencias oligosacáridas también tiene un efecto sinérgico contra el desarrollo de resistencia a la terapia inhibitoria. El desarrollo de resistencia es un problema común en las actuales terapias con antibióticos. Cuando en un tejido diana existe una cantidad limitada de potenciales receptores de carbohidratos para un agente patógeno se pueden emplear terapias con dos o más oligosacáridos para que la bacteria no tenga oportunidad de adherirse a los tejidos.

10 Al emplear dos o más oligosacáridos contra varios agentes patógenos se producen efectos inhibidores sinérgicos. Cuando varios agentes patógenos infectan simultáneamente, los agentes patógenos/infecciones suelen apoyarse mutuamente. Aparte de los efectos entre el agente patógeno y los tejidos del huésped o entre los agentes patógenos y la flora normal, el efecto sinérgico para la inhibición de los agentes patógenos puede ocurrir por interacción con la defensa inmunológica del paciente. Los agentes patógenos pueden debilitar las células de la defensa inmunitaria.

15 El problema de la coinfección puede implicar varias interacciones de carbohidratos que pueden ser manipuladas. Por ejemplo, las células infectadas por el virus de la gripe son coinfectadas más eficazmente por varias bacterias patógenas de los pulmones. Se ha sugerido que la sialidasa del virus de la gripe podría revelar receptores no sialilados para las bacterias en las células pulmonares infectadas. El virus también puede utilizar sus receptores de hemaglutinina para unirse a los granulocitos, provocando una interacción que puede conducir a la disfunción del leucocito.

Métodos que implican efectos sinérgicos para inhibir la unión de los agentes patógenos

25 1. Efectos sinérgicos de al menos dos carbohidratos receptores contra un solo agente patógeno que tiene varias actividades de unión

30 a) La inhibición simultánea de al menos dos especificidades de unión existentes en el mismo agente patógeno inhibe de manera efectiva las especificidades de unión alternativas del agente patógeno cuando hay al menos dos especificidades de unión simultáneas.

b) Análogamente, la inhibición de al menos dos especificidades de unión de un agente patógeno es deseable cuando la segunda especificidad de unión puede surgir en una situación en la que la primera especificidad de unión esté inhibida. Un agente patógeno celular como una bacteria puede ser incluso capaz de activar la primera especificidad de unión. Así como la primera especificidad de unión se puede desactivar por inhibición mediante un método de recubrimiento, que se describe para carbohidratos solubles polivalentes en el siguiente apartado 3, ello no es posible mediante un solo carbohidrato polivalente contra la primera especificidad. Este cambio puede ocurrir, por ejemplo, mediante una variación de fase de una bacteria. El cambio de unión serviría para una célula patógena capaz de usar varios receptores de carbohidratos, ya que la producción de adhesinas de carbohidratos para receptores no existentes consumiría energía innecesariamente. Los presentes inventores advirtieron que las especificidades de unión conforme a la presente invención se pueden desactivar en cepas de *E. coli* causando diarrea. Por lo tanto es útil el uso de varias secuencias oligosacáridas de unión, especialmente de secuencias oligosacáridas según la presente invención, para inhibir la unión de las bacterias causantes de diarreas y otras enfermedades intestinales. La presente invención revela que cualquiera de las especificidades de unión de las numerosas cepas bacterianas estudiadas puede ser cambiada de forma aleatoria. Durante un cultivo prolongado se pueden desactivar todas las especificidades de unión.

45 c) La presente invención revela que las especificidades de unión no se expresan de forma estable en diferentes cepas de bacterias, incluso con la misma indicación. Esto enfatiza aún más la necesidad de múltiples inhibidores, especialmente de inhibidores monovalentes, para una terapia efectiva.

50 d) Inhibición del receptor a diferentes niveles de la infección. Como un caso especial de la inhibición de agentes patógenos, especialmente de bacterias y virus causantes de enfermedades intestinales tales como las diarreas, la presente invención demuestra que es útil inhibir la unión del agente patógeno a dos niveles de receptor. Las primeras interacciones de la unión tienen lugar en la parte externa de la matriz de carbohidrato que recubre las superficies celulares. Esta parte externa comprende secuencias oligosacáridas de glicoproteínas y posiblemente algunas estructuras de tipo poliglicosilceramida. Aquí, las primeras interacciones de la unión se denominan de primer contacto y los receptores implicados en la primera unión receptores de primer contacto. Las segundas interacciones de la unión se denominan de segundo contacto y tienen lugar con glicolípidos de tamaño medio y pequeño en la superficie de la membrana celular. Aquí los receptores glicolípidos de tamaño medio y pequeño se llaman receptores de segundo contacto. El estado técnico anterior no describe estas secuencias oligosacáridas caracterizadas estructuralmente como receptores bacterianos de primer contacto del intestino humano o tracto gastrointestinal.

65 La presente invención demuestra que varios receptores nuevos de primer contacto, entre los tipos de receptores según la presente invención, están se encuentran en glicoproteínas mucinosas del intestino humano. Los receptores nuevos incluyen secuencias oligosacáridas que llevan manosa, Gal β 3GlcNAc, Gal β 4GlcNAc, Lewis a y secuencias oligosacáridas de glicoproteína sialilada. Los receptores más preferidos intervienen en las primeras interacciones de unión. La unión a los receptores de glicoproteína está a un diferente nivel de interacciones de unión respecto a la

unión a las secuencias oligosacáridas de cadena más corta de los glicolípidos de la superficie celular. Se observa que las secuencias oligosacáridas de Gal β 3GlcNAc, Gal β 4GlcNAc, Lewis a y glicoproteína sialilada también pueden hallarse en glicolípidos polilactosamínicos de cadena larga y en glicolípidos de cadena más corta. Las estructuras de carbohidrato que se expresan totalmente o al menos en su mayoría como receptores de segundo contacto incluyen los receptores de lactosilceramida, los receptores de unión a gangliósidos y los receptores de unión a globósidos.

En una forma de ejecución específica se prefiere usar los receptores de contacto primario, al menos preferiblemente dos de ellos, para inhibir eficazmente el contacto primario y las infecciones. La presente invención revela por primera vez varios receptores de primer contacto del intestino humano:

receptor de multi-manosa, neolacto-receptores, lacto-receptores, receptores de Lewis a y receptores de unión al ácido siálico.

También se advierte que los nuevos receptores de primer contacto son útiles para buscar otras uniones de agentes patógenos a dichos receptores. Una vez encontrada una estructura de unión, el sacárido receptor se puede utilizar para diseñar el inhibidor, tal como se describe aquí en el caso de las bacterias *E. coli*.

Receptores subfucosilados

Un grupo preferido entre los receptores de primer contacto preferidos son los receptores subfucosilados tales como las secuencias oligosacáridas neolacto, lacto y Lewis a. Estos receptores son los más comunes en las personas que son negativas a las fucosiltransferasas, como el secretor α 2-Fuc-T y la fucosiltransferasa del grupo sanguíneo Lewis.

Las personas que tienen el tracto gastrointestinal subglicosilado son más propensas a las infecciones. La presente invención indica una razón de ello y una posible terapia. La *E. coli* patógena puede ser inhibida por uno o varios de los siguientes oligosacáridos o conjugados, preferentemente polivalentes: Lacto-N-tetraosa, Lacto-N-neotetraosa, Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc.

La presente invención describe por primera vez terapias para una nueva indicación, infecciones agravadas debido a secuencias de lactosamina submodificadas, en particular a secuencias epiteliales de lactosamina subfucosilada. La presente invención se refiere especialmente al tratamiento de personas negativas a la fucosiltransferasa de Lewis (fucosiltransferasa III) y/o al secretor de fucosiltransferasa. Pueden surgir secuencias similares subfucosiladas que actúen como receptores de agentes patógenos en las células epiteliales, cuando un paciente humano es negativo a otras fucosiltransferasas, especialmente a la fucosiltransferasa V y/o a la fucosiltransferasa VI. La presente invención tiene por objeto evitar la adhesión de los agentes patógenos intestinales, inhibiendo el agente o agentes patógenos mediante carbohidratos que contengan una o más secuencias oligosacáridas seleccionadas del grupo formado por neolacto-receptores, lacto-receptores y receptores de fucosa, cuando las estructuras han aumentado en un paciente.

Se revela el uso de una o varias secuencias oligosacáridas alargadas, más activas, correspondientes a la fórmula Gal- β x(Fuc α 4)_nGlcNAc β R, donde x es independientemente la posición de enlace 3 o 4, n = 0 o 1, con la condición de que cuando x = 4 n = 0; y R es un resto monosacárido u oligosacárido o conjugado del mismo, que está unido preferentemente a GlcNAc β y comprende 3Gal(NAc)_m, y m es independientemente 0 o 1. Se revelan las secuencias Gal β x(Fuc α 4)_nGlcNAc β 3Gal, Gal β x(Fuc α 4)_nGlcNAc β 3Gal β 4Glc, Gal β x(Fuc α 4)_nGlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, Gal β x(Fuc α 4)_nGlcNAc β 3Gal β 3GlcNAc, Gal β x(Fuc α 4)_nGlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, Gal β x(Fuc α 4)_nGlcNAc β 3Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc y Gal β x(Fuc α 4)_nGlcNAc β 3GalNAc.

Preferentemente se emplean dos secuencias oligosacáridas. Las combinaciones preferidas de las dos secuencias oligosacáridas incluyen las secuencias de oligosacáridos terminales no reductores Gal β 4GlcNAc β Gal y Gal β 3GlcNAc β 3Gal, que representan N-acetil-lactosaminas de tipo 1 y tipo 2, tanto submodificadas como subfucosiladas, y sirven como receptores de agentes patógenos intestinales. Otra combinación preferida es Gal β 3GlcNAc β 3Gal y Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc, que comprende lactosaminas de tipo 1 especialmente comunes en el intestino. Se revela el uso de estas tres secuencias de oligosacáridos.

En la presente invención se observa por primera vez que

1. Los agentes patógenos únicos, especialmente las bacterias patógenas que infectan el tracto gastrointestinal humano, como la *E. coli* diarreica intestinal, se unen al número limitado de receptores oligosacáridos específicos existentes en el tejido diana. Hay varias especificidades de unión al receptor simultáneamente funcionales.

2. Las secuencias oligosacáridas, como conjugados polivalentes o en composiciones inmunológicamente activas, también pueden activar la defensa inmunitaria, por ejemplo en el intestino, que puede dirigirse a varios tipos de agentes patógenos tales como bacterias u hongos. Los carbohidratos se pueden usar especialmente para activar reacciones de defensa inmunológica no específicas.

3. Los carbohidratos polivalentes solubles, incluyendo receptores de carbohidratos comunes o receptores para la actividad de unión a carbohidratos de un agente patógeno, el cual tiene varios tipos posibles de interacciones de unión con el paciente, se pueden usar para recubrir la bacteria. Cuando la superficie de la bacteria está cubierta por el carbohidrato polivalente soluble, las demás interacciones de unión quedan inhibidas estéricamente. La

inhibición estérica requiere un peso molecular adecuado; en general el peso molecular debe ser suficientemente alto para poder inhibir eficazmente, pero por otra parte, en ciertas aplicaciones, el peso molecular debe ser lo suficientemente bajo para permitir la difusión efectiva del carbohidrato soluble. El carbohidrato polivalente soluble de recubrimiento se puede unir a varios agentes patógenos formando un aglutinado que se elimina, por ejemplo, con la secreción de mucina en el epitelio pulmonar o intestinal. Varios agentes patógenos pueden comprender varias especies o cepas diferentes de agentes patógenos o varias células o varios agentes patógenos proteicos de la misma especie, cepa o tipo.

4. En caso de coinfección el uso de un carbohidrato inhibidor contra un único agente patógeno puede potenciar las infecciones de los otros agentes patógenos coinfectantes, que no están inhibidos pero ganan más espacio para expandirse. La prevención contra un agente patógeno también tiene un efecto sinérgico contra un agente patógeno coinfectante cuando hay una adhesión, la cual se puede inhibir o usar para eliminar varias bacterias juntas. Al utilizar carbohidratos polivalentes solubles se pueden formar complejos entre los agentes patógenos coinfectantes. Cuando se emplea uno o, preferiblemente, al menos dos carbohidratos contra todos los agentes patógenos coinfectantes, la infección se debilita mucho más efectivamente que cuando el objetivo es una sola interacción. El efecto sinérgico de inhibir la coinfección mediante al menos dos secuencias de carbohidratos que sean capaces de inhibir todas las bacterias coinfectantes, es útil para el caso en que haya al menos dos agentes patógenos coinfectantes, a fin de prevenir, por ejemplo, neumonías o diarreas graves.

Combinaciones preferidas de inhibidores de *E.coli* causantes de diarrea

Debido a los diferentes niveles de contacto en las infecciones se pueden preferir combinaciones de oligosacáridos receptores de primer contacto. Los receptores de primer contacto están más fácilmente disponibles para la unión bacteriana y las dianas de inhibición preferidas. La presente invención también se refiere al tratamiento o prevención de las infecciones en que los receptores de primer contacto de la adhesión de agentes patógenos al epitelio gástrico humano están bloqueados, especialmente con el uso de al menos dos receptores oligosacáridos elegidos del grupo: lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de fucosa, receptores de ácido siálico y receptores de manosa, con mayor preferencia de al menos tres receptores oligosacáridos de dicho grupo y sobre todo de al menos cuatro oligosacáridos de dicho grupo. En otra forma de ejecución se usa al menos uno de los receptores de primer contacto y preferiblemente al menos dos receptores de primer contacto junto con al menos uno de los receptores de segundo contacto del grupo de receptores Gala4Gal, receptores de lactosilceramida y ganglio-receptores. En otra forma de ejecución se usan al menos dos receptores de segundo contacto seleccionados del grupo formado por receptores Gala4Gal, receptores de lactosilceramida y ganglio-receptores, opcionalmente con una bacteria probiótica o con una sustancia prebiótica.

También se prefiere la prevención o el tratamiento de infecciones tales como la diarrea provocada por *E. coli* y el diagnóstico de *E. coli* diarreica utilizando al menos dos de los receptores oligosacáridos elegidos del grupo formado por: receptores Gala4Gal, lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de fucosa, receptores de ácido siálico y receptores de manosa. Estos se prefieren en determinados casos, porque los receptores de lactosilceramida y los ganglio-receptores también están relacionados con interacciones de la flora normal.

En una forma de ejecución preferida la prevención o el tratamiento de infecciones tales como la diarrea provocada por *E. coli* y el diagnóstico de *E. coli* diarreica se lleva a cabo con el uso de al menos dos receptores oligosacáridos elegidos entre los grupos

- a. lacto-receptores, neolacto-receptores y receptores de manosa,
- b. receptores de fucosa, receptores Gala4Gal y receptores de ácido siálico,

de modo que al menos un receptor oligosacárido sea del grupo a y otro del grupo b. Con mayor preferencia se usan al menos dos receptores oligosacáridos, escogiendo al menos dos secuencias oligosacáridas del grupo b. Estas son algunas de las combinaciones preferidas de los receptores específicos de la patogénesis, dirigidas especialmente al tratamiento contra cepas diarreicas o tipos de enfermedades específicas, después de analizar el agente o agentes patógenos causantes de la enfermedad.

En una forma de ejecución preferida la prevención o el tratamiento de infecciones tales como la diarrea causada por *E. coli* y el diagnóstico de *E. coli* diarreica se lleva a cabo con el uso de al menos dos sustancias que comprenden diferentes secuencias oligosacáridas elegidas entre los oligosacáridos existentes en la leche humana o en la leche de un animal de granja. Los oligosacáridos libres preferidos de las leches incluyen varios lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de fucosa, receptores de ácido siálico y glicolípidos receptores de lactosilceramida. En una forma de ejecución preferida las secuencias oligosacáridas de tipo lácteo se usan junto con una o varias secuencias de oligosacáridos no lácteos, con mayor preferencia junto con una secuencia oligosacárida seleccionada del grupo formado por: Neu5Ac α 8Neu5Ac, Gala4Gal y secuencias oligosacáridas receptoras de manosa.

En una forma de ejecución preferida la prevención o el tratamiento de infecciones tales como la diarrea causada por *E. coli* y el diagnóstico de *E. coli* diarreica se lleva a cabo con el empleo de al menos dos sustancias de bajo coste elegidas del grupo formado por receptores Gala4Gal, lacto-receptores, neolacto-receptores y receptores de manosa; con mayor preferencia las sustancias de bajo coste son un receptor Gala4Gal y un receptor de manosa.

Se prefiere el uso de al menos dos secuencias de oligosacáridos receptores de acuerdo con la presente invención cuando una de las secuencias oligosacáridas es un receptor de fucosa conforme a la presente invención; porque la secuencia es un receptor natural común de primer contacto.

5 Se prefiere el uso de al menos dos secuencias de oligosacáridos receptores de acuerdo con la presente invención cuando una de las secuencias de oligosacáridos es un receptor Gala4Gal según la presente invención, porque la secuencia es un receptor especialmente efectivo de *E. coli*. Se prefiere el uso de al menos dos secuencias de oligosacáridos receptores de acuerdo con la presente invención cuando una de las secuencias de oligosacáridos es un tipo de neolacto-receptor de gran afinidad según la presente invención, porque las secuencias son un receptor especialmente efectivo de la *E. coli* diarrea humana.

10 Se prefiere el uso de al menos dos secuencias de oligosacáridos receptores de acuerdo con la presente invención cuando una de las secuencias de oligosacáridos es un tipo de lacto-receptor de gran afinidad según la presente invención, porque las secuencias son un receptor especialmente efectivo de la *E. coli* diarrea humana.

15 Se prefiere el uso de al menos dos secuencias de oligosacáridos receptores de acuerdo con la presente invención cuando una de las secuencias de oligosacáridos comprende un receptor de Neu5Gc según la presente invención, porque la secuencia es un receptor especialmente efectivo de la *E. coli* diarrea humana.

20 Las combinaciones de lacto-receptores, neolacto-receptores y receptores de fucosa se prefieren como secuencias submodificadas arriba descritas.

Vehículos y conjugados polivalentes

25 En una forma de ejecución preferida, la secuencia o secuencias oligosacáridas inhibitoras/receptoras de agentes patógenos están unidas a un vehículo polivalente, con mayor preferencia a al menos dos secuencias oligosacáridas inhibitoras de agentes patógenos. En una forma de ejecución específica, al menos dos secuencias oligosacáridas inhibitoras de agentes patógenos están unidas al mismo vehículo polivalente. El vehículo polivalente es de forma preferente un vehículo de carbohidrato tal como un polisacárido o un oligosacárido; en una forma de ejecución preferida el vehículo de carbohidrato es soluble. En una forma de ejecución preferida el vehículo de carbohidrato es un polisacárido bacteriano.

30 En otra forma de ejecución la secuencia o secuencias oligosacáridas inhibitoras de agentes patógenos se expresan en un vehículo consistente en partículas. El vehículo de partículas es preferiblemente una partícula de carbohidrato, una partícula de polímero sintético o una célula. La célula es preferiblemente una célula bacteriana o una célula de levadura. El diámetro preferido de la partícula está comprendido entre 10 nm y 10 micrómetros.

35 Los conjugados polivalentes se diseñan preferentemente para que no sean antígenos ni inmunógenos, de modo que los conjugados solo puedan causar reacciones inmunológicas de poca importancia o ninguna reacción inmunológica en absoluto. Otras propiedades preferidas de los polisacáridos incluyen una baja toxicidad del polisacárido y/o de sus productos de degradación.

40 Los conjugados polivalentes que están destinados a inhibir bacterias están diseñados para evitar la especificidad de unión a carbohidratos o especificidades del epitelio cuando la especificidad de unión a carbohidratos puede fijar el conjugado al epitelio y aumentar la unión patológica del agente patógeno al tejido.

45 Se prefieren los exopolisacáridos o los polisacáridos capsulares de las bacterias, especialmente cuando la bacteria es una bacteria no patógena, como la bacteria del ácido láctico. Varios de los receptores oligosacáridos según la presente invención son conocidos a partir de polisacáridos bacterianos. La presente invención también se refiere a la ingeniería de los epítomos oligosacáridos receptores sobre polisacáridos bacterianos, especialmente polisacáridos de agentes no patógenos tales como las bacterias de ácido láctico. La ingeniería puede realizarse genéticamente o mediante la modificación química de los polisacáridos, por ejemplo mediante hidrólisis específica o reacciones de glicosiltransferasa. De acuerdo con la presente invención es posible usar un polisacárido bacteriano o una mezcla de polisacáridos bacterianos que comprenda al menos dos oligosacáridos receptores según la presente invención. Se prefiere más usar un polisacárido bacteriano o una mezcla de polisacáridos bacterianos que comprenda al menos tres secuencias oligosacáridas receptoras y en otra forma de ejecución al menos cuatro secuencias oligosacáridas receptoras según la presente invención.

50 Las sustancias polisacáridas preferidas que contienen NeuNAc α 6Ga o NeuNAc α 3Gal comprenden NeuNAc α 6Gal β 4/3GlcNAc, NeuNAc α 3Gal β 4/3GlcNAc, NeuNAc α 6Gal β 4/3Glc o NeuNAc α 3Gal β 4/3Glc unidas a un polisacárido. Tales polisacáridos con NeuNAc3Gal ya están presentes en ciertos exopolisacáridos de especies de *Streptococcus* tipo B. Se pueden expresar polisacáridos similares en agentes no patógenos tales como bacterias de ácido láctico. Las especies que contienen NeuNAc α 6Gal son más preferidas porque éstas se pueden producir desialilando total o parcialmente polisacáridos que contienen NeuNAc α 3Gal β 4/3GlcNAc y resialilando con una transferasa sialilante en la posición 6 de Gal, tal como una α 6-sialiltransferasa. Alternativamente se puede sialilar un polisacárido no sialilado que comprenda Gal β 4/3GlcNAc o Gal β 4/3Glc terminal. Los polisacáridos bacterianos no sialilados o derivados de

polisacáridos que incluyen secuencias de oligosacáridos según la presente invención tales como Gal β 4/3GlcNAc, Gal β 4Glc y Gal β 3GalNAc o secuencias de oligosacáridos más grandes conforme a la presente invención también se prefieren para usar de acuerdo con la presente invención. En la forma de ejecución preferida se usa un polisacárido parcialmente sialilado que comprende las secuencias Gal β 4/3GlcNAc y/o Gal β 4Glc.

En otra forma de ejecución se incluye un conjugado de carbohidrato antigénico o inmunoestimulante o modulador. En una forma de ejecución específica el conjugado de carbohidrato antigénico o inmunógeno va conjugado mediante enlace covalente con una o varias secuencias oligosacáridos según la presente invención.

Conjugados polivalentes para reticular agentes patógenos con células inmunitarias o proteínas de defensa inmunitaria

Alternativamente las composiciones de carbohidratos se pueden emplear para reticular los agentes patógenos con células inmunitarias tales como varios tipos de leucocitos o proteínas de defensa inmunitaria, como por ejemplo anticuerpos, lectinas inmunitarias u otros agentes inhibidores de patógenos, inhibiendo así el agente patógeno.

Se han descrito varios receptores de agentes patógenos en las superficies de células inmunitarias. Los receptores preferidos en las células inmunitarias están destinados a la destrucción del agente patógeno, como los receptores de fagocitosis. Las secuencias de oligosacáridos polivalentes u oligovalentes no son preferiblemente tan grandes que puedan evitar la fagocitosis o la destrucción del agente patógeno infeccioso. Estos receptores incluyen el receptor de manosa en los macrófagos y receptores de células asesinas naturales que se unen a N-acetilglucosamina. Es obvio que se pueden usar varios carbohidratos naturales y sintéticos como análogos de estas secuencias. Los carbohidratos preferidos que se unen a los receptores de manosa incluyen monosacáridos terminales o análogos de monosacáridos que contienen como mínimo dos grupos hidroxilo axiales libres. Las secuencias de carbohidratos polivalentes que deben usarse para la unión a las células inmunitarias incluyen conjugados polivalentes que llevan manosa, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilmanosamina o glucosa. Con mayor preferencia, los monosacáridos se eligen de modo que sean componentes naturales existentes en la biología humana, la manosa es D-manopiranososa, la fucosa es L-fucopiranososa, N-acetil-D-glucosaminopiranososa, N-acetil-D-manosamino-pirosanososa y la glucosa es D-glucopiranososa. En la forma de ejecución más preferida los restos monosacáridos están unidos mediante enlaces glicosídicos de tipo natural a monosacáridos vecinos como Man α 1-3, Man α 1-6 o Man α 1-2, GlcNAc β 1-3, GlcNAc β 1-2, GlcNAc β 1-6, Fuca α 1-2, Fuca α 1-3, Fuca α 1-4, Fuca α 1-6. Las secuencias de oligosacáridos preferidas comprenden los disacáridos terminales Man α 1-3Man, Man α 1-6Man, Man α 1-2Man, GlcNAc β 1-3Gal, GlcNAc β 1-2Man, GlcNAc β 1-6Gal, Fuca α 1-2Gal, Fuca α 1-3GlcNAc, Fuca α 1-4GlcNAc o Fuca α 1-6GlcNAc.

En una forma de ejecución específica se emplea un carbohidrato polimérico, que tiene una especificidad de unión al agente patógeno o a varios agentes patógenos y a células inmunitarias o leucocitos inhibidores de una patogénesis, para reticular un agente patógeno y una célula inmunitaria. En concreto se usa un carbohidrato que contiene alfa-manosa para la unión simultánea de bacterias tales como especies de *Salmonella* o *E. coli* y leucocitos/sistema complementario.

En otra forma de ejecución las sustancias polivalentes que comprenden al menos dos secuencias oligosacáridas diferentes según la presente invención se usan para la unión simultánea de uno o más tipos de agentes patógenos y uno o más tipos de células inmunitarias capaces de inhibir el agente o agentes patógenos. Con mayor preferencia una de las secuencias oligosacáridas de la sustancia polivalente que lleva al menos dos secuencias oligosacáridas diferentes según la presente invención es una secuencia de oligosacáridos que incluye Man α .

Conjugados polivalentes solubles que recubren y aglutinan los agentes patógenos

Los conjugados polivalentes preferidos incluyen conjugados polivalentes solubles o formadores de gel. Con mayor preferencia, el conjugado polivalente es soluble y puede recubrir la superficie de la bacteria. Preferiblemente, el conjugado polivalente soluble que recubre la bacteria tiene al menos un peso molecular de 5.000 daltons, con mayor preferencia de al menos 10.000 daltons aproximadamente y sobre todo de al menos unos 20.000 daltons. Para varias aplicaciones, los pesos moleculares más altos deberían estar limitados de cara a la difusión efectiva de los conjugados en la mucosa gástrica. Los límites superiores preferidos de los conjugados polivalentes están por debajo de los 300.000 daltons aproximadamente, con mayor preferencia por debajo de 150.000 daltons aproximadamente y sobre todo por debajo de 50.000 daltons. Los intervalos de peso molecular más preferidos van aproximadamente de 5.000 hasta 50.000 daltons, con mayor preferencia de 10.000 daltons hasta 50.000 daltons y sobre todo de 20.000 daltons hasta 100.000 daltons. Los límites de peso molecular indican que aproximadamente al menos el 70% y con mayor preferencia al menos el 80% de las moléculas están dentro del intervalo deseado.

Los conjugados polivalentes capaces de difundirse hacia la superficie del agente patógeno y recubrirlo son efectivos, sobre todo, en la prevención contra agentes patógenos cuando hay que inhibir varios tipos de unión. El conjugado o conjugados polivalentes incluyen carbohidratos que corresponden a la actividad de unión más común en el agente o agentes patógenos presentes. El recubrimiento de la superficie por el conjugado polivalente bloquea estéricamente el otro receptor o receptores de unión a carbohidratos en la superficie del agente o agentes patógenos. Se utilizan

preferiblemente al menos dos polisacáridos que recubran agentes patógenos. Con mayor preferencia se conjugan dos secuencias oligosacáridas receptoras distintas con el mismo polímero.

Con mayor preferencia el conjugado polivalente soluble comprende una cadena principal polisacárida.

Por tanto la presente invención se refiere a sustancias polivalentes, sobre todo a sustancias polivalentes solubles que incluyen al menos dos secuencias oligosacáridas receptoras, con mayor preferencia al menos tres secuencias oligosacáridas receptoras según la presente invención. La presente invención también se refiere a las sustancias polivalentes que comprenden al menos cuatro secuencias oligosacáridas receptoras según la presente invención.

Conjugados polivalentes capaces de inducir la unión de carbohidratos hacia ellos mismos

La presente invención también se refiere a las especificidades de unión a carbohidratos que pueden ser inducidas en células patógenas por conjugados polivalentes que mimetizan las superficies naturales polivalentes a las cuales tienden a fijarse los agentes patógenos. Las especificidades de unión inducibles no están activas durante todo el tiempo, pero se pueden activar cuando el agente patógeno necesita unirse al receptor. Según la presente invención, las células patógenas, especialmente bacterias tales como *Escherichia coli*, pueden activar dicha unión inducible al carbohidrato del receptor por contacto con éste. Uno de los mecanismos de inducción es la presencia de pequeñas cantidades de los receptores inducibles en la superficie celular, lo cual señala la inducción de mayores cantidades de receptores.

Para la inducción del receptor se pueden usar los conjugados polivalentes arriba descritos. Los conjugados de alto peso molecular se prefieren cuando la célula patógena objetivo es accesible a moléculas de mayor peso molecular en la capa de mucina. Para esta aplicación incluso se pueden usar conjugados poliméricos insolubles si la célula patógena diana es accesible para ellos.

Dianas terapéuticas

La presente invención se dirige preferiblemente al tratamiento de infecciones intestinales. El término tratamiento se refiere igualmente a los tratamientos preventivos o profilácticos. De manera similar, la presente invención se podría usar para el tratamiento de otras infecciones gastrointestinales.

La presente invención se dirige especial y preferentemente al tratamiento contra los agentes patógenos intestinales. Los agentes patógenos intestinales preferidos causan enfermedades diarreicas. Los agentes patógenos preferidos causantes de diarrea incluye todos los tipos de *Escherichia coli* que causan enfermedades intestinales. El empleo de las composiciones contra *Escherichia coli* comprende las especies EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigénica), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva).

Tratamiento y prevención de otras infecciones y coinfecciones causadas por agentes patógenos distintos de *E. coli*

Se sabe que hay otros varios agentes patógenos viviendo en un entorno receptor similar, en humanos o incluso en animales, especialmente en el tracto gastrointestinal, sobre todo en el entorno del receptor intestinal que comprende receptores de carbohidrato según la presente invención. Otros agentes patógenos distintos de *E. coli* que infectan el tracto gastrointestinal humano, en concreto los que infectan el intestino humano, es probable que usen una o varias de las secuencias oligosacáridas receptoras según la presente invención. El tratamiento de otro agente o agentes patógenos según la presente invención es preferente cuando los agentes patógenos se unen al menos a dos, con mayor preferencia al menos a tres secuencias oligosacáridas receptoras según la presente invención, y cuando el empleo de las secuencias oligosacáridas descritas en la presente invención aporta unos beneficios concretos. Por lo tanto la presente invención se refiere en general al uso de composiciones contra agentes patógenos en el tracto gastrointestinal humano, especialmente en el intestino, las cuales incluyen compuestos que llevan al menos dos secuencias oligosacáridas receptoras según la presente invención.

Cuando el agente patógeno no es *E. coli*, éste puede usar o fijar otros receptores u otras secuencias oligosacáridas análogas, a las cuales se alude aquí como las otras secuencias oligosacáridas receptoras, incluyendo de manera preferente otros oligosacáridos tales como las secuencias Fuca2Gal, Fuca3GlcNAc, Fuca3Glc, ganglio-series, gangliósidos y/o NeuNAca8NeuNAc; con mayor preferencia las secuencias fucosiladas son Fuca2Galβ3/4GlcNAc, Fuca2Galβ4Glc, Fuca2Galβ4(Fuca3)Glc, Galβ4(Fuca3)GlcNAc, Fuca2Galβ3/4(Fuca4/3)GlcNAc. La presente invención se refiere al uso de composiciones a base de compuestos que comprenden al menos dos oligosacáridos receptores de acuerdo con la presente invención, junto con al menos una de las otras secuencias oligosacáridas receptoras contra agentes patógenos, especialmente contra agentes patógenos distintos de *E. coli*, en el tracto gastrointestinal humano, sobre todo del intestino. La presente invención también se refiere al tratamiento simultáneo de infecciones causadas por al menos una *E. coli* diarreica y al menos un agente patógeno distinto de *E. coli*.

Las estructuras Fuca2Gal también se unen a otros agentes patógenos distintos de *E. coli* y son útiles para usar en combinaciones con las sustancias según la presente invención. En una forma de ejecución preferida la estructura

Fucc2Gal o la estructura Fucc2Gal-Xyl procede de la hemicelulosa vegetal. La presente invención también se refiere a una sustancia terapéutica que comprende la estructura Fucc2Gal derivada de hemicelulosa vegetal. La sustancia terapéutica se puede usar en composiciones nutricionales que incluyen productos alimenticios, piensos, bebidas o en fármacos o composiciones terapéuticas análogas a medicamentos.

Otras bacterias que pueden ser diana de las combinaciones de carbohidratos y de los conjugados polivalentes del receptor según la presente invención abarcan, por ejemplo, especies de *Vibrio*, incluyendo *Vibrio cholera*, especies de *Campylobacter*, incluyendo *Campylobacter jejuni*, especies de *Salmonella*, incluyendo *Salmonella typhimurium*, especies de *Listeria*, especies de *Shigella*, especies de *Aeromonas*, virus intestinales, especialmente el rotavirus y parásitos eucariotas intestinales que incluyen la especie *Entamoeba*. Estos otros agentes patógenos intestinales tienen perfiles de unión similares a los de *E. coli* causante de diarrea, como se demuestra, por ejemplo, en estudios con patrones de hemaglutinación de varios glóbulos rojos. Los otros agentes patógenos viven en un entorno similar y usan, al menos parcialmente, los mismos receptores que la *E. coli* causante de diarrea.

Muchas infecciones, por ejemplo intestinales y pulmonares, implican varios agentes patógenos. Estas infecciones son difíciles de tratar y se pueden cronificar. Muchas diarreas y enfermedades pulmonares que al principio pueden ser infecciones leves pueden llegar a ser formas letales de la enfermedad. Las enfermedades complicadas suelen estar causadas por la coinfección de varios agentes patógenos. Se prefiere especialmente usar las composiciones de carbohidratos para el tratamiento de dos o más agentes patógenos que infectan o se considera que infectan al paciente. Las composiciones según la invención se pueden utilizar para inhibir simultáneamente dos o más agentes patógenos del grupo formado por bacterias patógenas, toxinas, virus, hongos o parásitos. Con mayor preferencia, las composiciones según la presente invención inhiben simultáneamente al menos dos agentes patógenos del grupo formado por bacterias patógenas, toxinas y virus. Una combinación preferida de toxinas y agentes patógenos incluye toxinas de *Escherichia coli* y bacterias *Escherichia coli*. Las proteínas tóxicas comprenden uno o usualmente varios sitios de lectinas presentados de forma oligomérica ordenada. Por ejemplo, las toxinas bacterianas tales como la toxina del cólera o las toxinas tipo shiga contienen cinco dominios de lectina en un pentámero proteico en forma de anillo. En las superficies bacterianas, las lectinas de adhesión o adhesinas se presentan de forma polivalente. Los carbohidratos bacterianos representan también epítomos de hidratos de carbono bioactivos en forma de conjugados polivalentes de gran tamaño como exopolisacáridos o polisacáridos capsulares o lipopolisacáridos o peptidoglicanos o similares. No se describe ningún inhibidor efectivo para dos o más representaciones diferentes de lectina. Los conjugados polivalentes u oligovalentes preferidos son conjugados especiales de carbohidratos.

Según la presente invención también se prefiere inhibir simultáneamente dos agentes patógenos diferentes. En una forma de ejecución preferida, la presente invención se refiere al tratamiento de la coinfección por un virus y una bacteria. Preferiblemente, la bacteria o bacterias pertenecen a la especie *Escherichia* y con mayor preferencia son una *Escherichia coli* causante de una diarrea.

Las superficies y los mecanismos de adhesión de los virus y las bacterias son diferentes. La superficie viral contiene lectinas infecciosas en estructuras superficiales ordenadas sobre una superficie relativamente pequeña y curvada, mientras que la superficie bacteriana, más grande, contiene lectinas adhesivas generalmente en estructuras lineales ordenadas como pili o flagelos. Por tanto una prevención simultánea eficaz contra virus y bacterias es especialmente difícil. La presente invención describe el uso de composiciones o sustancias oligovalentes o polivalentes especiales que pueden servir para el tratamiento de las coinfecciones por virus y bacterias. Las sustancias o composiciones oligovalentes o polivalentes comprenden preferiblemente los carbohidratos activos en conjugados especiales de carbohidratos capaces de inhibir las uniones de dos o más presentaciones diferentes de lectina en la superficie o en las superficies del agente patógeno.

Uso de las secuencias oligosacáridas receptoras solas o en combinaciones para la nueva indicación de carbohidratos

Se comprende que las secuencias oligosacáridas receptoras se pueden emplear como o en sustancias únicas para terapias u otras aplicaciones relacionadas con la *E. coli* causante de diarrea. La presente invención describe una nueva indicación general de diarrea causada por uno de los cinco tipos principales de *E. coli* causante de diarrea, en concreto EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotóxigena), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva) e incluso por cepas de *E. coli* de tipo natural, no tipificadas o tipificables, causantes de diarrea.

Conforme a la presente invención, los oligosacáridos receptores según la presente invención se pueden usar como sustancias únicas o como partes de sustancias únicas para el tratamiento de infecciones causadas por cualquier tipo de *E. coli* causante de diarrea y en una forma de ejecución preferida para el tratamiento de infecciones causadas por todos los cinco tipos principales *E. coli* causante de diarrea, según una forma de ejecución más preferida para el tratamiento de infecciones causadas por al menos cuatro, y según otra forma de ejecución por al menos tres, de los principales tipos de *E. coli* causante de diarrea. Las secuencias oligosacáridas también se prefieren para preparar composiciones terapéuticas destinadas al tratamiento de diarreas provocadas por varios tipos de *E. coli* causantes de diarrea, en caso de que se haya propuesto una primera indicación para una secuencia de oligosacáridos. Cuando las secuencias oligosacáridas se usan solas, la terapia no es tan efectiva como mediante el empleo combinado de

las secuencias oligosacáridas conforme a la presente invención. Como la indicación general del uso de sustancias carbohidratadas contra las infecciones provocadas por todos o los principales tipos de *E. coli* causantes de diarrea es nueva e inventiva, el uso de combinaciones de las secuencias oligosacáridos receptoras todavía es más nuevo e inventivo.

5

Uso de los oligosacáridos receptores más novedosos solo para terapias

En el estado técnico anterior se han propuesto varias secuencias oligosacáridas como inhibidores de tipos concretos *E. coli* causantes de diarrea. Los datos incluyen resultados contradictorios y no permiten ver cuál de las sustancias se podría emplear sola. El estado técnico anterior no demuestra la importancia de la posible unión, incluso respecto al uso terapéutico de una única especificidad de unión para producir inhibidores de la unión de agentes patógenos mediada por carbohidratos. El trabajo previo no satisface los criterios primarios simples de la unión terapéuticamente más relevante a los carbohidratos. La unión de agentes patógenos mediada por carbohidratos podría considerarse terapéuticamente útil

15

- 1) si una cierta cepa bacteriana patógena (o de célula patógena) tiene una especificidad de unión reproducible y
- 2) la especificidad de unión está presente en el agente patógeno y
- 3) la correspondiente secuencia oligosacárida receptora está presente en el tejido diana relevante y
- 4) la secuencia oligosacárida receptora relevante del tejido diana está disponible para las especificidades de unión del agente patógeno.

20

Al considerar la utilidad de los tratamientos terapéuticos se deben determinar los efectos de la posible secuencia oligosacárida inhibidora. La presente invención muestra sustancias y composiciones útiles para la inhibición de los agentes patógenos. El estado técnico anterior acerca de las posibles uniones no permite determinar los inhibidores efectivos de la unión de agentes patógenos según la presente invención. La presente invención indica por primera vez lacto-receptores, neolacto-receptores y receptores de fucosilo, de ácido siálico y de manosa de primer contacto relevantes para *E. coli* causante de diarrea en el tracto gastrointestinal humano. El receptor de lactosilceramida y los receptores Gala4Gal para la unión a los tejidos de la *E. coli* causante de diarrea no ha sido descrito anteriormente, ni tampoco la unión específica de Gal β 3Ga1NAc. Los métodos descritos anteriormente para las toxinas no curan la enfermedad, solamente pueden aliviar los síntomas de la enfermedad producida por cepas específicas de *E. coli*. La presente invención se refiere al empleo de los siguientes grupos de secuencias oligosacáridas según la presente invención, también como sustancias únicas o como parte de sustancias únicas, para el tratamiento de indicaciones generales y específicas de las diarreas causadas por *E. coli*.

25

30

35

- a) Receptores de lactosilceramida
- b) Receptores Gal β 3Ga1NAc
- c) Receptores Gala
- d) Lacto-receptores, preferiblemente receptores Gal β 3GlcNAc β 3Gal
- e) Neolacto-receptores, preferiblemente receptores (GlcNAc β)₀ o Gal β 4GlcNAc β 3Gal
- f) Receptores de fucosilo
- g) Receptores de ácido siálico
- h) Receptores de manosa

40

Las secuencias oligosacáridas también se prefieren para la preparación de composiciones terapéuticas destinadas al tratamiento de las diarreas provocadas por varios tipos de *E. coli* causantes de diarrea, en caso de que se haya propuesto una primera indicación para una secuencia oligosacárida. Cuando las secuencias oligosacáridas se usan solas, la terapia no es tan efectiva como con el empleo de las combinaciones de secuencias oligosacáridas según la presente invención. La importancia de las secuencias oligosacáridas específicas según la presente invención es que también amplía la metodología con el empleo de combinaciones específicas de las secuencias oligosacáridas. Las secuencias oligosacáridas relevantes también se pueden utilizar como inhibidores monovalentes y polivalentes, tal como se describe en la presente invención.

50

Secuencias oligosacáridas receptoras preferidas para la terapia, prevención o tratamiento en relación con indicaciones independientes de *E. coli* diarrea

55

Sustancias y composiciones novedosas y preferidas para ser usadas contra infecciones por EHEC

La presente invención también se refiere al tratamiento de las enfermedades causadas por *Escherichia coli* enterohemorrágica. Anteriormente se han descrito sustancias que comprenden Gala4Gal para bloquear la toxina de *E. coli* similar a Shiga. Anteriormente no se han descrito métodos especiales de uso de varias secuencias oligosacáridas para bloquear la unión de las bacterias. En la presente invención se analizaron varias cepas de EHEC. Se encontró un perfil especial de especificidades de unión preferidas. Según la presente invención, estas especificidades son las preferidas para el tratamiento de EHEC entre el grupo de ocho especificidades. Para el tratamiento de infecciones causadas por EHEC se prefieren las sustancias que incluyen las siguientes secuencias oligosacáridas: receptores de lactosilceramida, ganglio-receptores, lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de fucosa y receptores de manosa, con mayor preferencia los receptores de lactosilceramida, los lacto-receptores, los neolacto-receptores y

65

los receptores de fucosa. Las sustancias también se prefieren en composiciones que comprendan al menos dos secuencias oligosacáridas receptoras, tal como se describe en la presente invención.

Se advierte que las secuencias oligosacáridas se pueden usar junto con secuencias oligosacáridas bloqueantes de toxinas tales como los receptores Gala4Gal de toxina tipo shiga. Se han descrito varios oligosacáridos oligovalentes y polivalentes como inhibidores efectivos de las toxinas, sobre todo cuando se usan las secuencias Gal α 4Gal β 4Glc y de tipo Gal α 4Gal β 4GlcNAc. Ateniéndose a estudios previos, el bloqueo de las toxinas no basta por sí solo para que el tratamiento sea eficaz. Según la presente invención, los oligosacáridos Gala4Gal no son receptores principales para la adhesión de EHEC y para un tratamiento eficaz.

En una forma de ejecución preferida, para la prevención, tratamiento o diagnóstico de EHEC se usa al menos uno de los receptores del grupo de lacto-receptores, neolacto-receptores y receptores de fucosa. Con mayor preferencia se usan al menos dos de estos receptores. También se prefiere usar al menos tres o al menos cuatro receptores.

Estos receptores son preferidos por la mayor especificidad hacia el organismo patógeno. Se prefiere especialmente el uso de las formas de gran afinidad de los receptores escogidos del grupo formado por: lacto-receptores, neolacto-receptores y receptores de fucosa. La presente invención también se refiere al tratamiento de las infecciones por EHEC mediante el bloqueo de los receptores de primer contacto de adhesión de EHEC al epitelio gástrico humano, usando en concreto al menos uno de los receptores seleccionados del grupo formado por lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de fucosa y receptores de manosa. Con mayor preferencia se usan al menos dos de estos receptores. En otra forma de ejecución, al menos uno de los receptores de primer contacto y con mayor preferencia al menos dos de los receptores de primer contacto se usan junto con al menos uno de los receptores de segundo contacto del grupo de lacto-receptores o ganglio-receptores. En una forma de ejecución preferida se emplea una variante de gran afinidad de las secuencias oligosacáridas receptoras preferidas según la presente invención.

Sustancias y composiciones novedosas y preferidas para ser usadas contra infecciones por EPEC

La presente invención también se refiere al tratamiento de las enfermedades causadas por *Escherichia coli* enteropatógena. Se han propuesto varias especificidades de unión no identificadas para EPEC, pero su utilidad terapéutica no ha sido demostrada. La importancia de las uniones a la infección no ha sido demostrada y los datos previos no permiten definir composiciones o sustancias útiles entre las señaladas. Los informes son contradictorios y algunos informes indican que las sustancias no serían útiles para el tratamiento. Los métodos de uso de varias secuencias oligosacáridas, en concreto para bloquear la unión de las bacterias, no se han descrito anteriormente. En la presente invención se analizaron varias cepas de EPEC. Para el tratamiento de las infecciones por EPEC se prefieren las sustancias que llevan las siguientes secuencias oligosacáridas: receptores de lactosilceramida, receptor Gala4Gal, receptores de ácido siálico, neolacto-receptores de gran afinidad y nuevos ganglio-receptores.

Se revelan receptores de gran afinidad que comprenden secuencias oligosacáridas terminales según la fórmula



en la cual n_1 , n_2 , n_3 y n_4 son independientemente el número entero 0 o 1; cuando n_1 es 1 el GlcNAc terminal de la fórmula puede estar además sustituido por otros restos monosacáridos u oligosacáridos, preferiblemente por Gal β 4 o GlcNAc β 3Gal β 4, con la condición de que al menos n_4 es 1 o n_1 es 1.

Los nuevos ganglio-receptores según la presente invención comprenden el disacárido terminal Gal β 3GalNAc con la condición de que preferiblemente el disacárido no esté unido a lactosa por β 4. El epítipo disacárido es en general más barato de producir que el epítipo tetrasacárido. Con mayor preferencia la secuencia oligosacárida es Gal β 3GalNAc β , con la condición de que el epítipo disacárido no esté unido por β 4a lactosa o a Gal β 3GalNAc β 4Gal y con la condición de que el extremo reductor Gal no esté unido por β 4 a glucosa. Las secuencias terminales disacáridas y trisacáridas no han sido descritas anteriormente como receptores de bacterias *E. coli* causantes de diarrea ni como receptores de bacterias EPEC. Su empleo se prefiere a los receptores tetrasacáridos conocidos porque su síntesis es más rentable.

Las sustancias también se prefieren en composiciones que lleven al menos dos de las secuencias oligosacáridas receptoras descritas por la presente invención.

La presente invención se refiere en concreto a la inhibición de la unión de EPEC y a la terapia contra las infecciones por EPEC, usando al menos una secuencia oligosacárida inhibidora de EPEC preferida escogida del grupo formado por: receptores de lactosilceramida, receptores Gala4Gal, lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de ácido siálico y receptores de fucosa; y con mayor preferencia escogidos del grupo: receptores Gala4Gal, lacto-receptores, neolacto-receptores y receptores de fucosa, cuando los receptores son como los descritos por la presente invención. Además, la presente invención se refiere a la inhibición de la unión a EPEC y a la terapia contra infecciones por EPEC utilizando composiciones que comprenden al menos dos o al menos tres de las secuencias de oligosacáridos preferidas según la presente invención.

En una forma de ejecución preferida se emplea una variante de las secuencias oligosacáridas receptoras de gran afinidad, preferidas según la presente invención. También es preferible usar receptores monovalentes y conjugados receptores polivalentes según la presente invención respecto a la EPEC.

5 La presente invención también se refiere a la combinación de las secuencias oligosacáridas receptoras que se usan en la terapia contra la EPEC junto con una secuencia o secuencias oligosacáridas capaces de inhibir el receptor de íntima involucrado en la etapa posterior de la cascada de infección. Se ha descrito que los receptores de íntima son oligosacáridos que tienen la estructura terminal $Fu\alpha 2Gal$, especialmente de fucosil-lactosa $Fu\alpha 2Gal\beta 4Glc$ y $Fu\alpha 2Gal\beta 4GlcNAc\beta 3Gal\beta 4Glc$.

10

Sustancias y composiciones novedosas y preferidas para ser usadas contra infecciones por ETEC

La presente invención también se refiere al tratamiento de las enfermedades causadas por *Escherichia coli* enterotoxigénica. Se han propuesto varias especificidades de unión no identificadas para ETEC, pero su utilidad terapéutica no ha sido demostrada. La importancia de las uniones a la infección no ha sido demostrada y los datos previos no permiten definir composiciones o sustancias útiles entre las señaladas. Los informes son contradictorios y algunos informes indican que las sustancias no serían útiles para el tratamiento. Los métodos de uso de varias secuencias oligosacáridas, en concreto para bloquear la unión de las bacterias, no se han descrito anteriormente. En la presente invención se analizaron varias cepas de ETEC. Para tratar las infecciones por ETEC se prefieren las sustancias que comprenden las siguientes secuencias oligosacáridas: receptores de lactosilceramida, receptores $Gala4Gal$, lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de ácido siálico, receptores de fucosa y los nuevos ganglio-receptores.

Con mayor preferencia, para el tratamiento o el diagnóstico de ETEC se elige al menos una secuencia oligosacárida del grupo receptores $Gala4Gal$, lacto-receptores, neolacto-receptores y receptores de fucosa, cuando los receptores son como los descritos por la presente invención. Además la presente invención se refiere a la inhibición de la unión de ETEC y a la terapia contra las infecciones por ETEC mediante el uso de composiciones que contienen al menos dos o al menos tres de las secuencias oligosacáridas según la presente invención.

En una forma de ejecución preferida se emplea una variante de las secuencias oligosacáridas receptoras de gran afinidad, preferidas según la presente invención.

También se prefiere el empleo de receptores monovalentes y conjugados receptores polivalentes según la presente invención respecto a la ETEC.

Sustancias y composiciones novedosas y preferidas para ser usadas contra infecciones por EAEC

La presente invención describe nuevas especificidades de unión para *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). Se comprende que las sustancias que llevan las secuencias oligosacáridas según cada una de las ocho especificidades de unión de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de infecciones causadas por EAEC o para el diagnóstico de la EAEC, incluso como sustancias únicas. La presente invención también se refiere especialmente al uso de uno de los receptores del grupo constituido por receptores $Gala4Gal$, lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de ácido siálico y receptores de manosa para el tratamiento de infecciones causadas por EAEC o para el diagnóstico de la EAEC. Con mayor preferencia se usan al menos dos de estos receptores, porque poseen una mayor especificidad hacia el organismo patógeno. Se prefiere especialmente el uso de las formas preferidas o altamente afines del receptor o receptores elegidos del grupo formado por lacto-receptores, neolacto-receptores y receptores de fucosa.

La presente invención también se refiere al tratamiento de las infecciones por EAEC mediante el bloqueo de los receptores de primer contacto de la adhesión de CEEA al epitelio gástrico humano, sobre todo mediante el uso de al menos uno de los oligosacáridos receptores elegidos del grupo: lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de fucosa, receptores de ácido siálico y receptores de manosa. Con mayor preferencia se usan al menos dos de los receptores. En otra forma de ejecución se emplea al menos uno de los receptores de primer contacto y con mayor preferencia al menos dos de los receptores de primer contacto junto con al menos uno de los receptores de segundo contacto del grupo formado por receptores $Gala4Gal$, receptores de lactosilceramida y ganglio-receptores.

En una forma de ejecución preferida se emplea una variante de las secuencias oligosacáridas receptoras de gran afinidad, preferidas según la presente invención.

También se prefiere el empleo de receptores monovalentes y conjugados receptores polivalentes según la presente invención respecto a la EAEC.

Sustancias y composiciones novedosas y preferidas para ser usadas contra infecciones por EIEC

La presente invención describe nuevas especificidades de unión para la *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC). Se comprende que las sustancias que llevan las secuencias oligosacáridas según cada una de las ocho especificidades de unión de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de infecciones causadas por EIEC o para el

diagnóstico de EIEC, incluso como sustancias únicas. La presente invención también se refiere especialmente al uso de al menos uno de los receptores elegidos del grupo: receptores Gala4Gal, lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de ácido siálico, receptores de fucosa o receptores de manosa para el tratamiento de las infecciones causadas por EIEC o para el diagnóstico de la EIEC. Con mayor preferencia se emplean al menos dos de estos receptores. Estos son preferidos debido a una mayor especificidad hacia el organismo patógeno. Sobre todo se prefiere el uso de las formas altamente afines de los receptores del grupo formado por lacto-receptores, neolacto-receptores y receptores de fucosa.

La presente invención también se refiere al tratamiento de las infecciones por EIEC mediante el bloqueo de los receptores de primer contacto de la adhesión de EIEC al epitelio gástrico humano, sobre todo mediante el uso de al menos uno de los oligosacáridos receptores elegidos del grupo: lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de fucosa, receptores de ácido siálico y receptores de manosa. Con mayor preferencia se usan al menos dos de estos receptores. En otra forma de ejecución se usa al menos uno de los receptores de primer contacto y con mayor preferencia al menos dos de los receptores de primer contacto junto con al menos uno de los receptores de segundo contacto del grupo formado por receptores Gala4Gal, receptores de lactosilceramida y ganglio receptores.

En una forma de ejecución preferida se emplea una variante de las secuencias oligosacáridas receptoras de gran afinidad, preferidas según la presente invención.

También se prefiere el empleo de receptores monovalentes y conjugados receptores polivalentes según la presente invención respecto a la EIEC.

Uso de los métodos y composiciones según la presente invención para terapias de animales

En una forma de ejecución específica la presente invención se usa para el tratamiento de las infecciones del ganado o de animales de compañía. Las especificidades de unión de las bacterias que infectan a los animales son diferentes de las de los agentes patógenos humanos. Sin embargo los mecanismos generales que usan varias especificidades al mismo tiempo y el uso de conjugados polivalentes, especialmente de conjugados polivalentes solubles según la presente invención, también se prefieren para su empleo con los animales. Las especificidades de unión también son en parte reacciones cruzadas y algunas de las combinaciones receptoras descritas por la presente invención también son útiles para las terapias animales, y algunas cepas bacterianas se diseminan desde animales como las vacas. Según la presente invención, varias de las secuencias oligosacáridas receptoras se encuentran en el tracto gastrointestinal de animales tales como gatos y perros e incluso en cerdos. La reactividad cruzada entre una especie animal específica o entre un humano y un animal concreto para una determinada cepa no puede conocerse antes de analizar las especificidades de unión. Las bacterias *E. coli* más comunes, causantes de infecciones en animales, como las cepas K99 o K88, no infectan a los humanos.

La presente invención se refiere especialmente a la prevención de la transferencia de las infecciones de animales a seres humanos y viceversa. Esta transferencia es un mecanismo importante en la patogénesis de muchas diarreas, como las enfermedades causadas por EHEC, incluyendo la llamada enfermedad de las hamburguesas. Cuando se transfiere ganado o productos alimenticios de ganado o de mascotas u otros animales entre países, también existen riesgos de propagación de enfermedades infecciosas como la diarrea.

Sustitución de antibióticos tradicionales

La necesidad de terapias antiinfecciosas para animales es urgente, ya que el uso de antibióticos tradicionales no es aceptable e incluso se está prohibiendo. Las terapias pretenden reemplazar total o parcialmente los antibióticos tradicionales en la nutrición y en los tratamientos de los animales.

La presente invención indica secuencias receptoras que también se describen para animales que viven cerca de los humanos y que posiblemente intervienen en la transferencia de la infección del ganado a los humanos. La presente invención también demuestra la unión real de bacterias *E. coli* causantes de diarrea humana a glicolípidos animales.

Algunos de los receptores glicolípidos son iguales entre los tejidos intestinales de animales y humanos. La presente invención también se refiere a los receptores que son específicos de animales, a los receptores específicos de varios animales o a los receptores específicos más comunes de animales. Los animales preferidos a los que se refiere la presente invención son ganado mayor o animales de granja tales como vacas y otros rumiantes domésticos, cerdos, ovejas, caballos, aves de corral, incluyendo por ejemplo gallinas, patos y pavos, y conejos o animales de compañía tales como perros, gatos o especies de roedores, incluyendo ratones y ratas o hámsters o conejillos de indias. La mayoría de los animales corrientes de compañía también se puede usar como animales de laboratorio, cuya salud es importante para los ensayos. Los animales también pueden necesitar terapia en la naturaleza o en las reservas o en zoológicos, por ejemplo. Los primates, sobre todo los chimpancés y los monos, están especialmente en riesgo de ser infectados por agentes patógenos humanos, puesto que son los animales más semejantes a los humanos. Las especies animales más preferidas para ser tratadas según la presente invención son perros, gatos, cerdos y vacas.

La presente invención también se refiere a la búsqueda de receptores específicos de animales para las bacterias causantes de diarrea.

Las secuencias oligosacáridas que llevan ácido N-glicolil-neuramínico son en general específicas de los animales, pues los enzimas biosintéticos que producen esta estructura no están presentes en los humanos. Los receptores humanos que comprenden este monosacárido se sintetizan probablemente a partir del monosacárido resultante de los alimentos de origen animal. El NeuGc es un monosacárido común en muchos animales. Los glicopéptidos que comprenden este monosacárido se han empleado contra la diarrea en terneros contra la *E. coli* K99 específica de los animales. La presente invención describe varias secuencias de NeuGc-oligosacáridos que se pueden emplear en animales cuando el animal está infectado por *E.coli* de reactividad cruzada.

Aplicaciones ex vivo de la presente invención

Se advierte que la presente invención se puede emplear para la inhibición de agentes patógenos, especialmente de la *E. coli ex vivo* causante de diarrea, y dicho método tiene uso en aplicaciones de desinfección y preservación. Se prefiere usar las secuencias oligosacáridas receptoras según la presente invención como parte de sustancias únicas o como sustancias únicas o más preferiblemente como composiciones que comprenden al menos dos secuencias oligosacáridas receptoras de diferentes grupos según la presente invención, para inhibir agentes patógenos, sobre todo *E. coli ex vivo*. Los conjugados polivalentes conforme a la presente invención, especialmente los conjugados polivalentes solubles capaces de aglutinar agentes patógenos, preferiblemente *E. coli* diarreico, se prefieren para usos *ex vivo*. Una forma de ejecución especial *ex vivo* de la presente invención es la limpieza o la desinfección de superficies, p.ej. de mesas, dispositivos médicos y envases, en un entorno hospitalario o similar, con un limpiador o desinfectante que incluya las secuencias oligosacáridas receptoras descritas en la presente invención. Los sacáridos receptores descritos por la presente invención también se pueden usar como ingredientes en un jabón o detergente utilizado para lavar o bañar a pacientes en un hospital o entorno hospitalario.

Infecciones orales o productos de salud oral

Se comprende que las infecciones objeto de la presente invención se propagan por vía oral, posiblemente también desde la nariz hasta la cavidad oral. Se revela la prevención de las infecciones ya existentes en la boca del hombre.

Se describe el tratamiento de infecciones orales mediante al menos dos secuencias oligosacáridas distintas capaces de inhibir al menos dos especificidades de unión diferentes del agente patógeno, preferiblemente de la bacteria que infecta oralmente y con mayor preferencia de una bacteria causante de diarrea. Se revela el uso de las secuencias oligosacáridas receptoras descritas como parte de sustancias únicas o como sustancias únicas o como composición que lleva al menos dos secuencias oligosacáridas receptoras de diferentes grupos según la presente invención para la inhibición de infecciones orales o nasales. Se revela que las secuencias oligosacáridas receptoras descritas se emplean como composiciones o como sustancias únicas en productos inhibidores de agentes patógenos en la boca humana, llamados aquí productos de higiene bucal.

Se revela que la boca humana comprende receptores similares a los del intestino humano, especialmente al menos neolacto-receptores, receptores de manosa y receptores de oligosacáridos parecidos a los receptores de fucosa en proteínas. Las sustancias y las composiciones descritas también sirven para inhibir agentes patógenos causantes de caries. Las composiciones se describen para el tratamiento de otras infecciones que se extienden por vía oral, como las infecciones que producen otitis media o infecciones pulmonares, incluyendo gripe, bronquitis o neumonía. Los productos de higiene bucal revelados también pueden utilizar contra caries, otitis media, bronquitis y neumonía. Se revela que una composición para usar en productos de higiene bucal o para inhibir un agente patógeno de infección oral incluye al menos las secuencias oligosacáridas NeuSAc α 3Gal β 4GlcNAc y/o Neu5Ac α 3Gal β 4Glc o con mayor preferencia Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc y/o Neu5Ac α 6Gal β 4Glc y se emplea al menos contra virus de la gripe humana, preferiblemente para profilaxis del virus de la gripe.

Se revelan productos de higiene bucal consistentes en sustancias o composiciones que comprenden secuencias oligosacáridas inhibitoras de agentes patógenos, especialmente secuencias oligosacáridas. El producto de higiene bucal se escoge preferiblemente del grupo formado por dentífricos, colutorios, tabletas bucales, pastillas masticables y chicles. Se prefiere el uso de secuencias oligosacáridas receptoras monovalentes o polivalentes. Se revela que el producto de higiene bucal comprende secuencias oligosacáridas polivalentes. Debido al tamaño de la boca humana y al volumen de líquido salival en su superficie, una cantidad relativamente pequeña de oligosacáridos basta para obtener unos valores de concentración saturada de los receptores que inhiben agentes patógenos en la boca. Las cantidades típicas descritas de epítomos monovalentes activos en el receptor varían aproximadamente de 100 nmol a 100 μ mol del oligosacárido receptor activo (para un peso molecular de 1000 Da serían 100 μ g hasta 100 mg). De manera más general se estima que las cantidades útiles están comprendidas aproximadamente entre 1-10 μ mol. Se revela que la composición terapéutica también se usa para los aerosoles nasales inhibidores de agentes patógenos.

Los pulverizadores nasales revelados se pueden usar contra la otitis media o contra las infecciones pulmonares.

Productos tópicos de limpieza y cosmética

Se expone que los agentes patógenos comunes se pueden diseminar por superficies del cuerpo humano tales como la piel, el epitelio genital, el cabello, por superficies del hogar y otras superficies del entorno humano. Las secuencias oligosacáridas reveladas también son útiles para la prevención frente a los agentes patógenos en estos entornos. Se revela el uso de las secuencias oligosacáridas según la presente invención como sustancias únicas, como parte de sustancias únicas o como composiciones que comprenden al menos dos secuencias oligosacáridas receptoras de diferentes grupos en productos tópicos o cosméticos, por ejemplo como cremas, lociones o geles. Se revela el uso de dichas sustancias o composiciones en productos destinados a la limpieza de la piel humana, del cabello o de los epitelios genitales (que también pueden denominarse productos de higiene personal) o para superficies domésticas, vajilla o ropa. Se han destinado antibióticos tradicionales al uso en soluciones de limpieza doméstica, pero no sirven debido a problemas de resistencia que son improbables con el empleo de las sustancias reveladas. Se revela el uso de secuencias oligosacáridas polivalentes y de secuencias oligosacáridas monovalentes en soluciones de limpieza.

Productos de seguridad alimentaria destinados a productos alimentos o piensos, refrescos, bebidas y agua

Además de sus aplicaciones terapéuticas en humanos o en animales, la presente invención también se refiere al uso de receptores y composiciones según la presente invención para prevenir infecciones, empleándola para neutralizar agentes patógenos o bacterias en el interior o en la superficie de productos alimenticios. Los carbohidratos según la presente invención pueden aplicarse, por ejemplo, sobre las superficies de los productos cárnicos o de los cuerpos de animales y sobre partes del cuerpo durante la producción de carne, con el fin de evitar la propagación de agentes patógenos. Se prefiere el uso de conjugados solubles y de otros conjugados polivalentes para recubrir y aglutinar las bacterias. Un método específico de aplicación a una superficie de un producto alimenticio sólido o semisólido implica la puesta en contacto de las bacterias con los receptores de carbohidrato descritos en la presente invención y de modo opcional la eliminación por lavado de los complejos formados entre los carbohidratos y los agentes patógenos.

Este tipo de método no es aceptable con antibióticos tradicionales. Los carbohidratos según la presente invención también se pueden aplicar durante la elaboración de productos alimenticios líquidos o concentrados o en polvo, incluyendo leche y productos lácteos líquidos, diversas bebidas, incluyendo zumos, refrescos, bebidas deportivas, bebidas alcohólicas y similares.

En una forma de ejecución específica el carbohidrato según la presente invención se aplica en forma polimérica a un producto alimenticio líquido o a una bebida; los potenciales agentes patógenos son aglutinados por el conjugado polivalente y el complejo aglutinado se elimina empleando un método basado en el tamaño o en la solubilidad del complejo. Si los aglutinados insolubles precipitan pueden eliminarse por métodos estándar, como la decantación de la solución por encima del precipitado o, como es más frecuente y efectivo, por métodos de filtración. Los métodos de filtración se pueden usar para eliminar complejos aglutinados más grandes.

Los productos alimenticios preferidos para ser tratados con los carbohidratos según la presente invención incluyen diversos productos de comida para animales, sobre todo productos cárnicos y productos intermedios durante los procesos. Muchos agentes patógenos, incluyendo las bacterias *E. coli* causantes de diarrea, se transmiten de modo efectivo a partir de verduras, frutas, ensaladas y otros alimentos vegetales que no se han lavado adecuadamente.

Los productos alimenticios alimentos que deben lavarse, pero no se lavan adecuadamente o se lavan con agua contaminada, resultan especialmente problemáticos en los países en desarrollo. La presente invención también se refiere a métodos para aumentar la seguridad alimentaria de los alimentos vegetales y de otros alimentos que deben lavarse para controlar la cantidad de agentes patógenos, especialmente de las bacterias *E. coli* patógenas en los productos alimenticios. La presente invención se refiere especialmente a productos para los clientes domésticos y a productos destinados a la industria alimentaria, para prevenir infecciones causadas por los alimentos. El producto está preferentemente en una forma sólida, como polvo o píldoras, o en cápsulas, que contiene soluciones de los receptores según la presente invención aplicables a los productos alimenticios en curso de elaboración. El producto puede usarse para prevenir diarreas en los países en desarrollo, especialmente las diarreas infantiles. El producto de seguridad alimentaria también se destina a la prevención de las diarreas del viajero. Los siguientes productos de seguridad para productos alimenticios y piensos se pueden considerar nuevos conservantes seguros.

Productos filtrantes para purificar bebidas y agua

Las bebidas y el agua contaminadas son la causa principal de las enfermedades gastrointestinales, sobre todo de las diarreas.

Los receptores según la presente invención también se pueden usar en la producción de filtros purificadores para eliminar agentes patógenos, especialmente bacterias, de los alimentos líquidos, bebidas y agua, sobre todo del agua utilizada para beber y preparar comidas. Preferentemente se usan al menos dos estructuras receptoras. Se conocen métodos para producir materiales en fase sólida a los que se conjugan secuencias de carbohidratos para utilizarlos como filtros, por ejemplo de celulosa, de plásticos o de agarosa y materiales similares. Los filtros según la presente invención también incluyen materiales para cromatografía de afinidad conocidos en el estado técnico. Se conocen

métodos para eliminar los materiales unidos de tales filtros; en una forma de ejecución concreta el filtro se regenera eliminando el contaminante y esterilizando opcionalmente el filtro mediante calor u otros medios de esterilización.

Productos de seguridad para piensos

Los productos de seguridad alimentaria descritos anteriormente también pueden aplicarse a los piensos sólidos y líquidos y al agua potable para animales. Los animales que deben ser objeto de protección incluyen preferiblemente animales de compañía, sobre todo gatos y perros, ganado o animales de granja tales como vacas y otros rumiantes domésticos, cerdos, ovejas, caballos, aves de corral, incluyendo por ejemplo gallinas, patos y pavos y conejos.

Análisis de seguridad de agua, productos alimenticios y piensos

Los métodos analíticos y diagnósticos estándar, en combinación con los carbohidratos receptores según la presente invención, se pueden aplicar al agua, bebidas, productos alimenticios y piensos, para medir la presencia de agentes patógenos unidos a los carbohidratos receptores. El conocimiento de las especificidades de unión de los agentes patógenos contaminantes se puede aplicar al diseño de terapias para los pacientes infectados o a los métodos de eliminación o control de agentes patógenos, tal como se ha descrito arriba en el marco de la seguridad alimentaria.

Otras interacciones basadas en carbohidratos que pueden inhibirse según la presente invención

Además de inhibir diferentes tipos de presentaciones de adhesina, la presente invención también se puede usar para inhibir interacciones carbohidrato-carbohidrato e interacciones carbohidrato-lectina.

Las composiciones y sustancias de carbohidrato comprenden secuencias oligosacáridas. Los oligosacáridos inhiben uno o varios agentes patógenos fijando uno o varios de ellos y/o fijando los receptores de uno o varios agentes patógenos. Preferentemente se usan al menos dos secuencias oligosacáridas inhibidoras de agentes patógenos y con mayor preferencia al menos tres secuencias oligosacáridas inhibidoras de agentes patógenos. En otras formas de ejecución se usan al menos cuatro, cinco, seis o siete secuencias oligosacáridas inhibidoras de la patogénesis.

En terapias específicas se administran por separado una o varias de las secuencias oligosacáridas en momentos distintos, lo cual es útil, sobre todo, porque la administración de todas las secuencias oligosacáridas tendría efectos negativos sobre la flora normal. La administración separada de las composiciones terapéuticas también puede ser útil, porque el efecto del estado nutricional en el tracto gastrointestinal podría variar de forma diferente la estabilidad de las secuencias oligosacáridas según la presente invención en el tracto gastrointestinal.

Uso de la presente invención junto con bacterias probióticas

Al aplicar la presente invención para inhibir la unión bacteriana, especialmente las uniones bacterianas múltiples, también se pueden obstaculizar algunas uniones bacterianas beneficiosas. La flora bacteriana normal tiene muchas funciones importantes, por ejemplo en el sistema gastrointestinal humano. De todos modos la destrucción de la flora bacteriana normal es un problema aún mayor con el uso de los antibióticos tradicionales.

En otra forma de ejecución se administran al menos dos oligosacáridos inhibidores de agentes patógenos junto con un microbio probiótico y/o una sustancia prebiótica. El microbio probiótico según la presente invención representa una bacteria inocua con funciones beneficiosas, por ejemplo en la digestión de alimentos, que proporciona nutrientes y vitaminas o que recubre las superficies tisulares de bacterias patógenas. Las bacterias probióticas comprenden preferentemente una, varias o una multitud de floras bacterianas normales. En una forma de ejecución preferida la bacteria probiótica comprende uno o varios tipos, cepas o especies de bacterias de ácido láctico.

La sustancia prebiótica es una sustancia que favorece la flora normal o el microbio probiótico. Las sustancias prebióticas preferidas incluyen carbohidratos prebióticos, tales como oligosacáridos de galactosa, oligosacáridos de xilosa u oligosacáridos de fructosa usados como sustancias prebióticas; las sustancias prebióticas también incluyen polisacáridos y fibras con actividad prebiótica, como la inulina o los almidones modificados. La presente invención también se refiere al empleo de otros polisacáridos que se utilizan en alimentos o con fines nutricionales, como el quitosano o los beta-glucanos, por ejemplo el glucano de avena, que se usan para reducir el colesterol y las grasas. En una forma de ejecución preferida se elige uno o varios carbohidratos inhibidores de patógenos de modo que sean también sustancias prebióticas como carbohidratos con un resto de galactosa unido por enlace beta a un extremo terminal no reductor. En una forma de terapia preferida

- a) primero se eliminan los agentes patógenos y potencialmente parte de la flora normal mediante uno o más, con mayor preferencia mediante al menos dos carbohidratos según la presente invención,
- b) se aplica un microbio probiótico y/o una sustancia prebiótica.

Las etapas 1 y 2 también se pueden realizar en orden inverso, preferiblemente con una gran cantidad del microbio probiótico y/o de la sustancia prebiótica, y después la etapa uno. Según la presente invención también es posible repetir varias veces las etapas 1 y/o 2, variando el orden de las mismas. Las etapas 1 y 2 pueden aplicarse de modo

simultáneo. Las sustancias según la presente invención se pueden administrar junto con microbios probióticos y/o sustancias prebióticas o, alternativamente, se pueden incluir microbios probióticos y/o sustancias prebióticas en las composiciones según la presente invención, y las etapas anteriores 1 y 2 se pueden realizar simultáneamente.

5 Se sabe que algunas de las secuencias oligosacáridas según la presente invención tienen efectos prebióticos; éstas incluyen secuencias oligosacáridas tipo N-acetil-lactosamina y oligosacáridos fucosilados, sobre todo oligosacáridos de la leche humana. La administración de oligosacáridos de leche humana junto con un microbio probiótico y/o una sustancia prebiótica, especialmente N-acetil-lactosamina, que contienen por ejemplo uno o varios oligosacáridos del grupo constituido por Lacto-N-neotetraosa, Lacto-N-tetraosa, Lacto-N-hexosa, Lacto-N-neohexaosa, para-Lacto-N-hexosa, para-Lacto-N-neohexaosa y/u oligosacáridos fucosilados derivados de estos, como Lacto-N-tetraosa (LNT) o Lacto-N-neotetraosa mono- di- o trifucosilada (LNnT) y/u oligosacáridos de fucosil-lactosa tales como 2'-fucosil-lactosa y/o 3-fucosil-lactosa y/o difucosil-lactosa, es una forma de ejecución de la presente invención.

Otras sustancias útiles para usar con las sustancias y/o composiciones según la presente invención

15 Según la presente invención también es útil usar el carbohidrato que previene la patogénesis junto con un inhibidor de glicosidasa.

20 Según la presente invención también es útil usar el carbohidrato que previene la patogénesis junto con una lectina u otra proteína de unión al carbohidrato. La lectina se puede usar para bloquear los receptores de carbohidratos, por ejemplo en los exopolisacáridos bacterianos.

25 Sustancia hidroxilada se refiere a ceramida que comprende ácido graso hidroxilado o preferiblemente un análogo del mismo. El análogo es preferiblemente un espaciador que conjuga la secuencia oligosacárida con el vehículo.

Una composición preferida lleva mezclas de cadenas principales de oligosacáridos de la leche humana tales como LNT y LNnT, y de forma óptima con estructuras alargadas o ramificadas y/o modificaciones de ácido siálico natural y fucosa.

30 En este documento *E. coli* se refiere a la bacteria *Escherichia coli*. Como diana de la presente invención, la *E. coli* o *Escherichia coli* es *E. coli* causante de diarrea o en otras palabras *E. coli* diarreica. La *E. coli* diarreica se refiere a todos los tipos de *E. coli*, incluyendo cepas naturales no tipificadas de *E. coli* que causan diarreas, especialmente a los seres humanos. En formas de ejecución más limitadas la *E. coli* diarreica incluye específicamente los cinco tipos principales de *E. coli* causantes de diarrea, en concreto EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigénica), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva). Las abreviaturas como EHEC también significan múltiples cepas del tipo específico de *E. coli*; las múltiples cepas también pueden ser indicadas por la letra s tras la abreviatura como en "EHECs".

40 En la presente invención los términos "análogo" y "derivado" se definen como sigue. Según la presente invención se pueden diseñar análogos estructurales o derivados de las secuencias oligosacáridas de unión a *Escherichia coli*. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a los análogos estructurales de las sustancias según la presente invención. Los análogos estructurales según la presente invención incluye los elementos estructurales importantes para la unión de la *Escherichia coli* a las secuencias oligosacáridas. Para diseñar análogos estructurales efectivos es importante conocer qué elemento estructural es importante para la unión entre la *Escherichia coli* y los sacáridos.

45 Preferiblemente los elementos estructurales importantes no se modifican o están modificados por miméticos muy similares al elemento estructural importante. Estos elementos incluyen preferiblemente los grupos 4- y 6-hidroxilo del resto Gal β 4 en los epítopos trisacáridos y oligosacáridos. La posición de los enlaces entre las estructuras anulares también es un elemento estructural importante. Para una unión de gran afinidad se prefiere el grupo acetamido o el grupo mimético de acetamido en la posición correspondiente al grupo acetamido del extremo reductor GlcNAc de los epítopos di- o trisacáridos. El grupo mimético del grupo acetamido puede ser otra amida, como por ejemplo alquil-amido, arilamido, amina secundaria, preferentemente N-etilo o N-metilo, O-acetilo u O-alquilo, por ejemplo, O-etilo u O-metilo.

50 Los derivados estructurales según la presente invención son secuencias oligosacáridas según la presente invención modificadas químicamente para retener o incrementar la unión a *Escherichia coli*. Según la presente invención se prefiere derivatizar uno o varios de los grupos hidroxilo o acetamido de las secuencias oligosacáridas. La presente invención se usa para describir varias posiciones de las moléculas que podrían cambiarse al preparar los análogos o los derivados. Los derivados preferidos de las secuencias oligosacáridas receptoras según la presente invención incluyen los derivados del extremo reductor de las secuencias oligosacáridas. Se conocen múltiples métodos de derivatización para unir oligosacáridos a otros carbohidratos, moléculas de aglicón o varios vehículos. El carbono C1 del resto de monosacárido del extremo reductor se puede unir mediante átomos de azufre, carbono o nitrógeno a otros carbohidratos, moléculas de aglicón o diversos vehículos, especialmente vehículos polivalentes. Se pueden usar métodos tales como la aminación reductora, cuando el epítopo de carbohidrato que se une al agente patógeno no se destruye abriendo el resto monosacárido del extremo reductor. También se prefieren los derivados de grupos acetamido. Los grupos acetamido se pueden desacetilar y derivatizar, por ejemplo usando otros ácidos carboxílicos;

los derivados de acetamido se pueden cribar para una mejor unión a los agentes patógenos. Los derivados también se pueden producir a partir de los precursores del oligosacárido que debe derivatizarse, por ejemplo a partir de las secuencias oligosacáridas que comprenden restos de hexosamina. Los métodos de producción de los análogos de oligosacáridos para la unión de una lectina son bien conocidos. Por ejemplo, se han producido numerosos análogos del oligosacárido sialil-Lewis x que representan los grupos funcionales activos en diversas estructuras, véase página 12090 de Sears y Wong 1996. De manera similar, los análogos de oligosacáridos de heparina han sido producidos por Sanofi Corporation e inhibidores miméticos de ácido siálico tales como Zanamivir y Tamiflu (Relenza) para el enzima sialidasa, mediante numerosos grupos. Preferiblemente, el análogo de oligosacárido está construido sobre una molécula que comprende al menos una estructura anular de seis o cinco miembros, con mayor preferencia al menos dos estructuras anulares que comprenden 6 o 5 átomos.

Al mimetizar las estructuras, los anillos monosacáridos pueden ser reemplazados por anillos de ciclohexano o de ciclopentano, por anillos aromáticos, incluyendo el anillo bencénico, estructuras anulares heterocíclicas que además de oxígeno llevan por ejemplo átomos de nitrógeno y azufre. Para bloquear las configuraciones anulares activas las estructuras de anillo pueden estar interconectadas mediante grupos de unión tolerados. Las estructuras miméticas típicas también pueden comprender estructuras análogas a péptidos para la secuencia oligosacárida o parte de ella.

Los efectos de los grupos activos sobre la actividad de unión son acumulativos y la falta de un grupo se podría compensar añadiendo un residuo activo al otro lado de la molécula. El modelado molecular, preferiblemente por medio de un ordenador, se puede usar en la producción de estructuras análogas para las secuencias oligosacáridas de unión a *Escherichia coli* conforme a la presente invención. Los resultados del modelado molecular de varias secuencias oligosacáridas se indican en los ejemplos y los mismos métodos o similares, además de los métodos de RMN y cristalografía de rayos X, se pueden usar en la obtención de estructuras para otras secuencias oligosacáridas según la presente invención. También se observa que los oligosacáridos monovalentes, oligovalentes o polivalentes se pueden activar para que tengan una mayor actividad hacia las lectinas mediante la preparación de derivados del oligosacárido mediante química combinatoria. Cuando la biblioteca se crea sustituyendo uno o algunos restos de la secuencia de oligosacáridos, puede considerarse una biblioteca de derivados; alternativamente, la biblioteca se crea a partir de los análogos de las secuencias oligosacáridas descritas por la presente invención. Se puede construir una biblioteca de química combinatoria sobre el oligosacárido o su precursor o sobre glicoconjugados según la presente invención. Por ejemplo, los oligosacáridos con extremos reductores variables se pueden producir usando la llamada tecnología de carbohidratos. Según una forma de ejecución preferida, una biblioteca de química combinatoria se conjuga con las sustancias de unión a *Escherichia coli* descritas por la presente invención. Según una forma de ejecución más preferida, la biblioteca comprende al menos 6 moléculas diferentes. Dicha biblioteca se prefiere para el ensayo de unión microbiana a las secuencias oligosacáridas según la presente invención. Los aminoácidos o las colecciones de amidas orgánicas están disponibles comercialmente y se pueden usar para sintetizar una biblioteca combinatoria de análogos de acetamido. Un aglutinante de alta afinidad podría identificarse a partir de la biblioteca combinatoria, por ejemplo mediante un ensayo de inhibición en el cual los compuestos de la biblioteca se usan para inhibir la unión bacteriana a los glicolípidos o a los glicoconjugados descritos por la presente invención. Los análogos estructurales y los derivados preferidos conforme a la presente invención pueden inhibir la unión de las secuencias oligosacáridas de fijación de *Escherichia coli* según la presente invención a la *Escherichia coli*.

Epítomos trisacáridos análogos de neolacto-receptores que comprenden glucosa en el extremo reductor

El impedimento estérico por la parte lípida o por la proximidad de la superficie de sílice puede limitar probablemente la medición del epítipo análogo de neolacto GlcNAc β 3Gal β 4Glc en el ensayo actual de CCF. La contribución del monosacárido terminal a la unión indica que podría haber Glc en el extremo reductor del epítipo. Los epítomos trisacáridos con Glc en el extremo reductor se consideran análogos efectivos de la sustancia de unión a *Escherichia coli* cuando están en forma oligovalente o con mayor preferencia en forma polivalente. Una forma de ejecución de la presente invención es la de los sacáridos con Glc en el extremo reductor, los cuales se emplean como sacáridos reductores libres a alta concentración, preferiblemente en el intervalo de 1-100 g/l, con mayor preferencia 1-20 g/l. Se comprende que estos sacáridos pueden tener una actividad menor en el intervalo de concentración de 0,1-1 g/l.

En la presente invención, el receptor de agentes patógenos o el inhibidor de agentes patógenos en otras palabras, especialmente los receptores de la *Escherichia coli* diarreica, se describen como secuencias de oligosacáridos. La secuencia oligosacárida definida aquí puede ser parte de un glicoconjugado natural o sintético, ser un oligosacárido libre o una parte de un oligosacárido libre. Dichas secuencias oligosacáridas se pueden unir a varios monosacáridos u oligosacáridos o polisacáridos en cadenas polisacáridas, por ejemplo si la secuencia sacárida se expresa como parte de un polisacárido bacteriano. Además se conocen numerosas modificaciones naturales de monosacáridos como las ejemplificadas por los derivados O-acetilo o sulfatados de las secuencias oligosacáridas. La secuencia oligosacárida del receptor de *Escherichia coli* aquí definida puede comprender la secuencia oligosacárida descrita como una parte de un glicoconjugado natural o sintético o como un correspondiente oligosacárido libre o como una parte de un oligosacárido libre. La secuencia oligosacárida del receptor de *Escherichia coli* también puede incluir una mezcla de las secuencias oligosacáridas del receptor de *Escherichia coli*. En una forma de ejecución preferida las secuencias oligosacáridas según la presente invención son secuencias de oligosacáridos terminales no reductores, lo cual significa en este caso que las secuencias oligosacáridas no van unidas a otras estructuras monosacáridas u oligosacáridas, excepto opcionalmente a partir del extremo reductor de la secuencia de oligosacáridos. La secuencia

de oligosacáridos, cuando está presente como conjugado, se conjuga preferiblemente desde el extremo reductor de la secuencia oligosacárida, aunque también pueden utilizarse otras posiciones de enlace que son toleradas por la unión del agente patógeno. En una forma de ejecución más concreta, la secuencia oligosacárida según la presente invención se refiere al correspondiente resto de oligosacárido que no está unido por enlaces glicosídicos naturales a otras estructuras de monosacáridos u oligosacáridos. El resto de oligosacárido es preferiblemente un oligosacárido libre o un conjugado o derivado a partir del extremo reductor del resto oligosacárido.

Las secuencias oligosacáridas receptoras de agentes patógenos se pueden sintetizar enzimáticamente mediante glicosiltransferasas o mediante transglicosilación catalizada por los enzimas glicosidasa o transglicosidasa (Ernst y otros, 2000). Las especificidades de estos enzimas y el uso de cofactores se pueden diseñar por ingeniería genética.

Los enzimas modificados específicos se pueden emplear para conseguir una síntesis más efectiva; por ejemplo, la glicosilasa se modifica para llevar a cabo solo la transglicosilación. La síntesis orgánica de los sacáridos y de los conjugados aquí descritos, o de compuestos similares a ellos, es conocida (Ernst y otros, 2000). Los materiales sacáridos se pueden aislar a partir de fuentes naturales y se pueden modificar química o enzimáticamente para dar los compuestos receptores de agentes patógenos. Los oligosacáridos naturales se pueden aislar a partir de la leche producida por diversos rumiantes. Organismos transgénicos, tales como vacas o microbios, que expresan enzimas glicosilantes se pueden usar para la producción de sacáridos.

En otra forma de ejecución la sustancia receptora de los agentes patógenos se puede conjugar con una sustancia antibiótica, preferiblemente con un antibiótico de tipo penicilina, si el oligosacárido no es un asialogangliosacárido o un lacto-receptor o un neolacto-receptor. La sustancia receptora de agentes patógenos dirige el antibiótico al agente patógeno. Esta sustancia conjugada es beneficiosa porque se necesita una menor cantidad de antibiótico para el tratamiento o la terapia contra *Escherichia coli*, lo cual reduce los efectos secundarios del antibiótico. La porción antibiótica del conjugado sirve para matar o debilitar las bacterias, pero el conjugado también puede tener un efecto antiadhesivo, tal como se describe en la presente invención. La presente invención se refiere específicamente a una composición que lleva al menos dos secuencias oligosacáridas receptoras según la presente invención en forma de conjugados con uno o varios antibióticos tradicionales. Las secuencias oligosacáridas receptoras y el antibiótico se pueden unir a un vehículo polivalente. Estas composiciones tienen preferiblemente como objetivo las infecciones gastrointestinales, con mayor preferencia la *E. coli* causante de diarrea.

Las sustancias receptoras de los agentes patógenos, preferiblemente en forma oligovalente o arracimada, pueden usarse para tratar una enfermedad o afección provocada por la presencia del agente patógeno, preferiblemente de la *Escherichia coli* causante de diarrea, empleando dichas sustancias receptoras de *Escherichia coli* para la antiadhesión, es decir, para inhibir la unión de *Escherichia coli* a los epítomos receptores de las células o tejidos diana.

La sustancia o composición farmacéutica de unión a *Escherichia coli* competirá con los glicoconjugados receptores de las células diana para la fijación de las bacterias. Algunas o todas las bacterias se unirán entonces a la sustancia receptora de la *Escherichia coli* en vez de al receptor de las células o tejidos diana. Las bacterias unidas a las sustancias receptoras de *Escherichia coli* se eliminan del paciente (por ejemplo con el transporte del fluido del tracto gastrointestinal), lo cual disminuye los efectos de las bacterias en la salud del paciente. La sustancia empleada es preferiblemente una composición soluble que comprende las sustancias receptoras de *Escherichia coli*. La sustancia se puede unir a un vehículo, que preferiblemente no es una proteína. Cuando se usa una molécula transportadora, varias moléculas de la sustancia receptora de *Escherichia coli* pueden unirse a un vehículo, mejorando la eficacia inhibidora.

En la presente invención se demuestra que la *Escherichia coli* puede fijar varios tipos de secuencias oligosacáridas. Parte de la fijación por cepas específicas puede representar interacciones simbióticas adicionales que no conducen a estados graves. Por lo tanto es posible que para prevenir las enfermedades relacionadas con *Escherichia coli* no sea necesaria la eliminación total de las bacterias. Las bacterias menos patógenas pueden incluso tener un efecto probiótico en la prevención contra cepas más patógenas de *Escherichia coli*.

Según la presente invención es posible incorporar la sustancia receptora de *Escherichia coli*, opcionalmente con un vehículo, a una composición farmacéutica que sirva para el tratamiento de una afección debida a la presencia de *Escherichia coli* en un paciente o para usar la sustancia de fijación de la *Escherichia coli* en un método destinado al tratamiento de tales afecciones. Como ejemplo de afecciones que pueden tratarse según la invención cabe citar las enfermedades gastrointestinales y similares, debidas todas ellas, al menos en parte, a la infección por *Escherichia coli*.

La composición farmacéutica que contiene el receptor de agentes patógenos, preferiblemente la sustancia receptora de la *Escherichia coli* diarreica, también puede incluir otras sustancias, tales como un vehículo inerte, o vehículos, conservantes, etc. farmacéuticamente aceptables, bien conocidos por los especialistas en el sector. El receptor del agente patógeno, preferiblemente la sustancia receptora de la *Escherichia coli* diarreica, se puede administrar junto con otros fármacos tales como los antibióticos empleados contra el agente patógeno o específicamente contra la *Escherichia coli*.

El receptor de los agentes patógenos, preferiblemente la sustancia receptora de la *Escherichia coli* diarreica o la composición farmacéutica que contiene dicha sustancia, se puede administrar de cualquier forma adecuada, aunque se prefiere la administración oral.

5 Las secuencias oligosacáridas receptoras según la presente invención están destinadas a la inhibición de agentes patógenos, en particular de bacterias patógenas, y las secuencias oligosacáridas receptoras también se denominan secuencias oligosacáridas inhibitoras de agentes patógenos. En formas de ejecución más específicas el agente patógeno es la *E. coli* causante de diarrea y los oligosacáridos receptores también se designan como secuencias oligosacáridas inhibitoras de agentes patógenos o como sustancias receptoras de *E. coli*. La denominación de las
10 secuencias específicas de oligosacáridos receptores y otros términos más largos puede variar con el uso de guiones o mayúsculas como primera letra, por ejemplo, "lacto-receptor" y "receptor de lacto" y "Lacto-receptor" y "receptor de Lacto" significan lo mismo.

15 El término "fracción purificada" empleado aquí hace referencia a la fracción de oligosacáridos purificada o aislada a partir de fuentes naturales o sintéticas. En una forma de ejecución preferida, la cantidad de secuencia o secuencias oligosacáridas activas se analiza y/o se controla a partir de la fracción; opcionalmente también se analizan las cantidades de otras estructuras de carbohidrato relacionadas. La fracción purificada tiene una cantidad reducida de sustancias inactivas procedentes de la fuente de la fracción, por ejemplo proteínas, precursores de monosacáridos, lactosa o grasa. Las sustancias potencialmente dañinas, como los productos químicos nocivos de la síntesis, las
20 proteínas alérgicas o las sustancias consideradas éticamente dañinas, debido por ejemplo a razones religiosas o de cultura dietética, se eliminan hasta un nivel que no resulte perjudicial en el producto final. Para su uso médico, la fracción purificada es, ante todo, esencialmente pura (es decir, con una pureza del 98% o más) o, como alternativa, se controlan las sustancias no relevantes de manera que constituyan preferiblemente menos de la mitad de la masa de fracción purificada, con mayor preferencia menos del 20% de la masa de fracción purificada y sobre todo menos
25 del 5% de la masa de la fracción purificada. Según una forma de ejecución preferida de la presente invención, la producción de la fracción purificada a partir de la leche o leches animales implica la eliminación al menos parcial de la proteína y/o grasa láctea. La purificación puede comprender métodos de filtración, tales como la filtración en gel o la ultrafiltración, así como etapas de secado y/o concentración. Para el uso no médico es preferible que la fracción purificada sea básicamente pura o, como alternativa, que las sustancias no relevantes constituyan preferiblemente
30 menos del 95% de la masa de fracción purificada, con mayor preferencia menos del 75% de la masa de fracción purificada y sobre todo menos del 25% de la masa de fracción purificada. La fracción purificada puede usarse como tal o junto con otros ingredientes del producto deseado.

35 El término "tratamiento" empleado aquí se refiere tanto al destinado a la curación o alivio de una enfermedad o de un estado, como al que se lleva a cabo para prevenir el desarrollo de una enfermedad o de un estado. El tratamiento se puede aplicar en caso de afección aguda o crónica.

40 El término "paciente" empleado aquí se refiere a un mamífero humano o no humano necesitado de un tratamiento según la presente invención. La presente invención se refiere en particular al tratamiento de infecciones intestinales, sobre todo de las diarreas, cuando se trata de un paciente humano.

También es posible utilizar el receptor del agente patógeno, preferiblemente la sustancia receptora de la *Escherichia coli* diarreica, para la selección de las sustancias que se unen a la sustancia receptora, por ejemplo para detectar
45 carbohidratos (por interacciones carbohidrato-carbohidrato) que se unen a la sustancia receptora de *Escherichia coli*. La selección puede realizarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad.

Además, es posible usar sustancias que fijen o inactiven específicamente las sustancias receptoras de *Escherichia coli* presentes en los tejidos humanos, evitando así la unión de la *Escherichia coli*. Los ejemplos de tales sustancias incluyen lectinas de plantas tales como *Erythrina cristagalli* y *Erythrina corallodendron* (Teneberg y otros, 1994). En
50 el caso de las personas, debería ser una sustancia de unión adecuada para su uso en humanos, por ejemplo un anticuerpo humanizado o una glicosidasa recombinante de origen humano que no sea inmunógena y pueda escindir el resto o los restos monosacáridos terminales de las sustancias receptoras de *Escherichia coli*. Sin embargo en el tracto gastrointestinal se toleran muchas lectinas de origen natural y glicosidasas que proceden, por ejemplo, de los alimentos.

55 Usos nutricionales en productos alimenticios y piensos

Además, es posible emplear las secuencias oligosacáridas de agentes patógenos o el oligosacárido receptor de *Escherichia coli* como parte de una composición nutricional, incluyendo alimentos y piensos. Se prefiere utilizar las
60 secuencias oligosacáridas receptoras según la presente invención en sustancias conjugadas o como sustancias únicas y con mayor preferencia en composiciones que incluyan al menos dos secuencias oligosacáridas receptoras de diferentes grupos según la presente invención para composiciones nutricionales, alimentos o piensos. Se prefiere usar las secuencias oligosacáridas receptoras de *Escherichia coli* como sustancias o composiciones formando parte del llamado alimento funcional o funcionalizado. Dicho alimento funcional tiene un efecto positivo en la salud de la persona o del animal, porque inhibe o evita la unión de *Escherichia coli* a células o tejidos diana. La sustancia o
65 composición receptora de *Escherichia coli* puede constituir una parte de un alimento definido o de una composición

alimenticia funcional. El alimento funcional puede incluir otros ingredientes alimentarios aceptados por autoridades como la *Food and Drug Administration* [Agencia de alimentos y fármacos] de EE.UU. La sustancia o composición receptora de *Escherichia coli* también se puede emplear como un aditivo nutricional, preferiblemente como un aditivo alimentario o para bebidas, con el fin de producir un alimento o una bebida funcional. El producto alimenticio o el aditivo alimentario también se pueden producir, disponiendo por ejemplo de un animal doméstico, tal como una vaca u otro animal, que produzca la sustancia o la composición receptora de *Escherichia coli* en mayores cantidades, de forma natural en su leche. Esto se puede lograr haciendo que el animal sobreexpresase glicosiltransferasas adecuadas en su leche. Se puede seleccionar y cultivar una cepa o especie específica de un animal doméstico para una mayor producción de la sustancia o composición receptora de *Escherichia coli*. La sustancia o composición receptora de *Escherichia coli* destinada a una composición o aditivo nutricional también puede ser producida por medio de un microorganismo como una bacteria o una levadura.

Es especialmente útil tener la sustancia o composición receptora de *Escherichia coli* formando parte de un alimento infantil, preferiblemente de una fórmula infantil. Muchos bebés son alimentados con fórmulas especiales sustitutivas de la leche humana natural. Estas fórmulas pueden carecer de los oligosacáridos especiales basados en la lactosa de la leche humana, especialmente de los oligosacáridos alargados tales como lacto-N-neotetraosa, Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, lacto-N-tetraosa, Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc y sus derivados. La lacto-N-tetraosa, la lacto-N-neotetraosa, la para-lacto-N-hexosa (Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc y la para-lacto-N-neohexaosa (Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc) así como el Gal β 3Gal β 4Glc son conocidos de la leche humana y, por tanto, se pueden considerar como aditivos o ingredientes seguros en una fórmula infantil. Los oligosacáridos de la leche humana sialilados y/o fucosilados y el oligosacárido de leche de búfala GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, descritos como receptores de agentes patógenos según la presente invención, también se prefieren para los alimentos funcionales y las fórmulas infantiles. Se prefiere usar combinaciones que comprendan al menos dos de los oligosacáridos de la leche. La *Escherichia coli* causante de diarrea es especialmente infecciosa para los lactantes o niños pequeños y, teniendo en cuenta las enfermedades que puede causar posteriormente, es razonable prevenir la infección.

Las concentraciones preferidas de los oligosacáridos de la leche humana en alimentos funcionales para el consumo (por ejemplo en fórmulas infantiles reconstituidas) son similares a las de la leche humana natural. Se advierte que la leche humana natural contiene numerosos oligosacáridos libres y glicoconjugados (que pueden ser polivalentes) que comprenden la(s) secuencia(s) oligosacárida(s) descrita(s) por la presente invención, lo cual permite el empleo de concentraciones de moléculas individuales superiores a las naturales para obtener un mayor efecto inhibitorio contra *Escherichia coli* sin efectos secundarios nocivos. La leche humana natural contiene lacto-N-neotetraosa al menos en el intervalo de 10 - 210 mg/l, con variaciones puntuales (Nakhla y otros, 1999). Por lo tanto la lacto-N-neotetraosa se emplea preferiblemente en alimentos funcionales a un intervalo de concentración de 0,01 hasta 10 g/l, con mayor preferencia de 0,01 hasta 5 g/l, sobre todo de 0,1 hasta 1 g/l. Se pueden usar unas cantidades de lacto-N-tetraosa aproximadamente 2-5 veces mayores. Alternativamente, la concentración total de los sacáridos empleados en los alimentos funcionales es la misma o similar a la concentración total de sacáridos de la leche humana natural que se unen a *Escherichia coli* como las sustancias o composiciones descritas, o que comprenden la secuencia epitópica/oligosacárida de unión indicada en la presente invención.

Las sialil-lactosas y sialil-lactosaminas aparecen en la leche bovina a concentraciones de decenas de microgramos por ml hasta un máximo de casi 5 mg por ml de los tres principales oligosacáridos juntos, NeuNAc α 3Gal β 4Glc, NeuNAc α 6Gal β 4GlcNAc y NeuNAc α 6Gal β 4Glc, en los calostro tempranos (Nakamura y otros, 2003). Para los productos se prefieren cantidades de 0,01 - 10 g/l, con mayor preferencia de 0,01 - 5 g/l, sobre todo de 0,1 - 1 g/l. El NeuNAc α 6Gal β 4Glc aparece en máxima cantidad en la leche bovina y también es preferido como inhibidor efectivo contra la *E. coli* diarreica.

Además de las sustancias o composiciones según la presente invención, las fórmulas infantiles también comprenden otras sustancias utilizadas en fórmulas infantiles tales como fracciones de leches de rumiantes del tipo proteínas de suero de leche o preparados de proteína de soja o hidrolizados de proteínas. La fórmula infantil también puede llevar otros carbohidratos útiles o aceptados para fórmulas infantiles, tales como lactosa u oligosacáridos de galactosa.

Preferiblemente, la formulación nutricional de la presente invención contiene macronutrientes, vitaminas y minerales en las cantidades deseadas para uso particular. Las cantidades de tales ingredientes variarán dependiendo de si la formulación está destinada a bebés, niños o adultos normales y sanos o a sujetos con necesidades especiales, tales como las que acompañan a ciertos estados patológicos (p.ej. en los trastornos metabólicos). Los especialistas en la materia entenderán que los componentes utilizados en una formulación nutricional conforme a la presente invención están semipurificados o purificados. Por semi-purificado o purificado se entiende un material que se ha preparado purificando una sustancia natural o por síntesis. Estas técnicas son bien conocidas del sector (véase p.ej. Code of Federal Regulations for Food Ingredients and Food Processing; Recommended Dietary Allowances [Código de regulaciones federales de ingredientes alimentarios y procesamiento de alimentos; márgenes de tolerancia dietética recomendados], 10ª edición, National Academy Press, Washington D.C., 1989).

En una forma de ejecución preferida la formulación nutricional según la presente invención es un producto nutricional infantil enteral. Por consiguiente, según otro aspecto de la presente invención, se facilita una formulación nutricional adecuada para la alimentación de bebés. Además de los oligosacáridos descritos anteriormente, la fórmula contiene

vitaminas y minerales en las cantidades necesarias para satisfacer los requerimientos nutricionales diarios de los bebés.

5 Los componentes macronutricionales incluyen, por ejemplo, grasas comestibles, carbohidratos y proteínas. Como ejemplos de grasas comestibles cabe citar el aceite de coco, el aceite de soja y los mono y diglicéridos. Ejemplos de carbohidratos son la glucosa, la lactosa de calidad alimentaria (comestible) y el almidón de maíz hidrolizado. Una fuente proteica típica sería por ejemplo la proteína de soja, el suero de leche electrodiализado o la leche desnatada electrodiализada o el suero de leche, o los hidrolizados de estas proteínas, aunque existen otras fuentes proteicas utilizables. Estos macronutrientes se agregarían en forma de compuestos nutricionales comúnmente aceptados en una proporción equivalente a la existente en la leche humana, sobre una base energética, es decir, sobre una base calórica.

15 La fórmula infantil incluiría preferiblemente las siguientes vitaminas y minerales: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, selenio, yodo y las vitaminas A, E, D, C y el complejo B.

La fórmula infantil se puede esterilizar y utilizar posteriormente como un alimento listo para el consumo (LPC) o se puede almacenar en forma de líquido concentrado o en polvo. El polvo se puede preparar, por ejemplo, secando por pulverización la fórmula infantil preparada del modo arriba indicado, y la fórmula se puede reconstituir, por ejemplo, rehidratando el concentrado. Las fórmulas nutricionales infantiles son bien conocidas en el sector y están disponibles en el comercio (por ejemplo, Similac® y Alimentum® de Ross Products Division, Abbott Laboratories).

25 Los ejemplos de composiciones nutricionales según la presente invención incluyen, sin limitarse a ellas, fórmulas infantiles, suplementos dietéticos, sucedáneos dietéticos y composiciones rehidratables, las últimas de las cuales también se pueden considerar composiciones farmacéuticas. Las composiciones nutricionales de particular interés incluyen sin limitarse a ellas las destinadas a la administración de suplementos por vía enteral y parenteral en bebés, las fórmulas infantiles especializadas, los suplementos para personas mayores y los suplementos para personas con dificultades gastrointestinales y/o malabsorción. Ciertamente, los jóvenes, los ancianos y los inmunodeprimidos son particularmente susceptibles de sufrir efectos graves e incluso fatales debidos a las toxinas.

30 Las composiciones nutricionales según la presente invención también se pueden añadir a los alimentos, aunque no haga falta suplementar la dieta. Así, por ejemplo, la composición se puede incorporar a cualquier tipo de alimentos, incluyendo, sin limitarse a ellos, margarinas, mantequillas modificadas, quesos, leche, yogur, chocolate, dulces, tentempiés, aceites de ensalada, aceites para cocinar, grasas para cocinar, carnes, pescado y bebidas.

35 En una forma de ejecución preferida de la presente invención, la composición nutricional es un producto nutricional enteral, con mayor preferencia un producto nutricional enteral pediátrico o para adultos. Esta composición se puede administrar por ejemplo a adultos o niños que sufran problemas gastrointestinales o tengan necesidades especiales debido a estados patológicos crónicos o agudos. La composición producida según la presente invención puede comprender macronutrientes, vitaminas y minerales, tal como se ha descrito arriba. Los macronutrientes pueden estar presentes en proporciones equivalentes a las existentes en la leche humana o sobre una base energética, es decir, sobre una base calórica.

45 Los métodos para preparar fórmulas nutricionales enterales y parenterales, líquidas o sólidas, son bien conocidos del estado técnico. Por ejemplo, la fórmula enteral se puede esterilizar y utilizar posteriormente como un alimento listo para el consumo (LPC) o se puede almacenar en forma de líquido concentrado o de polvo liofilizado. El polvo se puede preparar secando por pulverización la fórmula preparada del modo indicado anteriormente y luego se puede reconstituir rehidratando el concentrado. Las fórmulas nutricionales pediátricas y adultas son bien conocidas del estado técnico y están disponibles en el comercio (por ejemplo Similac®, Ensure®, Jevity® y Alimentum® de Ross Products Division, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio).

50 La densidad energética de las composiciones nutricionales de la presente invención, cuando están en forma líquida, puede variar aproximadamente entre 0,6 Kcal y 3 Kcal por ml. Cuando se encuentran en forma sólida o en polvo, los suplementos nutricionales pueden contener aproximadamente 1,2 hasta más de 9 Kcal por gramo, preferiblemente entre unas 3 y 7 Kcal por g. En general la osmolalidad de un producto líquido debería ser inferior a 700 mOsm y, con mayor preferencia, inferior a 660 mOsm.

60 La fórmula nutricional puede incluir macronutrientes, vitaminas y minerales, tal como se ha indicado arriba, además de los oligosacáridos monovalentes de la presente invención. La presencia de estos componentes adicionales ayuda al sujeto a ingerir los requerimientos diarios mínimos de estos elementos. Además también puede ser conveniente añadir a la composición cinc, cobre, ácido fólico y antioxidantes. Se cree que estas sustancias estimulan un sistema inmunitario estresado y, por tanto, proporcionarán beneficios adicionales al individuo que recibe la composición. Una composición farmacéutica como la descrita anteriormente también se puede complementar con estos elementos.

65 En una forma de ejecución más preferida la composición nutricional, además de antioxidantes y de al menos un oligosacárido monovalente, comprende una fuente de carbohidratos en la que al menos el 5 por ciento en peso del

carbohidrato es oligosacárido indigerible. En una forma de ejecución más preferida la composición nutricional lleva adicionalmente proteína, taurina y carnitina.

Usos diagnósticos y analíticos relacionados con los usos terapéuticos

5 Además, los receptores oligosacáridos de unión a *Escherichia coli* según la presente invención se pueden usar para diagnosticar un estado causado por una infección de *Escherichia coli*. Los usos diagnósticos también incluyen el uso de la sustancia de unión a *Escherichia coli* para tipificar la *Escherichia coli*. La tipificación de la *E. coli* en relación con la unión a los receptores de carbohidrato conforme a la presente invención se puede utilizar para determinar la combinación eficaz de carbohidratos terapéuticos para una cepa específica de *E. coli* diarreica, lo cual puede ser útil para establecer terapias específicas de bajo costo para las infecciones locales, ya que los perfiles de las uniones de carbohidratos a la *E. coli* principal causante de diarrea pueden diferir en distintas ubicaciones geográficas y durante las epidemias.

15 Nuevos receptores unidos a proteínas en el tracto gastrointestinal humano

La presente invención indica nuevos receptores en el tracto gastrointestinal humano. Estos receptores se hallan en las glicoproteínas y por lo tanto se consideran receptores de primer contacto para la infección de agentes patógenos.

20 La presente invención se refiere al empleo de los nuevos receptores unidos a proteínas para analizar la unión de los agentes patógenos al tracto gastrointestinal humano. La presente invención se refiere a la utilización de los nuevos receptores unidos a proteínas para el diagnóstico de los agentes patógenos en el tracto gastrointestinal humano.

Se analizaron muestras de carbohidratos unidos a proteínas, de diferentes puntos de los epitelios gastrointestinales.

25 Los nuevos receptores unidos a proteínas incluyen los lacto-receptores, neolacto-receptores, receptores de fucosilo, receptores de manosa o receptores de ácido siálico según la presente invención. Los nuevos receptores unidos a proteínas se pueden usar para el ensayo de unión como oligosacáridos liberados o derivados de oligosacáridos; alternativamente las secuencias de oligosacáridos unidos a proteínas se pueden usar como glicoproteínas aisladas.

30 Las correspondientes secuencias de oligosacáridos también se pueden producir sintéticamente. Según una forma de ejecución preferida, al menos parte de la estructura central de O-glicanos o N-glicanos del receptor unido a proteínas naturales se incluye en sustancias de diagnóstico o análisis. Sobre todo se prefiere usar la secuencia para analizar la unión de los agentes patógenos al nuevo receptor unido a proteínas, cuando el agente patógeno está infectando la parte del epitelio gastrointestinal en la cual abunda o se halla especialmente el nuevo receptor unido a proteínas.

35 Los nuevos receptores unidos a proteínas se pueden emplear para buscar o diseñar sustancias oligosacáridas análogas. Las sustancias análogas pueden ser terapéuticamente útiles o se pueden usar para el diagnóstico de la diarrea. Se prefiere especialmente buscar o diseñar estructuras para las cuales se disponga de una síntesis efectiva y económica.

40 El análisis estructural reveló algunos receptores preferidos unidos a proteínas para ser empleados en el análisis o en el diagnóstico de infecciones humanas. Los receptores de manosa son oligosacáridos de tipo N-glicano. La presente invención se refiere a usos diagnósticos y analíticos de los N-glicanos del tipo manosa o multimanosa. La presente invención se refiere especialmente a los usos de N-glicanos con alto contenido de manosa que comprenden ésteres de fosfato. Los receptores de manosa se hallan en todas las partes principales del tracto gastrointestinal humano. En una forma de ejecución preferida, las secuencias oligosacáridas del tipo neolacto unidas a proteínas son N-glicanos; los receptores del tipo neolacto se hallan en todas las partes del tracto gastrointestinal. El lacto-receptor se observó especialmente en las glicoproteínas del tejido intestinal. El lacto-receptor se encuentra más preferentemente en la secuencia de tipo O-glicano.

45 Se encontraron varios receptores fucosilados nuevos unidos a proteínas. Las secuencias del tipo Lewis a se hallaron especialmente en el intestino y en la laringe. Otros receptores fucosilados nuevos, útiles para el análisis de la unión de agentes patógenos humanos, incluyen O-glicanos con estructuras Fuca2Gal, que se encuentran especialmente en el estómago humano.

50 Los nuevos receptores sialilados unidos a proteínas comprenden las estructuras NeuNAca3Gal y NeuNAca6Gal. En una forma de ejecución preferida la estructura NeuNAca3Gal está en un N-glicano y las estructuras NeuNAca6Gal se hallan preferentemente en N-glicanos y en O-glicanos. Los nuevos receptores unidos a proteínas también pueden usarse para buscar sustancias capaces de inhibir la unión del agente patógeno al nuevo receptor unido a proteínas.

55 La sustancia puede ser un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo presente en la leche capaz de unirse a la sustancia del agente patógeno que fija el receptor de carbohidrato. La sustancia inhibidora también puede ser una lectina que se une al nuevo receptor unido a proteínas; la lectina puede ser por ejemplo de tipo alimentario. En una forma de ejecución específica también se observa que los nuevos receptores unidos a proteínas se pueden emplear como receptores o sustratos de bacterias probióticas que se adhieren y se unen o pueden degradar la estructura.

En una forma de ejecución específica también se observa que los nuevos receptores unidos a proteínas se pueden emplear en métodos diagnósticos o analíticos para analizar las uniones de los agentes patógenos intestinales a las estructuras del receptor y a derivados más pequeños o análogos del mismo.

5 Cuando la sustancia se usa para diagnosticar o tipificar, se puede incluir p.ej. en una sonda o una tira reactiva que opcionalmente forme parte de un kit de ensayo. Al poner en contacto esta sonda o tira reactiva con una muestra que contenga *Escherichia coli* las bacterias se unirán a la sonda o a la tira reactiva y, por lo tanto, se podrán extraer de la muestra y analizar posteriormente. En una forma de ejecución preferida el kit de ensayo contiene al menos dos receptores oligosacáridos según la presente invención, con mayor preferencia el kit de ensayo incluye al menos tres y, sobre todo, al menos cuatro receptores oligosacáridos según la presente invención. En una forma de ejecución preferida, el kit de ensayo incluye siete o todos los receptores oligosacáridos según la presente invención.

10 Las estructuras de los glicolípidos se presentan naturalmente en forma polivalente sobre las membranas celulares. Este tipo de representación puede mimetizarse mediante el ensayo de fase sólida descrito a continuación o creando liposomas de glicolípidos o neoglicolípidos.

15 Estos nuevos neoglicolípidos obtenidos por aminación reductora de hexadecilanilina hidrófoba pudieron proporcionar la presentación efectiva de los oligosacáridos. La mayoría de conjugados de neoglicolípidos conocidos previamente y utilizados para la unión de las bacterias llevan grupos de carga negativa tales como el éster fosfórico de fosfaditil etanolamina de los neoglicolípidos. Los problemas de tales compuestos son la carga negativa de la sustancia y la unión biológica natural que implica la estructura fosfolipídica. Es sabido que las moléculas cargadas negativamente están involucradas en numerosas uniones inespecíficas a proteínas y otras sustancias biológicas. Además, muchas de estas estructuras son lábiles y se pueden degradar enzimática o químicamente. La presente invención se refiere a los conjugados no ácidos de secuencias oligosacáridas, lo cual significa que las secuencias oligosacáridas están unidas a estructuras químicas no ácidas. Preferiblemente, los conjugados no ácidos son neutros, lo que significa que las secuencias oligosacáridas están unidas a estructuras químicas neutras, no cargadas. Los conjugados preferidos según la presente invención son sustancias polivalentes.

20 En el estado técnico anterior las secuencias oligosacáridas bioactivas se unen con frecuencia a estructuras de vehículos, reduciendo una parte de la estructura oligosacárida del receptor. Se han usado espaciadores hidrófobos que contienen cadenas alquilo $(-CH_2)_n$ y/o anillos bencénicos. No obstante, es sabido en general que las estructuras hidrófobas están envueltas en interacciones inespecíficas con proteínas y otras moléculas bioactivas.

25 Los datos de los neoglicolípidos de los ejemplos siguientes demuestran que, en las condiciones experimentales del ensayo, las partes de hexadecilanilina de los compuestos neoglicolípidos no producen una unión no específica de la bacteria estudiada. En los neoglicolípidos, la parte de hexadecilanilina del conjugado forma probablemente una estructura parecida a una capa lipídica y no está disponible para la unión. La presente invención demuestra que la reducción de un resto de monosacárido perteneciente al epítipo de fijación puede destruir la unión. Se comprendió además que un monosacárido reducido se puede usar como espaciador hidrófilo en la unión de un epítipo receptor y una estructura de presentación polivalente. Según la presente invención se prefiere unir el oligosacárido bioactivo a una molécula transportadora polivalente o multivalente mediante un espaciador hidrófilo para formar una estructura polivalente u oligovalente/multivalente. Todas las estructuras polivalentes (con más de 10 restos de oligosacáridos activos receptores) y las estructuras oligovalentes/multivalentes (que llevan 2-10 restos de oligosacáridos activos receptores) se citan aquí como estructuras polivalentes, pero dependiendo de la aplicación se pueden preferir más los constructos oligovalentes/multivalentes que los polivalentes, de superior tamaño. El grupo espaciador hidrófilo comprende preferiblemente al menos un grupo hidroxilo. Con mayor preferencia el espaciador comprende al menos dos grupos hidroxilo y, sobre todo, al menos tres grupos hidroxilo.

30 Según la presente invención se prefiere usar conjugados polivalentes en los que el grupo espaciador hidrófilo que une las secuencias oligosacáridas a la estructura de presentación polivalente es preferiblemente una cadena flexible que comprende uno o varios grupos $-CHOH-$ y/o una cadena lateral amídica tal como un acetamido $NHCOCH_3$ o un alquilamido. Los grupos hidroxilo y/o el grupo acetamido también protegen al espaciador de la hidrólisis enzimática in vivo. El término flexible significa que el espaciador comprende enlaces flexibles y no forma una estructura de anillo sin flexibilidad. En la presente invención unos restos de monosacáridos reducidos como los formados por aminación reductora son ejemplos de espaciadores hidrófilos flexibles. El espaciador hidrófilo flexible es óptimo para evitar la unión inespecífica de conjugados neoglicolípidos o polivalentes. Esta actividad óptima es esencial en los bioensayos y para la bioactividad de los productos farmacéuticos o de los alimentos funcionales, por ejemplo.

35 Un conjugado con un conector hidrófilo flexible tiene la siguiente fórmula general 2:



40 en la cual L1 y L2 son grupos conectores que comprenden independientemente uno o dos átomos conectores de oxígeno, nitrógeno, azufre o carbono, o grupos formadores de enlaces como $-O-$, $-S-$, $-CH_2-$, $-NH-$, $-N(COCH_3)-$, grupos amido $-CONH-$ o $-NH-CO-$ o $-N=N-$ (derivados de hidrazina) o hidroxilamina $-O-NH-$ y $NH-O-$. L1 es un

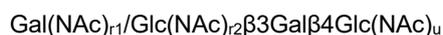
enlace del carbono 1 del monosacárido terminal reductor X, o si $n = 0$, L_1 reemplaza -O- y se une directamente desde el extremo reductor Cl de OS.

p_1 , p_2 , p_3 y p_4 son independientemente números enteros entre 0-7, con la condición de que al menos uno entre p_1 , p_2 , p_3 y p_4 sea al menos 1. En la ramificación $\{CH_{1-2}OH\}_{p_1}$, $CH_{1-2}OH$ significa que el grupo que termina la cadena es CH_2OH y cuando p_1 es mayor que 1 hay grupos alcohol secundarios -CHOH- que unen el grupo terminal al resto del espaciador. R es preferiblemente el grupo acetilo (-COCH₃) o R es un enlace alternativo a Z y entonces L_2 es un grupo de uno o dos átomos que termina la cadena; en otra forma de ejecución R es un grupo formador análogo que lleva un radical acilo C_{1-4} (preferiblemente hidrófilo tal como hidroxialquilo) con estructura amídica o H o alquilo C_{1-4} formando una amina. Y $m > 1$ y Z es un vehículo polivalente. OS y X están definidos en la fórmula 1.

Las estructuras polivalentes preferidas que comprenden un espaciador hidrófilo flexible según la fórmula 2 incluyen la secuencia oligosacárida (OS) de unión a *Escherichia coli* acoplada por $\beta 1-3$ a $Gal\beta 4Glc(red)-Z$, y $OS\beta 6GlcNAc(red)-Z$ y $OS\beta 6GalNAc(red)-Z$, donde "(red)" se refiere a la estructura de enlace amínica formada por la aminación reductora de los monosacáridos terminales reductores y un grupo amina del vehículo polivalente Z.

En la presente invención el grupo oligosacárido está preferiblemente unido en forma polivalente u oligovalente a un vehículo que no es una proteína o un péptido, para evitar la antigenicidad y posibles reacciones alérgicas; la cadena principal es preferiblemente un polisacárido natural no antigénico.

Por consiguiente algunas de las sustancias óptimas polivalentes, no ácidas, descritas comprenden una secuencia de oligosacáridos terminal

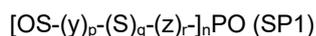


donde r_1 , r_2 y u son independientemente 0 o 1, preferiblemente $u = 0$ y

con mayor preferencia la secuencia oligosacárida presentada en forma polivalente es $GlcNAc\beta 3Ga\beta 4GlcNAc$ o un análogo o derivado de la misma.

La producción eficaz de conjugados oligosacáridos polivalentes solubles que incluyan un enlace de hidroxilamina y sean biológicamente aceptables ha sido difícil. El problema se resolvió utilizando una estructura quimioselectiva de O-hidroxilamina para hacerla reaccionar con el aldehído terminal reductor del oligosacárido que debía acoplarse. El oxígeno del vehículo va unido a la cadena principal o al espaciador y el nitrógeno va unido al C del extremo reductor del oligosacárido. La reacción se puede producir en condiciones en las que la cadena principal del polisacárido sea soluble, como en un tampón acuoso. La presente invención se refiere específicamente a oligosacáridos conjugados con estructuras oligosacáridas polivalentes o polisacáridas mediante la estructura de O-hidroxilamina.

Se revela una sustancia inhibidora de *E. coli* diarreica según la fórmula



en la cual PO es una estructura vehicular oligomérica o polimérica, OS es una secuencia oligosacárida según la presente invención; PO es preferiblemente estructura oligosacárida o polisacárida; n es un número entero ≥ 1 que indica el número de grupos oligosacáridos unidos covalentemente al vehículo PO; S es un grupo espaciador, p , q y r son cada uno 0 o 1, de modo que al menos p o r es diferente de 0; y y z son grupos conectores, de modo que al menos y o z es un resto de O-hidroxilamina -O-NH- o -O-N= con el átomo de nitrógeno unido a la estructura de OS y/o PO, respectivamente, y el otro y y z , si existe, es un grupo de enlace quimioselectivo; con la condición de que cuando n es 1 la estructura del vehículo PO es un oligosacárido o polisacárido. Se revelan constructos polivalentes en los que el oligosacárido está unido por el extremo reductor al átomo de nitrógeno de la estructura de O-hidroxilamina.

Grupos conectores quimioselectivos

Se revela que el grupo conector quimioselectivo y y o z es un grupo químico que permite el acoplamiento del grupo OS a un grupo espaciador o de un grupo $OS-(y)_p-(S)_q-(z)_r-$ al vehículo PO, en concreto sin usar grupos protectores o reactivos catalíticos o activadores en la reacción de acoplamiento. Se revela que al menos uno de estos grupos y y z es un resto de O-hidroxilamina -O-NH- o -O-N=. Los ejemplos de otros posibles grupos de conexión quimioselectiva comprenden el grupo hidrazino -N-NH- o -N-NR₁-, el grupo éster -C(=O)-O-, el grupo cetónico -C(=O)-, el grupo amido -C(=O)-NH-, -O-, -S-, -NH-, -NR₁-, etc., donde R₁ es H o un grupo alquilo inferior, que tiene preferiblemente hasta 6 átomos de carbono, etc. Se revela que el grupo conector quimioselectivo es el grupo éster -C(=O)-O- formado con un grupo hidroxilo y el grupo amido -C(=O)-NH- formado con un grupo amino en el grupo PO o Bio, respectivamente. Se revela que y es un resto de O-hidroxilamina y z es un enlace éster.

Se revela que p , q y r son 1. Si q es 0, p o r es preferiblemente 0.

Se revela que las estructuras de la cadena principal de los polisacáridos u oligosacáridos (PO) llevan glicosaminoglicanos tales como condroitina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, poli-N-acetil-lactosamina o sulfato de queratán, ácido hialurónico, heparina y precursores de heparina, incluyendo N-acetilheparosano y sulfato de heparán; quitina, quitosano, almidón y fracciones de almidón o glucógeno. Una estructura principal preferida es una ciclodextrina. Las fracciones de almidón útiles incluyen fracciones de amilosa y amilopectina.

Se revela el empleo de formas solubles en agua de las estructuras de la cadena principal, tales como la mezcla de polisacáridos de quitosano de muy bajo peso molecular o la fracción oligómera de quitosano que lleva hexámeros y oligosacáridos de quitosano más largos, llamado aquí chitomer (quitómero).

Se revela que la estructura espaciadora incluye las descritas para el conector hidrófilo anterior, el ácido amino-oxiacético. Se revela que el grupo espaciador, si existe, se selecciona preferiblemente entre un grupo alquileo lineal o ramificado de 1 a 10, preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono, o entre un grupo alqueno lineal o ramificado de 2 a 10 o de 2 a 6 átomos de carbono. Dicho grupo es preferiblemente un grupo metileno o etileno. En el grupo espaciador uno o más de los miembros de la cadena pueden reemplazarse por -NH-, -O-, -S-, -S-S-, =NO-, un grupo amido -C(O)-NH- o -NH-C(O)-, un grupo éster -C(O)O- o -OC(O)- o -CHR₂, donde R₂ es un grupo alquilo o alcoxi de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 3 átomos de carbono, o -COOH. Se revela que un grupo que reemplaza un miembro de la cadena es NH-, -O-, una amida o un grupo éster.

Se revela el uso de epítomos disacáridos mínimos y epítomos parciales, descritos por la presente invención como conjugados polivalentes solubles según la presente invención.

Especies zoonóticas de *Helicobacter*

Se revela la especie *Helicobacter* causante de infecciones gástricas a seres humanos y a los animales que viven en contacto directo con humanos. Las especies zoonóticas también causan otras enfermedades como las descritas. Las especies de bacterias tienen un potencial zoonótico variable. Las bacterias de animales que viven en estrecho contacto con humanos incluyen el amplio grupo de bacterias *Helicobacter* enterohepáticas, desde *H. pullorum* hasta *H. westmaedii*, y especies gástricas, desde *H. suis* hasta *H. salomonis*, incluyendo también preferiblemente especies bovinas (*H. bovis*) y especies símicas (fig. 1, Dewhurst y otros. 2000). Las especies de bacterias forman grupos homólogos conocidos por infectar zoonóticamente a humanos. Esta agrupación no incluye especies de *H. mustelae* procedentes de "animales silvestres", menos interesantes como objetivos terapéuticos. Estas *Helicobacter* forman unos grupos homólogos conocidos por sus actividades zoonóticas. También se revelan las actividades de unión a carbohidratos que permiten la propagación de las bacterias. Las especies son diferentes de *H. pylori*, con Lewis b y mecanismos de infección más pronunciados, basados en ácido siálico. Se revela la inhibición de los *Helicobacter* conocidos por producir infecciones zoonóticas. La especie preferida incluye un grupo de bacterias "gastrospirilla", los agentes patógenos zoonóticos de gatos y perros *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis*, que son iguales o muy similares a un grupo de bacterias que infectan a humanos denominadas en humanos *H. heilmannii*, y otro tipo de *H. heilmannii* que se parece mucho a *candidatus H. suis*, un *Helicobacter* porcino. Otro grupo zoonótico comprende especies identificadas como *Flexipira rappini*, aisladas de corderos abortados, heces de perro y humanos e intestino de cerdo. También se sabe que un grupo de *Helicobacter* llamado *H. rapping* infecta a los humanos, de modo similar a *H. bilis* y *H. troglodytes*. Las especies básicamente zoonóticas incluyen también *H. canis* y *H. pullorum* (de aves de corral a humanos) (On 2001) y *H. fenellilae*, *H. cinaedi*, *H. canadensis*, *H. winthamensis* y *H. westmaedi* (Fox 2002).

Infecciones entéricas zoonóticas que causan diarrea y otras enfermedades entéricas

También se revela el tratamiento y/o prevención de diarreas causadas por especies zoonóticas de *Helicobacter*. Se revela que uno o varios de los carbohidratos se usan para el tratamiento inmediato o preventivo de infecciones en animales que viven en estrecho contacto con humanos. Se revelan tratamientos de animales domésticos infectados con especies de *Helicobacter* que se propagan zoonóticamente. Se ha referido que estas mascotas infectadas han transmitido la infección a seres humanos y causado enfermedades, incluyendo diarreas. Se revela que el tratamiento se administra al humano o animal que tiene una protección inmunitaria debilitada o inmunodeficiencia.

Infecciones zoonóticas de *Helicobacter* causantes de enfermedades hepatobiliares

Se revela el tratamiento y/o la prevención de las infecciones hepatobiliares causadas por especies zoonóticas de *Helicobacter*. Se revela que uno o varios de los carbohidratos se usan para tratamientos inmediatos o preventivos de infecciones en animales que viven en estrecho contacto con humanos. Se revela el tratamiento de animales domésticos infectados con especies de *Helicobacter* que se propagan zoonóticamente. Se ha referido que estas mascotas infectadas han transmitido la infección a seres humanos y causado enfermedades, incluyendo afecciones hepatobiliares. Se revela que el tratamiento se administra al humano o animal que tiene una protección inmunitaria debilitada o inmunodeficiencia.

Infecciones zoonóticas de Helicobacter causantes de enfermedades gástricas o hepáticas

Se revela el tratamiento y/o prevención de infecciones y enfermedades gástricas causadas por especies zoonóticas de *Helicobacter*. Se revela que uno o varios de los carbohidratos se emplean para tratamientos inmediatos o preventivos de infecciones en animales que viven en estrecho contacto con humanos. Se revela el tratamiento de animales domésticos infectados con especies de *Helicobacter* que se propagan zoonóticamente. Se ha referido que estas mascotas infectadas han transmitido la infección a seres humanos y causado enfermedades, incluyendo las de tipo gástrico. Se revela que el tratamiento se administra al humano o animal que tiene una protección inmunitaria debilitada o inmunodeficiencia.

Helicobacterias enterohepáticas

Se revela la especificidad de unión común compartida con especies enterohepáticas de *Helicobacter* no *H. pylori*. Estas especies incluyen *H. canis*, *H. bilis* y *H. hepaticus*. El perfil similar de especificidad de unión a glicoconjugados humanos y animales basado en galactosa también se puede observar con *H. fenelliae*, *H. rapping* y *H. pullorum*. En general los nichos ecológicos en el sistema enterohepático permiten un uso efectivo de la cantidad limitada de carbohidratos receptores. La presente invención identifica los principales carbohidratos receptores útiles para unir el sistema enterohepático de humanos y animales. Se revela que la especificidad de unión a galactosa también es aplicable a ensayos de inhibición y unión con otras especies enterohepáticas de *Helicobacter* que tienen el mismo perfil de infectividad en el sistema enterohepático de humanos y animales.

Helicobacterias zoonóticas causantes de infecciones gástricas

Se revela el tratamiento de *H. Helicobacterias no pylori* que principalmente infectan a animales, incluyendo sobre todo mascotas, preferiblemente gatos y perros, y que también infectan zoonóticamente a humanos. Los ejemplos de agentes patógenos gástricos zoonóticos incluyen *H. felis* y *H. heilmannii*. La presente invención no se refiere a las especificidades de unión de *H. mustellae*, incluidas solo como control, pues no es sabido que infecte a humanos o a animales de compañía comunes como gatos y perros.

La nomenclatura de glucolípidos y carbohidratos está fundamentalmente de acuerdo con las recomendaciones de la comisión IUPAC-IUB sobre nomenclatura bioquímica (Carbohydrate Res. 1998, 312, 167; Carbohydrate Res. 1997, 297, 1; Eur. J. Biochem. 1998, 257, 29).

Se supone que Gal, Glc, GlcNAc y Neu5Ac tienen la configuración D, Fuc la configuración L y todas las unidades de monosacáridos la forma de piranosa. La glucosamina se indica como GlcN o GlcNH₂ y galactosamina como GalN o GalNH₂. Los enlaces glicosídicos se muestran parcialmente con una nomenclatura más corta y en parte más larga; los enlaces α3 y α6 de los restos Ac Neu5 significan lo mismo que α2-3 y α2-6, respectivamente, y con otros restos de monosacáridos α1-3, β1-3, β1-4 y β1-6 se pueden abreviar como α, β3, β4 y β6, respectivamente. Lactosamina se refiere a N-acetil-lactosamina, Galβ4G1cNAc, y el ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) o cualquier otro ácido siálico natural. El ácido siálico se también se menciona como NeuNX, en el cual X es preferiblemente Ac o Gc. Ocasionalmente Neu5Ac/Gc/X puede ser citado como NeuNAc/NeuNGc/NeuNX. Aquí el término glicano significa generalmente cadenas oligosacáridas o polisacáridas presentes en glicoconjugados humanos o animales, sobre todo en glicolípidos o glicoproteínas. En la nomenclatura abreviada de ácidos y bases grasos, el número antes de los dos puntos se refiere a la longitud de la cadena carbonada y el número tras los dos puntos indica el número total de dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada. La abreviatura GSL se refiere a glicoesfingolípido. Las abreviaturas o nombres cortos o símbolos de los glicoesfingolípidos están indicados en el texto y en la tabla 2. *Escherichia coli* también se refiere a bacterias similares a *Escherichia coli*.

La expresión "secuencia oligosacárida terminal" indica que el oligosacárido no está sustituido en el resto terminal del extremo no reductor por otro resto monosacárido.

El término "α3/β3" indica que los restos adyacentes en una secuencia oligosacárida pueden estar unidos entre sí por α3 o β3.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que de ningún modo pretenden limitar el alcance de la misma:

EJEMPLOSEJEMPLO IProcedimientos experimentales

Condiciones de cultivo y marcaje - Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Luria-agar con la adición de 10 ml de metionina-S³⁵ (400 mCi; Amersham Pharmacia Biotech, U.K.) a 37°C durante 12 h. Las bacterias se recogieron por raspado, se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,3, y luego se resuspendieron

en PBS (con o sin manosa al 1% (p/v)) a 1×10^8 UFC/ml. Las actividades específicas de las suspensiones fueron de aproximadamente 1 cpm por 100 bacterias.

5 Glicoesfingolípidos de referencia - Se obtuvieron fracciones de glicoesfingolípidos totalmente ácidos y no ácidos por procedimientos estándar (1). Los glicoesfingolípidos individuales se aislaron por cromatografía repetida en columnas de ácido silícico de las fracciones de glicoesfingolípidos nativas o de sus derivados acetilados. La identidad de los glicoesfingolípidos purificados se confirmó por espectrometría de masas (2), espectroscopía de RMN de protones (3) y estudios de degradación (4, 5).

10 Preparación de neoglicolípidos - Los oligosacáridos con GlcNAc terminal - los oligosacáridos sintéticos GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, GlcNAc β Gal β 3GlcNAc β 4Glc y GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc, de Carbion Oy, Finlandia - y el oligosacárido de manosa - de Dextralabs, UK - se aminaron con 4-hexadecilanilina (abreviada HDA, de Aldrich, Estocolmo, Suecia) en condiciones reductoras mediante cianoborohidruro (Halina Miller-Podraza, para ser publicado posteriormente). Los productos se caracterizaron por espectrometría de masas y se confirmó que eran conjugados aminados en condiciones reductoras de los oligosacáridos y HDA.

15 Cromatografía en capa fina - La cromatografía en capa fina de los glicoesfingolípidos se realizó en placas de CCFAR de gel de sílice 60 con base de vidrio o aluminio (Merck, Darmstadt, Alemania), utilizando cloroformo/metanol/agua 60:35:8 (en volumen) como sistema disolvente. La detección química se efectuó con anisaldehído (6).

20 Ensayos de unión a glicoesfingolípidos - La unión de las bacterias marcadas con S^{35} a los glicoesfingolípidos en los cromatogramas de capa fina se realizó del modo descrito (7). Los cromatogramas secos se sumergieron 1 minuto en dietiléter/n-hexano (1:5 en volumen) que contenía 0,5% (p/v) de poliisobutilmetacrilato (Aldrich Chem. Comp. Inc., Milwaukee, WI). Después del secado, los cromatogramas se empaparon en PBS que contenía albúmina de suero bovino al 2% (p/v), NaN_3 al 0,1% (p/v) y Tween 20 al 0,1% (en volumen) durante 2 h a temperatura ambiente. Los cromatogramas se cubrieron posteriormente con bacterias radiomarcadas diluidas en PBS ($2-5 \times 10^6$ cpm/ml). La incubación se llevó a cabo durante 2 h a temperatura ambiente, seguido de repetidos lavados con PBS. Luego los cromatogramas se autorradiografiaron usando películas XAR-5 de rayos X (Eastman Kodak, Rochester, NY) durante 12 h. Los autorradiogramas se copiaron con una cámara CCD (Dage-MTI, Inc., Michigan City, In) y las imágenes se analizaron mediante el programa NIH Image de dominio público (desarrollado en los Institutos nacionales de salud de EE.UU. y disponible en <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

25 Inhibición con oligosacáridos solubles - Para probar la posibilidad de inhibir la unión mediante azúcares solubles se incubaron cepas de *E. coli* marcadas con S^{35} durante 1 hora a la temperatura ambiente con globotriaosa, globotetraosa, lacto-N-tetraosa, lacto-N-neotetraosa, 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa aproximadamente 1,5 mM en PBS. Las concentraciones finales de los oligosacáridos inhibidores en la placa de CCF fueron de 0,3 mM. La lactosa se ensayó a unas concentraciones finales de 1 mg/ml y 2 mg/ml. A continuación se llevó a cabo el ensayo de unión al cromatograma del modo descrito anteriormente.

30 Análisis de glicosilación del sistema gastrointestinal humano - A partir de operaciones quirúrgicas se obtuvieron muestras de mucosa humana representativas de tejidos epiteliales de la laringe y del tracto gastrointestinal, en particular del estómago y del colon.

35 Los oligosacáridos reductores se aislaron por β -eliminación no reductora. Después de la purificación, representaron todo tipo de glicanos celulares, principalmente de proteínas.

40 Se realizó una espectrometría de masas MALDI-TOF MS con un equipo Voyager-DE STR, de BioSpectrometry, esencialmente como en Saarinen y otros, 1999; Papac y otros, 1996; Harvey, 1993. Los oligosacáridos neutros se analizaron con una matriz de ácido 2,5-dihidrobenzoico en modo reflector de iones positivos, y los oligosacáridos ácidos se analizaron con una matriz de 2',4',6'-trihidroxiaacetofenona en modo lineal de iones negativos.

45 Todas las reacciones de exoglicosidasa se realizaron básicamente del modo descrito previamente (Nyman y otros, 1996; Saarinen y otros, 1999) y se analizaron por MALDI-TOF MS. Los enzimas y sus reacciones propias de control con oligosacáridos caracterizados fueron: β -N-acetilglucosaminidasa (*Streptococcus pneumoniae*, recombinante, *E. coli*; Calbiochem, EE.UU.) digirió GlcNAc β 1-6Gal-R en lacto-N-hexaosa tratada con β 1,4-galactosidasa, pero no GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3/6Gal-R en un oligosacárido sintético; *Arthrobacter ureafaciens* sialidasa (recombinante, *E. coli*; Glyko, UK) digirió tanto Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-R como Neu5Ac β 2-6Gal β 1-4GlcNAc-R en oligosacáridos sintéticos; α 2,3-sialidasa (*Streptococcus pneumoniae*, recombinante, *E. coli*; Glyko, UK) digirió Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-R, pero no Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc-R en oligosacáridos sintéticos; α 1,2-fucosidasa (*Xanthomonas manihotis*; Glyko, UK) digirió Fuca α 1-2Gal β 1-3GlcNAc-R en monofucosil-lacto-N-hexosa I, pero no Gal β 1-4 (Fuca α 1-3)GlcNAc en lacto-N-fucopentaosa III; α 1,3/4-fucosidasa (*Xanthomonas* sp., Calbiochem, EE. UU.) digirió Gal β 1-4 (Fuca α 1-3)GlcNAc-R en lacto-N-fucopentaosa III, pero no Fuca α 1-2Gal β 1-3GlcNAc-R en monofucosilacto-N-hexosa I; β 1,4-galactosidasa (*Streptococcus pneumoniae*, recombinante, *E. coli*; Calbiochem, EE. UU.) digirió Gal β 1-4GlcNAc-R pero no Gal β 1-3GlcNAc-R en lacto-N-hexosa; β ,3-galactosidasa (recombinante, *E. coli*; Calbiochem, EE. UU.) digirió Gal β 1-3GlcNAc-R, pero no Gal β 1-4GlcNAc-R en lacto-N-hexaosa; α -manosidasa (judía sable; Glyko, UK) transformó una mezcla de N-glicanos con alto contenido de manosa en el trisacárido central del Man1GlcNAc2

N-glicano. Las digestiones de control se efectuaron en paralelo y se analizaron de forma similar a las reacciones analíticas de exoglucosidasa.

Resultados

5

Detección de la actividad de unión a carbohidratos de la *E. coli* diarreica

10 Uso de mezclas de glicoesfingolípidos - Durante los estudios iniciales se evaluó el posible reconocimiento de varias cepas de *E. coli* diarreicas (resumidas en la Tabla 1) por carbohidratos, utilizando mezclas bien caracterizadas de glicoesfingolípidos en el ensayo de unión al cromatograma, con el fin de exponer las bacterias a una gran cantidad de secuencias variantes de carbohidratos. Así se detectó una unión selectiva a algunos glicoesfingolípidos, mientras que otros compuestos no fueron reconocidos por las bacterias. Los patrones de unión resultantes variaron entre las cepas, tal como está ejemplificado en la fig. 1.

15 Unión de cepas tipo CCUG a glicoesfingolípidos puros - Para definir mejor las características de unión se eligieron dos cepas tipo (CCUG 38068 y 38077) para ensayos de unión a glicoesfingolípidos puros en cromatogramas de capa fina, tal como está ejemplificado en la fig. 2. Los resultados están resumidos en la tabla 2. Así, ambas cepas se unieron a lactosilceramida. La unión a lactosilceramida solo se obtuvo cuando este glicoesfingolípidos contenía una ceramida con esfingosina o fitoesfingosina y ácidos grasos hidroxilados (nº 5 en la tabla 2), mientras que de forma
20 consecuente la lactosilceramida con esfingosina y ácidos grasos no hidroxilados (nº 4) no se unió.

25 Otros glicoesfingolípidos reconocidos por estas dos bacterias fueron: galabiosilceramida (nº 6), isoglobotriaosilceramida (nº 7), globotriaosilceramida (nº 8), gangliotriaosilceramida (nº 10), gangliotetraosilceramida (nº 11), globotetraosilceramida (nº 12), glicoesfingolípidos de Forssman (nº 14), neolactotetraosilceramida (nº 15), lactotetraosilceramida (nº 23), neolactoheptaosilceramida (nº 22) y NeuGc α 3-neolactoheptaosilceramida (nº 36). La unión a estos glicoesfingolípidos no dependía de la estructura de la ceramida.

30 La cepa CCUG 38077, pero no la cepa CCUG 38068, también se unió a varios gangliósidos (nº 28, 29, 31-36, ejemplificados en la figura 2). Los gangliósidos activos para la unión contenían tanto ácido N-acetil- como N-glicolil neuramínico, y el ácido neuramínico podía estar unido tanto por α 3 como por α 6. Sin embargo, no se reconocieron todos los gangliósidos, p.ej. no se obtuvo ninguna unión al gangliósido GD1a (nº 30).

35 Por otro lado la cepa CCUG 38068 se unió al glicoesfingolípidos Lea-5 (nº 24), que no fue reconocido por la cepa CCUG 38077.

También se demostró que las dos cepas de *E. coli* se unen a Man α 3(Man α 6)Man en cromatogramas de capa fina. El sacárido se ensayó tras el acoplamiento a una cola lípida mediante aminación reductora. Otros ensayos con neoglicolípidos que contenían manosa con doble ramificación demostraron que la unión dependía de la presentación del sacárido.

40

Los neoglicolípidos con GlcNAc β 3LacNAc terminal también fueron reconocidos por las dos cepas CCUG.

Ejemplo de ensayo de unión a neoglicolípidos

45 Los pentasacáridos isómeros se produjeron por digestión específica con β 3-galactosidasa (Calbiochem, La Jolla, CA) y β 4-galactosidasa (de *D. pneumonia*, Sigma, ST Louis, MO) a partir de los hexasacáridos comerciales para-lacto-N-hexaosa (de Dextra laboratorios, Reding, UK) y Lacto-N-hexaosa (Isossep, Tullinge, Suecia) para obtener GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc y Gal β 3GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)Gal β 4Glc. El GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6Gal β 4Glc se produjo a partir de GINAc β 6Gal β 4Glc (Sigma St Louis, MO), primero mediante la reacción con β 4-galactosil-transferasa (Calbiochem, La Jolla, CA), empleando UDP-Gal (Kyowa Hakko, Japón) como donante, y luego con β 3-GINAc-transferasa (de suero humano) y UDP-GlcNAc (Kyowa Hakko, Japón). Los oligosacáridos se purificaron por cromatografía de filtración en gel y se identificaron por espectroscopía de RMN y espectrometría de masas. Los pentasacáridos y el Man α 3(Man α 6)Man se aminaron reductoramente con 4-hexadecilanilina (abreviada HDA, de Aldrich, Estocolmo, Suecia) mediante cianoborohidruro (Halina Miller-Podraza, que se publicará más adelante). Se confirmó que los productos identificados por espectrometría de masas eran los correspondientes GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc (red)-HDA, Gal β 3GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)Gal β 4Glc(red)-HDA, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6Gal β 4Glc (red)-HDA y Man α 3(Man α 6)Man-(red)-HDA [donde "(red)-" se refiere a la estructura de enlace amínico formada por aminación reductora desde las glucosas del extremo reductor de los sacáridos y del grupo amino de la hexadecilanilina (HDA)]. Los compuestos GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc(red)-HDA y Man α 3(Man α 6)Man(red)-HDA tuvieron actividades de unión respecto a dos cepas de *E. coli* diarreica (CCUG 38068 y 38077) en el ensayo de aplicación en CCF descrito anteriormente, mientras que los pentasacáridos Gal β 3GlcNAc β 3(GlcNAc β)Gal β 4Glc (red)-HDA y GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6Gal β 4Glc(red)-HDA tuvieron actividades de unión mucho más débiles o inexistentes. Los resultados indicaron que las neolactoestructuras de tipo GlcNAc β Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc se unen efectivamente a la *E. coli* diarreica. La unión disminuye mucho si la GlcNAc β 3 cambia a GlcNAc β 6- en la estructura.
65 Los resultados también demostraron análogamente que el bloqueo de la galactosa media en la estructura de lacto-

tetraosa por una ramificación Gal β 3GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)Gal β 4Glc de GlcNAc disminuyó la unión en un ensayo de aplicación en CCF.

Especificidades de unión en diferentes tipos de *E. coli* diarreica

5 La detección de especificidades de unión en diferentes tipos de *E. coli* diarreica, es decir enterotoxigena (ETEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAGG), enteroinvasiva (EIEC) y enterohemorrágica (EHEC) mostró que la mayor parte de las especificidades de unión descritas se encontraban en la mayoría de las cepas (datos sobre cepas típicas/tipos de cepas resumidos en la tabla 4). De esta forma se logró la unión a lactosilceramida, lacto y neolacto con todas las cepas ensayadas y la unión a globo se consiguió con todas las cepas, exceptuando las cepas EHEC de tipo natural. En este grupo de cepas tipo la unión al ácido siálico se obtuvo principalmente con una cepa enteroagregativa. Sin embargo hay varias cepas de *E. coli* diarreicas de tipo natural que se unen al ácido siálico (véase por ejemplo fig. 6 y fig. 3). En la fig. 7 se ilustra la ausencia de unión de EHEC a los glicosfingolípidos de las globoseries y a los gangliósidos (banda 1 y bandas 3, 5, 6, 8 y 9, respectivamente). La unión obtenida en la banda 7 está relacionada con la unión a lactosilceramida.

Reconocimiento preferente de NeuGc-neolactotetraosilceramida

20 Para analizar en detalle las uniones preferentes de las *E. coli* diarreicas al ácido siálico se comparó la unión de las bacterias a variantes de sialil-neolactotetraosilceramida. Las bacterias se unieron con la mayor afinidad a NeuGc α 3-neolactotetraosilceramida (NeuGc α Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer), seguida por NeuAc α -neolactotetraosilceramida (NeuGc α Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer) y por último NeuAc α -neolactotetraosilceramida (NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer). La comparación se efectuó utilizando series de dilución de glicolípidos y comparando la desaparición de las uniones al disminuir las proporciones de glicolípidos. Tomados en conjunto, los resultados indican que se puede obtener una unión aún mayor con NeuGc unido por α 6.

Tomando como base los patrones de unión y las estructuras de carbohidrato, las actividades de unión se clasificaron en ocho especificidades de unión distintas:

- 30 a) Unión a lactosilceramida: representada por lactosilceramida (n° 5) e isoglobotriaosilceramida (n° 7).
 b) Unión a gangliósidos: representada por gangliotriaosilceramida (n° 10) y gangliotetraosilceramida (n° 11).
 c) Unión a Gal α 4Gal: representada por galabiosaosilceramida (n° 6), globotriaosilceramida (n° 8), globotetraosilceramida (n° 12) y el glicosfingolípidos de Forsman (n° 14).
 d) Lacto-unión: representada por lactotetraosilceramida (n° 23).
 35 e) Neolacto-unión: representada por neolactotetraosilceramida (n° 15), neolactoheptaosilceramida (n° 22) y NeuGc α 3-neolactoheptaosilceramida (n° 36).
 f) Unión a glicosfingolípidos fucosilados: representada por el glicosfingolípidos Lea-5 (n° 24).
 g) Unión a NeuAc/NeuGc-X: representada por los gangliósidos n° 28, 29, 31-36.
 40 h) Unión a manosa-X: representada por el Man α 3(Man α 6)Man-neoglicolípidos.

Cada cepa de tipo natural (tabla 1) exhibió dos o más de las especificidades de unión enumeradas anteriormente y la combinación de especificidades de unión varió entre las cepas. La mayoría de las cepas tenían incluso tres o más especificidades de unión. Se observaron a menudo cuatro y más especificidades de unión y probablemente la mayor parte de las cepas tiene la capacidad de expresar todas o casi todas las especificidades, aunque las especificidades no tienen por qué estar activas todo el tiempo. Se subraya la necesidad de emplear simultáneamente dos o más secuencias de oligosacáridos por el hecho de que la expresión de las uniones varía entre las cepas.

Ensayos de inhibición

Inhibición mediante una mezcla de globotetraosa y 3'-sialil-lactosa

La capacidad de los oligosacáridos solubles para interferir en la unión de la *E. coli* diarreica a los glicosfingolípidos en placas de cromatografía de capa fina se examinó incubando las bacterias con una mezcla de globotetraosa y 3'-sialil-lactosa antes de unirlos a los cromatogramas. Los resultados se muestran en la fig. 3. Por lo tanto, al incubar las bacterias con una mezcla de oligosacáridos se inhibió tanto la unión a la globotetraosilceramida como al 3'-sialil-paraglobosido. La inhibición de la unión a la globotriaosilceramida también se logró preincubando las bacterias con globotriaosa 1,5 mM, a una concentración final de 0,3 mM.

Inhibición mediante una mezcla de globotriaosa, lacto-N-neotetraosa y 6'-sialil-lactosa

La capacidad de los oligosacáridos solubles para interferir en la unión de la *E. coli* diarreica a los glicosfingolípidos en placas de cromatografía de capa fina también se examinó incubando las bacterias con una mezcla de globotetraosa y 3'-sialil-lactosa antes de unirlos a los cromatogramas. Los resultados se muestran en la fig. 6. De este modo, al incubar las bacterias con una mezcla de oligosacáridos se inhibió simultáneamente la unión a globotriaosilceramida, NeuNGc α 3neolactoheptaosilceramida (que comprende un neolacto-epítipo de cadena media) y NeuGc α 3-neolactotetraosilceramida. Los datos mostraron inhibiciones simultáneas contra dos epítipos presentes en la misma

molécula. También se observó que la unión a NeuGca3neolactotetraosilceramida es inhibida por la 6'-sialil-lactosa, lo cual demuestra que el ácido siálico unido por $\alpha 3$ y $\alpha 6$ es fijado por la misma adhesina bacteriana.

Resultados adicionales de los estudios de inhibición. En ensayos de control, los oligosacáridos monovalentes libres arriba descritos inhibieron específicamente la unión a los glicolípidos que contienen la misma estructura receptora, pero no a otros glicolípidos. Los oligosacáridos de las globoseries inhibieron la unión al globo-receptor, la Lacto-N-neotetraosa inhibió la unión a neolacto-lípido y las sialil-lactosas inhibieron la unión a los glicolípidos receptores de sialilo, como se ha descrito arriba a una concentración final de 0,3 mM, pero no se observó reactividad cruzada. La Lacto-N-tetraosa también fue capaz de inhibir la unión de la *E. coli* diarreaica a lactotetraosilceramida al emplear las densidades de glicolípidos más bajas en los ensayos de inhibición, tal como se ha descrito arriba. Como control, la lactosa se ensayó a concentraciones finales de 1-2 mg/ml (3-6 mM) sin actividad inhibitoria. Es interesante que el disacárido terminal Gal β 3GalNAc del epítipo del gangliósido tampoco fue activo como inhibidor monovalente a una concentración de 0,3 mM contra el glicolípidos Ganglio-receptor, lo cual indica que la secuencia disacárida puede ser más útil cuando se conjuga con un vehículo polivalente que cuando se conjuga con un inhibidor monovalente.

Los ensayos de inhibición demuestran que las especificidades de unión frecuentes según la presente invención son

1. independientes,
2. inhibibles por concentraciones relativamente bajas de oligosacáridos monovalentes y
3. inhibibles simultáneamente sin efectos nocivos debido a la presencia de varios oligosacáridos.

Interrupción selectiva de las especificidades de unión

Durante estos estudios hemos observado que tras un subcultivo prolongado de *E. coli* diarreaica una o varias de las especificidades de unión se pueden perder selectivamente. Esto está ejemplificado en la fig. 8, que demuestra una pérdida de unión a isoglobotriaosilceramida (banda 4), mientras que la unión a gangliotetraosilceramida (banda 5) y a globotetraosilceramida (banda 6) permanece, lo cual sugiere una regulación negativa de la adhesina fijadora de isoglobotetraosilceramida/lactosilceramida. La isoglobosilceramida activa un ácido graso hidroxilado que le confiere la actividad de la familia de lactosilceramida. Sin embargo, no se pudo discernir ningún patrón específico de esta interrupción, es decir, se perdieron diferentes especificidades de unión en momentos diferentes. Los presentes inventores notaron una pérdida bastante aleatoria de cualquiera de las especificidades de unión. Dado que se puede perder cualquiera de las especificidades de unión, es preferible el uso de al menos dos inhibidores monovalentes o polivalentes de unión según la presente invención.

Especificidades de unión frecuentes

Se hicieron numerosas aplicaciones de CCF con el amplio grupo de diferentes tipos de cepas de *E. coli* causantes de diarrea. Se encontraron cuatro especificidades de unión especialmente frecuentes entre las bacterias: unión a Globo-receptores, receptores de ácido siálico, Neolacto-receptores y Lacto-receptores. La unión a Globo-receptores fue especialmente estable contra la interrupción espontánea.

Análisis de glicosilación de proteínas del sistema gastrointestinal humano - La aparición de algunos epítipos de glicanos terminales en las muestras se ejemplifica a continuación. En todos estos análisis el nivel de detección es del orden del 5% de las abundancias relativas de los componentes más cuantiosos.

Gal β 1-4GlcNAc β -R. Se detectaron grupos terminales N-acetilactosaminilo de tipo II en todos los tejidos analizados, en concreto de la laringe, del estómago y del colon, como lo prueba la susceptibilidad a la digestión por la β 1,4-galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae*. Por ejemplo, un pico a m/z 1809,73 del espectro de masas en modo reflector de iones positivos de la muestra de colon, correspondiente a la estructura iónica [Hex₅HexNAc₄Fuc+Na]⁺, m/z calc. = 1809,64, se eliminó mediante tratamiento con β 1,4-galactosidasa y se transformó en m/z 1485,68, que corresponde a la estructura iónica [Hex₃HexNAc₄Fuc+Na]⁺, m/z calc. = 1485,53.

Gal β 1,3-R. Los restos terminales de galactosa sensibles a β 1,3-galactosidasa se detectaron solo en el epitelio del colon, pero no en la laringe ni en el epitelio estomacal. En una muestra pretratada con β 1,4-galactosidasa, la acción de la β ,3-galactosidasa produjo un claro aumento de la intensidad de un pico a m/z 933,37 en el espectro de masas en modo reflector de iones positivos, correspondiente a la estructura iónica [Hex₃HexNAc₂+Na]⁺, m/z calc. = 933,32.

La intensidad de un pico a m/z 1996,84, correspondiente a la estructura iónica [Hex₄HexNAc₅Fuc₂+Na]⁺, m/z calc. = 1996,72, también aumentó claramente en una muestra pretratada con β 1,4-galactosidasa mediante la acción de la β ,3-galactosidasa. Esto indica que hay derivados β 1,3-galactosilados de estas estructuras.

Fuca1,2-R. Se detectaron posibles restos terminales de α 1,2-fucosilo en la muestra del epitelio estomacal, pero no en la laringe o en el epitelio del colon. Tras la digestión de la muestra estomacal con α 1,2-fucosidasa hubo aumentos de las intensidades de los picos a m/z 755,24, correspondiente a la estructura iónica [HexHexNAc₂Fuc+Na]⁺ (m/z calc. 755,27), y m/z 917,29, correspondiente a la estructura iónica [Hex₂HexNAc₂Fuc+Na]⁺ (m/z calc. 917,32), en el

espectro de masas en modo reflector de iones positivos, lo cual sugiere la presencia de derivados fucosilados de estas estructuras.

Fuca1,3-R y Fuca1,4-R. Se detectaron posibles determinantes terminales del grupo sanguíneo Lewis^a o Lewis^x en la laringe y en el epitelio del colon, pero no en la muestra del estómago. Por ejemplo, en una muestra tomada del colon y pretratada con α 1,2-fucosidasa se produjo por acción de la α 1,3/4-fucosidasa un claro aumento de la intensidad de un pico a m/z 2012,81 en el espectro de masas del modo reflector de iones positivo, correspondiente a la estructura iónica $[\text{Hex}_5\text{HexNAC}_5\text{Fuc}+\text{Na}]^+$, m/z calc. = 2012,72, lo cual indica la presencia de derivados fucosilados de esta estructura.

Mana-R. Se detectaron residuos terminales de α -manosilo en todas las muestras, pues la digestión de α -manosidasa afectó a una serie variable de picos del espectro de masas en modo reflector de iones positivos, concretamente a los calculados a m/z 771,26 $[\text{Hex}_2\text{HexNAC}_2+\text{Na}]^+$, m/z 933,32 $[\text{Hex}_3\text{HexNAC}_2+\text{Na}]^+$, m/z 1095,37 $[\text{Hex}_4\text{HexNAC}_2+\text{Na}]^+$, m/z 1257,42 $[\text{Hex}_5\text{HexNAC}_2+\text{Na}]^+$, m/z 1419,48 $[\text{Hex}_6\text{HexNAC}_2+\text{Na}]^+$, m/z 1581,53 $[\text{Hex}_7\text{HexNAC}_2+\text{Na}]^+$, m/z 1743,58 $[\text{Hex}_8\text{HexNAC}_2+\text{Na}]^+$ y m/z 1905,63 $[\text{Hex}_9\text{HexNAC}_2+\text{Na}]^+$. Después de la digestión con α -manosidasa, estas señales se convirtieron en un único pico calculado a m/z 609,21 $[\text{Hex}_1\text{HexNAC}_2+\text{Na}]^+$, lo cual indica que las estructuras digeridas eran N-glicanos con alto contenido de manosa.

NeuAc α 2,3-R. En las muestras se detectaron ácidos siálicos terminales con enlaces α 2,3 a Gal (Toivonen y otros, 2002). Por ejemplo, tras la digestión de glicanos estomacales con α 2,3-sialidasa se observó una disminución de la intensidad relativa de un pico a m/z 2369,4, correspondiente a la estructura iónica $[\text{NeuAc}_2\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4\text{Fuc-H}]^-$, m/z calc.= 2369,1.

NeuAc α 2,6/8/9-R. En las muestras se detectaron ácidos siálicos terminales con uniones a Gal diferentes de α 2,3 o ácidos siálicos unidos a GalNAc por α 2,3 (Toivonen y otros, 2002). Por ejemplo, digestión de glicanos estomacales tratados con α 2,3-sialidasa por sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens*, picos completamente digeridos a m/z 1931,6 $[\text{NeuAc}_1\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4\text{-H}]^-$ (m/z calc. = 1931,7), m/z 2077,9 $[\text{NeuAc}_1\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4\text{Fuc-H}]^-$ (m/z calc. = 2077,9), m/z 2223,3 $[\text{NeuAc}_2\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4\text{-H}]^-$ (m/z calc. = 2223,0), m/z 2369,4 $[\text{NeuAc}_2\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4\text{Fuc-H}]^-$ (m/z calc. = 2369,1), m/z 2735,1 $[\text{NeuAc}_2\text{Hex}_6\text{HexNAC}_5\text{Fuc-H}]^-$ (m/z calc. = 2734,5), y m/z 3026,5 $[\text{NeuAc}_3\text{Hex}_6\text{HexNAC}_5\text{Fuc-H}]^-$ (m/z calc. = 3025,7). Debido a su gran tamaño y a su típica composición de monosacáridos, estos glicanos serían muy probablemente N-glicanos, pero también podrían ser O-glicanos. Sin embargo los glicanos más pequeños que también se vieron afectados por la sialidasa de *A. ureafaciens*, en concreto a m/z 1038,7 $[\text{NeuAcHex}_2\text{HexNAC}_2\text{-H}]^-$ (m/z calc. = 1038,9) y m/z 1185,4 $[\text{NeuAcHex}_2\text{HexNAC}_2\text{Fuc-H}]^-$ (m/z calc. = 1185,1), serían con mayor probabilidad O-glicanos. Debe tenerse en cuenta que, en todas las estructuras de este párrafo que llevan un solo resto de ácido siálico, la unión debe ser por α 2,6 (o α 2,3 a GalNAc).

EJEMPLO II

Las especies gástricas examinadas en el presente estudio incluyeron los aislados de *Helicobacter mustelae* de hurón de la Colección nacional de cultivos tipo (NCTC) y de la Colección de cultivos de la universidad de Göteborg (CCUG) NCTC 12198/CCUG 25175 (cepas equivalentes de diferentes fuentes ensayadas), CCUG 23950 y CCUG 23951, *Helicobacter felis* CCUG 28539 de un gato; además se usaron las cepas de *H. pylori* CCUG 17874, CCUG 17875 y un aislado clínico 119/95. Los helicobacter enterohepáticos de origen animal se adquirieron de la CCUG, incluyendo *Helicobacter canis* CCUG 33835, *Helicobacter bilis* CCUG 38995, *Helicobacter hepaticus* CCUG 33637 y *Helicobacter fennelliae* (CCUG 18820).

Ensayos de unión a glicolípidos

Se revela la unión de Helicobacter spp. a los glicoesfingolípidos, tanto a las fracciones ácidas como a las no ácidas

Se aislaron glicoesfingolípidos por procedimientos estándar (Karlsson, 1987). La identidad de los glicoesfingolípidos purificados se confirmó mediante espectrometría de masas (Samuelsson y otros, 1990), espectroscopía de RMN de protones (Koerner y otros, 1983) y estudios de degradación (Stellner y otros, 1973; Yang y Hakomori, 1971).

Posteriormente las mezclas de glicoesfingolípidos (40 μ g/banda) o los compuestos puros (2 μ g/banda) se separaron por cromatografía de capa fina (CCF) en placas de HPTLC de gel de sílice 60 con base de vidrio o aluminio (Merck, Darmstadt, Alemania), con cloroformo/metanol/agua (60: 35: 8, en volumen) como sistema disolvente. La detección química se realizó con anisaldehído (Waldi, 1962). Las *Helicobacter* spp. se marcaron con S³⁵ (Ångström y otros, 1998) y se suspendieron en PBS (10⁸ UFC/ml), con una actividad específica de aproximadamente 1 cpm por 100 organismos. La unión de las bacterias marcadas a los glicoesfingolípidos separados por CCF se consiguió con una técnica de recubrimiento bacteriano acoplado a detección autorradiográfica, empleando películas XAR-5 de rayos X (Eastman Kodak, Rochester, NY), tal como se ha descrito anteriormente (Hansson y otros, 1985).

Especificidades de unión a carbohidratos de las especies de *zHelicobacter*. Se ha demostrado anteriormente para los casos de *H. felis*, *H. canis*, *H. hepaticus* y *H. bilis* que tanto el *H. pylori* como el *H. mustelae* se unen a la ganglio-tetraosilceramida (tabla 3). Además, al igual que con *H. pylori*, encontramos que las *Helicobacter* spp. ensayadas,

tanto gástricas como enterohepáticas, se podían unir a lactotetraosilceramida, lactosilceramida con fitoesfingosina y/o ácidos grasos hidroxilados e isoglobotriaosilceramida. Por el contrario, la unión al glicoesfingolípido Leb solo se observó en el caso de *H. pylori* CCUG 17875 (tabla 3).

5 La unión de algunas cepas de *H. pylori* a gangliósidos de migración lenta en la fracción de glicoesfingolípidos ácidos de los granulocitos humanos depende del ácido siálico (Miller-Podraza y otros, 1999) y por lo tanto esta fracción se empleó como indicador de reconocimiento del ácido siálico. La unión a esta fracción se observó para *H. hepaticus* CCUG 33637 (ejemplificada en la fig. 4B, banda 1) y *H. pylori* CCUG 17874, y ocasionalmente para *H. mustelae* CCUG 25715 (tabla 3). La capacidad de unión al ácido siálico ensayada con otras sustancias también está presente
10 al menos en especies de *H. bilis*.

La capacidad de unión de las especies predominantemente gástricas y enterohepáticas de bacterias *Helicobacter* a los glicoesfingolípidos es indicativa del uso de la unión huésped-carbohidrato por estas especies en sus estrategias de adhesión.

15 Se revela que las especificidades de unión de las diferentes helicobacterias pueden ser indicativas de la capacidad de colonizar un nicho específico, expresando distintos receptores en el intestino y en el árbol hepatobiliar. Asimismo puede ser conveniente el uso de distintas estrategias en distintos momentos de la infección, debido a los cambios en la expresión del antígeno por el tejido inflamado (Mahdavi y otros 2002). El presente estudio revela la evidencia de
20 que las cepas de helicobácter hepatobiliares, en concreto *H. hepaticus* y *H. bilis*, comparten estrategias de adhesión comunes con *H. pylori*. Estos tipos de agentes patógenos hepatobiliares se pueden unir a varios glicoconjugados e incluso a algunas estructuras sialiladas.

EJEMPLO III

25 Producción de conjugados polivalentes solubles de las secuencias oligosacáridas según la presente invención.

Amidación de oligosacáridos de quitosano

30 Para obtener quitosano aminooxi-funcionalizado, el quitosano de 19 unidades preparado del modo anteriormente descrito se amidó con ácido BOC-aminoxiacético. Se disolvió una muestra del quitosano en piridina acuosa al 75% y se añadió un exceso 5 veces molar (respecto a los grupos amino del quitosano) de ácido BOC-aminoxiacético, HBTU y diisopropiletilamina. Se dejó reaccionar durante 42 h a temperatura ambiente, en la oscuridad, y después se secó por evaporación rotatoria. Los reactivos de bajo peso molecular se eliminaron por diálisis y el quitosano se
35 analizó por RMN protónica. El análisis indica que, en promedio, había 4,5 grupos de BOC-aminoxiacetilo presentes en la cadena de quitosano.

Conjugación de carbohidratos de biorreconocimiento con el aminooxi-quitómero

40 Eliminación de los grupos protectores por incubación con ácido trifluoroacético (TFA). Los quitómeros modificados con Boc-O-hidroxilamina se disolvieron en TFA y se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. El TFA se eliminó por evaporación al vacío. Varias moléculas que llevaban aldehído se hicieron reaccionar con los grupos terminales de O-hidroxilamina en tampón de acetato de sodio 0,2 M, pH 4,0, durante 42 horas a 37°C. Los productos de reacción se purificaron por diálisis contra agua o por cromatografía de filtración en gel.

45 El producto de reacción entre el O-hidroxilamina-quitómero y la lactosa se identificó por espectroscopía de RMN. El espectro de RMN indicó la presencia de una estructura glucosídica β -anomérica, señal H1 de Glc a 4.136 ppm, y de una forma oxima con doble enlace, señales H1 y H2 de Glc a 7.690 ppm y 4.626 ppm, respectivamente (fig. 3, A y B, respectivamente). Las señales a 4.560 ppm y 4.512 ppm se asignaron a H1 y la señal a 3.054 ppm a protones H2 de la cadena principal de GlcN. La señal a 4.479 ppm corresponde a la señal H1 de Gal del resto de lactosa. La señal a
50 4.163 ppm y la señal a 4.449 ppm corresponden a los protones CH₂ de la forma glicosídica ciclada y de la forma de doble enlace, respectivamente, en el espaciador formado a partir del ácido aminoxiacético. Se obtienen datos casi idénticos cuando la Lacto-N-neotetraosa está acoplada al vehículo polimérico; además se pudieron analizar señales de la N-acetil-lactosamina terminal.

55

Tabla 1. Cepas bacterianas de *E. coli* diarreaica ensayadas para la unión a glicolípidos separados en placas de CCF

Dos de las cepas tipo, CCUG 38068 y CCUG 38077, se analizaron con mayor detalle frente a una larga lista de glicolípidos naturales; véase la tabla separada. Las demás cepas ensayadas tienen unas especificidades de unión similares a las de los dos tipos de cepas de esta tabla, pero los patrones de unión de las cepas individuales varían de manera similar a la variación entre las dos cepas tipo ensayadas en detalle.
CCUG 17649 ETEC
CCUG 17650 ETEC
CCUG 38068 EPEC
CCUG 38077 EAEC
CCUG 38083 EAEC
CCUG 38092 EIEC
CCUG 38094 EIEC
12 cepas de EAEC
9 cepas de EHEC
14 aislados clínicos de <i>E. coli</i> diarreaica

5 Las abreviaturas son de Nataro y Kaper, Clin. Microbiol. Rev.11 (1998) 142, y significan: ETEC enterotoxígena, EPEC enteropatógena, EAEC enteroagregativa, EIEC enteroinvasiva, EHEC enterohemorrágica *E. coli*.

Tabla 2. Unión de *Escherichia coli* diarreaica a glicoesfingolípidos en cromatogramas de capa fina

Nº Nombre común	Estructura	CCUG 38068	CCUG 38077	Fuente
<i>Compuestos individuales</i>				
1. Cerebrósido d18:1-16:0-24:0 ^a	Gal α β 1Cer	- ^b	-	Riñón porcino
2. Cerebrósido d18:1-16:0-24:0	Glc α β 1Cer	-	-	Riñón porcino
3. Sulfátido	SO ₃ -Gal α β 1Cer	-	-	Meconio humano
4. LacCer d18:1-16:0 y 24:1	Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Granulocitos humanos
5. LacCer t18:0-h16:0-h24:0	Gal β 4Glc β 1Cer	+	+	Intestino delgado de conejo
6. Galabiosil	Gal α 4GalCer	+	+	C
7. Isogtobtri	Gal α 3Gal β 4Glc β 1Cer	+	+	Intestino canino
8. Globotri	Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer	+	+	Eritrocitos humanos
9. Lactotri	GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Granulocitos humanos ^d
<i>Ganglioserie</i>				
10. Gangliotri	GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer	+	+	Eritrocitos de cobaya
11. Gangliotetra	Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4G β 1Cer	+	+	Heces de ratón
<i>Globoserie</i>				
12. Globotetra	GalNAc β 3Gal β 4Gal β 4Glc β 1Cer	+	+	Eritrocitos humanos
13. Isoglobotetra	GalNAc β 3Gal α 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Carcinoma de colon de rata
14. Forssman	GalNAc α 3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4G1c α β 1Cer	+	+	Intestino canino
<i>Neolactoserie</i>				
15. Neolactotetra	Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+	+	Granulocitos humanos
16. H5-2	Fuca2Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Eritrocitos humanos
17. B5	Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Gc β 1Cer	-	-	Eritrocitos de conejo
18. B6-2	Gal α 3(Fuca2)Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Eritrocitos

				humanos
19. A6-2	GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1C	-	-	Eritrocitos humanos
20. A7-2	GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 4(Fuca3)GlcNAc α β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Eritrocitos humanos
21.	Gal β 4GlcNAc β 6(Gal β 4GlcNAc β 3)Gal β 4Glc β Cer	-	-	Leche cortada bovina
22.	Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+	+	Timo de conejo
<i>Lactoserie</i>				
23. Lactotetra	Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+	+	Meconio humano
24. Le ^a -5	Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+	-	Meconio humano
25. Le ^b -6	Fuca2Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Meconio humano
26. B7-1	Gal α 3(Fuca2)Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Intestino de mono

(continuación)

Nº Nombre común	Estructura	CCUG 38068	CCUG 38077	Fuente
<i>Gangliósidos</i>				
27. NeuAc-GM3	NeuAc α 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Cerebro humano
28. NeuGc-GM3	NeuGc α 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	+	Eritrocitos equinos
29. GM1	Gal β 3GalNAc β 4(NeuAc α 3)Gal β 4Glc β 1Cer	-	+	Cerebro humano
30. GD1a	NeuAc α 3Gal β (NeuAc α 3)Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Cerebro humano
31. NeuAc α 3SPG	NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer	-	+	Eritrocitos humanos
32. NeuAc α 6SPG	NeuAc β 6Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	+	Meconio humano
33. NeuGc α 3SPG	NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	+	Timo de conejo
34. NeuAc α 3Le ^a	NeuAc α 3Gal β 3(Fuca4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	+	Tumor de vejiga biliar humana
35. NeuAc α 3Le ^x	NeuAc α 3Gal β 4(Fuca3)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer"	-	+	Sintético
36.	NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer	+	+	Timo de conejo
37.	Gal β 4GlcNAc β 6(NeuAc α 6Gal β 4GlcNAc β 3)Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Leche cortada bovina
38. Gc-GD2	GalNAc β 4(NeuGc α 8NeuGc α 3)Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Intestino bovino
39. Ac-GD3	NeuAc α 8NeuAc α 3Gal β 4Glc β 1Cer	-	-	Leche cortada bovina

a) En la nomenclatura abreviada de ácidos y bases grasos, el número antes de los dos puntos se refiere a la longitud de la cadena carbonada 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-hidroxilo se señalan con el prefijo h antes de la abreviatura, p.ej. h16:0. En las bases de cadena larga, d significa dihidroxi y t trihidroxi. Por lo tanto d18:1 significa esfingosina (1,3-dihidroxi-2-aminooctadeceno) y t18:0 fitoesfingosina (1,3,4-trihidroxi-2-aminooctadecano).

b) La unión se define de la siguiente manera: + indica un oscurecimiento significativo en el autorradiograma tras la aplicación de 2 μ g del glicoesfingolípido sobre la placa de capa fina, mientras que - significa que hubo unión.

c) El glicoesfingolípido nº 6 fue un amable obsequio del Dr. K. Stenvall, de Symbicom AB, Lund, Suecia.

d) El glicoesfingolípido nº 9 15 por tratamiento con β -galactosidasa.

e) El glicoesfingolípido nº 22 se preparó a partir del nº 36 por hidrólisis en medio ácido débil.

Tabla 3. Unión de especies de *Helicobacter* marcadas con S³⁵ a glicoesfingolípidos en cromatogramas de capa fina

Nombre común	Estructura	Unión ^a de los glicoesfingolípidos a:									
		<i>H. pylori</i> 17874	<i>H. pylori</i> 17875	<i>H. felis</i> 28539	<i>H. canis</i> 33835	<i>H. hepaticus</i> 33637	<i>H. mustelae</i> 25715	<i>H. mustelae</i> 23950 & 23951	<i>H. bilis</i> 38995		
LacCer	Galβ 4Glcβ1Cer ^b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isoglobotri	Galc3Galβ4Glcβ1Cer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GgO4	Galβ3GalNAcβ4Galβ4Glcβ1Cer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Le ^a -5	Galβ3(Fuca4)GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Le ^b -6	Fuca2Galβ3(Fuca4)GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Globotetra	GalNAcβ3Galα4Galβ4Glcβ1Cer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactotetra	GalNAcβ3Galα4Galβ4Glcβ1Cer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicoesfingolípidos humanos	ácidos de granulocitos	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
NeuGcnLc ₆ NeuGca3(Galβ4GlcNAcβ3) ₂ Galβ4Glcβ1Cer		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^a La unión se define de la siguiente manera: + indica un oscurecimiento significativo en el autorradiograma tras la aplicación de 2 µg (o de 40 µg en el caso de la última muestra) sobre las placas de CCF, mientras que - significa que hubo unión.

^b Composición de ceramida (t18:0-h16:0-h24:0)

Tabla 4. Especificidades de unión detectadas en diferentes cepas del tipo E. coli

	CCUG	CEPA						
		ETEC 17649	ETEC 17650	EPEC 38068	EAGG 38077	EIEC 38092	EIEC 38094	EHEC wt
Especificidad								
LacCer-OH		+	+	+	+	+	+	+
Ganglio		+	+	+	+	+	+	+
Lacto		+	+	+	+	+	+	+
NeoLacto		+	+	+	+	+	+	+
Globo		+	+	+	+	+	+	-
Lea		ND	ND	+	ND	+	ND	+
Ácido siálico		-	-	-	+	-	-	-

5 REFERENCIAS

- Angstrom, J., S. Teneberg, M. A. Milh, T. Larsson, I. Leonardsson, B. M. Olsson, M. O. Halvarsson, D. Danielsson, N. a. I, A. Ljungh, T. Wadström, y K. A. Karlsson. 1998. *Glicobiología* 8:297-309.
- Bartus, H., Actor, P., Snipes, E., Sedlock, D., y Zajac, I. J. *Clin Invest* (1985) 21, 951-954
- 10 Borén, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G. y Normark, S. (1993) *Science*, 262, 1892-1895.
- Cravioto, A., Tello, A., Villafan, H., Ruiz, J., del Vedovo, S., y Neeser, J-C. (1991) *J. Infect. Dis.* 1247-1255
- De Ree, J.M., Schwillens, P., y van den Bosch, JF *FEMS Microbiol. Lett.*, (1985) 29, 91-97
- Dewhurst, F.E., Fox, F.G., y On, S.L.W. (2000) *Int. J. Syst. Evol Microbiol.* 50, 2231-37
- 15 Ernst, B., Hart, G.W., y Sinay, P. (editores) (2000) *Carbohidratos en química y en biología*, ISBN 3-527-29511-9, Wiley-VCH, Weinheim
- Evans, D.G., Evans, D.J. jr., Glegg, S., Pauley, J.A. *Infect. Immun* (1979) 25, 738-748
- Evans, D. G., Evans Jr., D.J., Molds, J. J., y Graham, D. Y. (1988) *Infect. Immun.*, 56, 2896-06
- Firon, N., Ofek, I., y Sharon, N. *BBRC* (1982) 105, 1426-1432
- 20 Fox, J.G. (2002) *Gut* 50, 273-283.
- Fox, J. G., N. S. Taylor, M. Ihrig, M. I. Esteves, R. T. Chung, y M. M. Kaplan. 2000. *Gut* 47:A67-A67
- Gerhard, M., S. Hirno, T. Wadstrom, H. Miller-Pedroza, S. Teneberg, K. A. Karlsson, B. J. Appelmek, S. Odenbreit, R. Haas, A. Arnqvist, y T. Boren. 2001. p. 185-206. In M. Achtman y S. Suerbaum (ed.), *Helicobacter pylori: Biología Molecular y Celular*. Horizon Scientific Press, Wymondham
- 25 Hansson, G. C., Karlsson, K.-A., Larson, G., Strömberg, N., y Thurin, J. (1985) *Anal. Biochem.* 146, 158-163
- Harvey, D.J., y otros (1993) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7(7):614-9
- Hunt, R. H. 1996. *Scy J Gastroenterol Suppl* 220:3-9
- Idota, T., y Kawakami, H. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (1) 69-72.
- Jagannatha, H.M., Sharma, U.K., Ramaseshan, T., Surolia, A., y Balganes, T.S. (1991) *Patogénesis Microbiana* (11) 259-268.
- 30 Karlsson, K.-A. (1987) *Methods Enzymol.* 138, 212-220
- Koerner Jr., T. A. W., Prestegard, J. H., Demou, P. C., y Yu, R. K. (1983) *Biochemistry* 22, 2676-2687
- Lingwood, C. A., Huesca, M. y Kuksis, A. (1992) *Infect. Immun.*, 60, 2470-2474.
- Mahdavi, J., B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. Karlsson, S. Altraja, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K.-E. Magnusson, T.
- 35 Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarström, T. Boren, y T. Boren. 2002. *Actas del 5º congreso internacional sobre patogénesis y respuesta del huésped a las infecciones por Helicobacter: P3*
- Miller-Podraza, H., J. Bergström, S. Teneberg, M. Abul Milh, M. Longard, B.-M. Olsson, L. Uggla, y K.-A. Karlsson. 1999. *Infect Immun* 67:6309-13.
- Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Bergström, J. y Karlsson, K.-A. (1996) *Glycoconj. J.*, 13, 453-460.
- 40 Miller-Podraza, H., Bergström, J., Abul Milh, M. y Karlsson, K.-A. (1997a) *Glycoconj. J.*, 14, 467-471.
- Mysore, J.V., Wiggington, T., Simon, P.M., Zopf, D., Heman-Ackah, L.M. y Dubois, A. (1999) *Gastroenterology*, 117, 1316-1325.
- Nakamura, T., Kawase, H., Kimura, K., Watanabe, Y., Ohtani, M., Arai, I., y Urashima, T (2003) *J. Dairy Sci.* 86: 1315-1320.
- 45 Nakhla, T., Fu, D., Zopf, D., Brodsky, N., y Hurt, H. (1999) *British J. Nutr.* 82, 361-367.
- Nascimento de Araújo, A., y Giugliano, L.G. (2001) *BMC Microbiol.* 1, 25. Nascimento de Araújo, A., y Giugliano, L.G. (2000) *FEMS Microbiol Lett* 184, 91-94
- Neeser, J.-R., Koellreutter, B., y Wuersch, P. (1986) *Infect. Immun* 52, 428-436.
- 50 Neeser, J.-R., Chambaz, A., Golliard, M., Link-Amster, H., Fryder, V., y Kolodziejczyk (1989) *Infect. Immun* 57, 3727-3734
- Nilsson, H. O., M. Castedal, R. Olsson, y T. Wadstrom. 1999. *J Physiol Pharmacol* 50:875-82
- Nyman, T.A., y otros (1998) *Eur. J. Biochem.* 253(2):485-93
- On, S. L. 2001. *J Appl Microbiol* 90 Suppl: 1S-155.
- Oroe, H.S., Kolstoe, A-B., Wennerås, C., y Svennerholm, A.-M. *FEMS Microbiol Lett* (1990), 289-292.

- Papac, D.I., y otros (1996) *Anal. Chem.* 68(18):3215-23
- Pieroni, P., Worobec, E.A., Paranchych, W., y Armstrong, G.D. (1988) *Infect. Immun.* 56, 1334-1340.
- Saarinen, J., y otros (1999) *Eur. J. Biochem.* 259(3):829-40
- 5 Saitoh, T., Natomi, H., Zhao, W., Okuzumi, K., Sugano, K., Iwamori, M. y Nagai, Y. (1991) *FEBS Lett.*, 282, 385-387.
- Samuelsson, B. E., Pimlott, W., y Karlsson, K.-A. (1990) *Methods Enzymol.* 193, 623-646
- Scatelsky, I.C.A., Milani, S.R., Trabulsi, L.R., y Travassos, L.R. *Infect Immun* (1988) 56, 2979-298
- Sears, P. y Wong, C-H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 12086-12093.
- Simon, P. M., Goode, P. L., Mobasser, A., y Zopf, D. (1997) *Infect. Immun.* 65, 750-757.
- 10 Stellner, K., Saito, H., y Hakomori, S.-i. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 464-472
- Teneberg, S., I. Leonardsson, H. Karlsson, P.Å., Jovall, J., Angstrom, D. Danielsson, I. Näslund, A. Ljungh, T. Wadström, y K. A. Karlsson. 2002. *J Biol Chem* 277:19709-19
- Toivonen, S., y otros (2002) *J. Biol. Chem.* 276(40):37141-8
- 15 Vanmaele, R.P., Finlayson, M.C., y Armstrong, G.D. (1995) *Infection y Immunity* 63 (1) 191-198
- Vanmaele, R.P., Heerze, L.D., y Armstrong, G.D. (1999) *Infection y Immunity* 67, 3302-7
- Waldi, D. (1962) *Dünnschicht-Chromatographie [Cromatografia en capa fina]*. (Stahl, E., ed.) p. 496-515. Editorial Springer, Berlín
- Wennerås, C., Neeser, J-R., y Svennerholm A.-M. *Infection y Immunity* (1995) 640-646.
- Wennerås, C., Holmgren, J., y Svennerholm A.-M. *FEMS Microbiol Lett* (1990) 66, 107-112
- 20 Yang, H. J., y S. I. Hakomori. 1971. *J Biol Chem* 246:1192-200.

REIVINDICACIONES

1. Composición terapéutica que comprende la fracción o fracciones purificadas de al menos dos compuestos que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos, seleccionada entre receptores de lactosilceramida escogidos entre los receptores de agentes patógenos definidos por la fórmula



en la cual

n4 y m3 son independientemente el número entero 0 or 1

donde la secuencia de tipo natural A1, activadora del extremo no reductor, se escoge del grupo formado por GalNAc β 4, Gala4, Neu5X α 3, Neu5X α 6, GalNAc β 3Gal α 4, Gal β 3GalNAc β 4 Gal β 4GlcNAc β 3, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, Gal β 3GlcNAc β 3, Neu5X α 3Gal β 4GlcNAc β 3, Neu5X α 6Gal β 4GlcNAc β 3 y Gal β 3(Fuca3)GlcNAc β 3, donde es independientemente Ac o Gc y A2 es una ceramida que comprende un ácido graso hidroxilado;

con la condición de que las secuencias oligosacáridas contengan al menos A1 o A2 o ambas.

2. La composición según la reivindicación 1, en la cual A1 se escoge del grupo formado por Gal α 4, Neu5X α 3, Neu5X α 6, Gal β 4GlcNAc β 3 o Gal β 3GlcNAc β 3.

3. La composición según las reivindicaciones 1 o 2 para usar en el tratamiento de la diarrea.

4. La composición según la reivindicación 3 para usar en el tratamiento de la diarrea causada por uno de los cinco tipos principales de *E. coli* causante de diarrea, concretamente EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxígena), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva) e incluso por cepas de *E. coli* de tipo natural no tipificadas o no tipificables causantes de diarrea.

5. La composición según las reivindicaciones 1 o 2 para usar en el tratamiento de infecciones gastrointestinales.

6. Uso de la composición según las reivindicaciones 1 o 2 para neutralizar agentes patógenos o bacterias en el interior o sobre la superficie de productos alimenticios.

7. La composición terapéutica de la reivindicación 1 o 2 para la preparación de una composición nutracéutica, farmacéutica, nutricional o fórmula infantil destinadas al tratamiento de diarreas o infecciones gastrointestinales, en las cuales la diarrea es producida por uno de los cinco tipos principales de *E. coli* causantes de diarrea, en concreto EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxígena), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva) e incluso por cepas de *E. coli* de tipo natural no tipificadas o no tipificables causantes de diarrea.

8. Composición terapéutica que lleva fracciones purificadas de al menos dos compuestos que son o contienen una secuencia oligosacárida inhibidora de agentes patógenos seleccionada entre los receptores de lactosilceramida definidos por la fórmula



en la cual x es la posición de enlace 3 o 4, R₂ es una ceramida que comprende un ácido graso hidroxilado o un análogo de ceramida que comprende un ácido graso hidroxilado que comprende un ácido graso hidroxilado y R₁ es Gal α , Gal β , GalNAc β , GlcNAc β o un oligosacárido más largo que lleva Gal α , Gal β , GalNAc β o GlcNAc β en el extremo reductor o Neu5X α , donde X es Ac o Gc, con la condición de que si R₂ es GlcNAc β o Neu5X α , x es 3.

9. La composición terapéutica de la reivindicación 8 para la preparación de una composición nutracéutica, farmacéutica, nutricional o fórmula infantil destinadas al tratamiento de diarreas o infecciones gastrointestinales, en las cuales la diarrea es producida por uno de los cinco tipos principales de *E. coli* causantes de diarrea, en concreto EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxígena), EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) y EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva) e incluso por cepas de *E. coli* de tipo natural no tipificadas o no tipificables causantes de diarrea.

Fig. 1

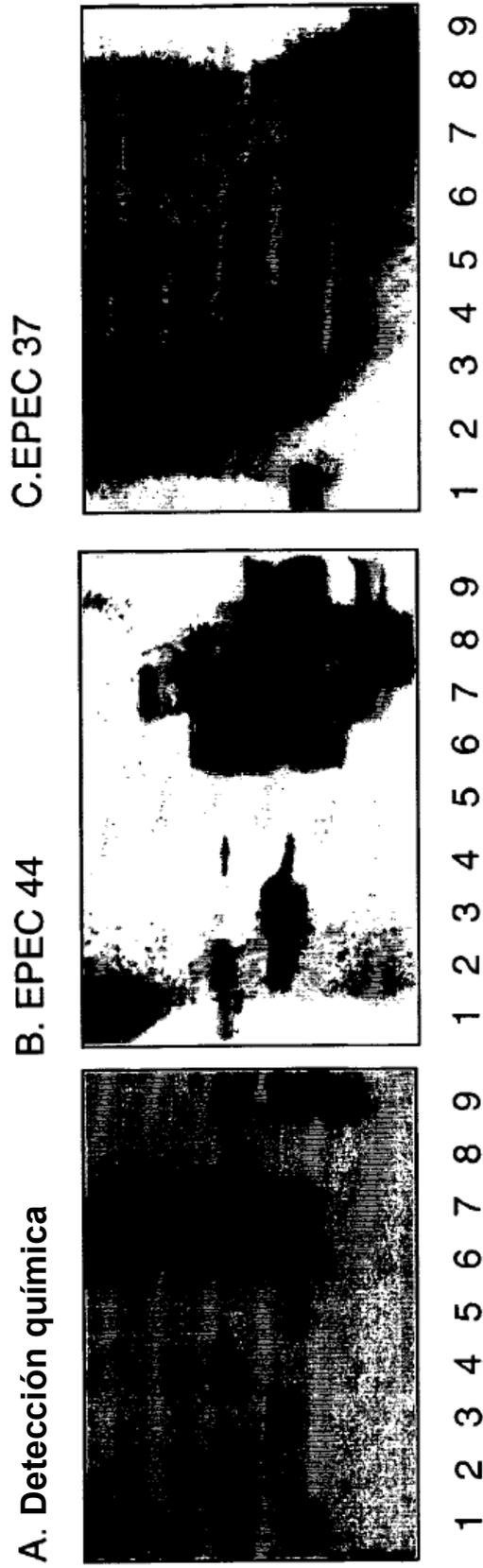
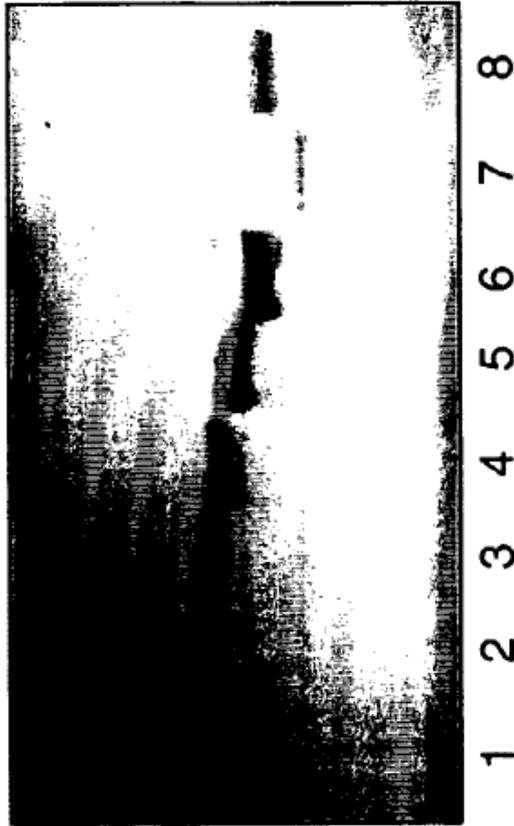


Fig. 2

A. Detección química



B. CCUG 38077

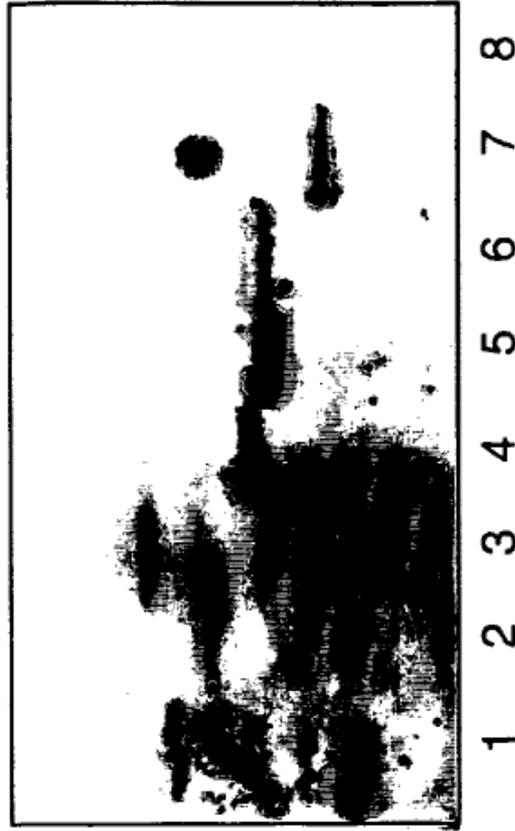


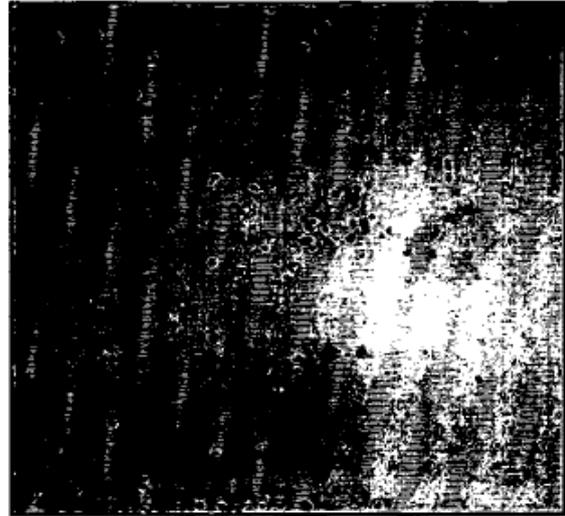
Fig. 3

A. EPEC 44



1 2 3 4 5 6

B. EPEC 44 + globotetraosa
(1.5 mM) + 3'-sialil-lactosa
(1.5 mM)



1 2 3 4 5 6

Fig. 3C

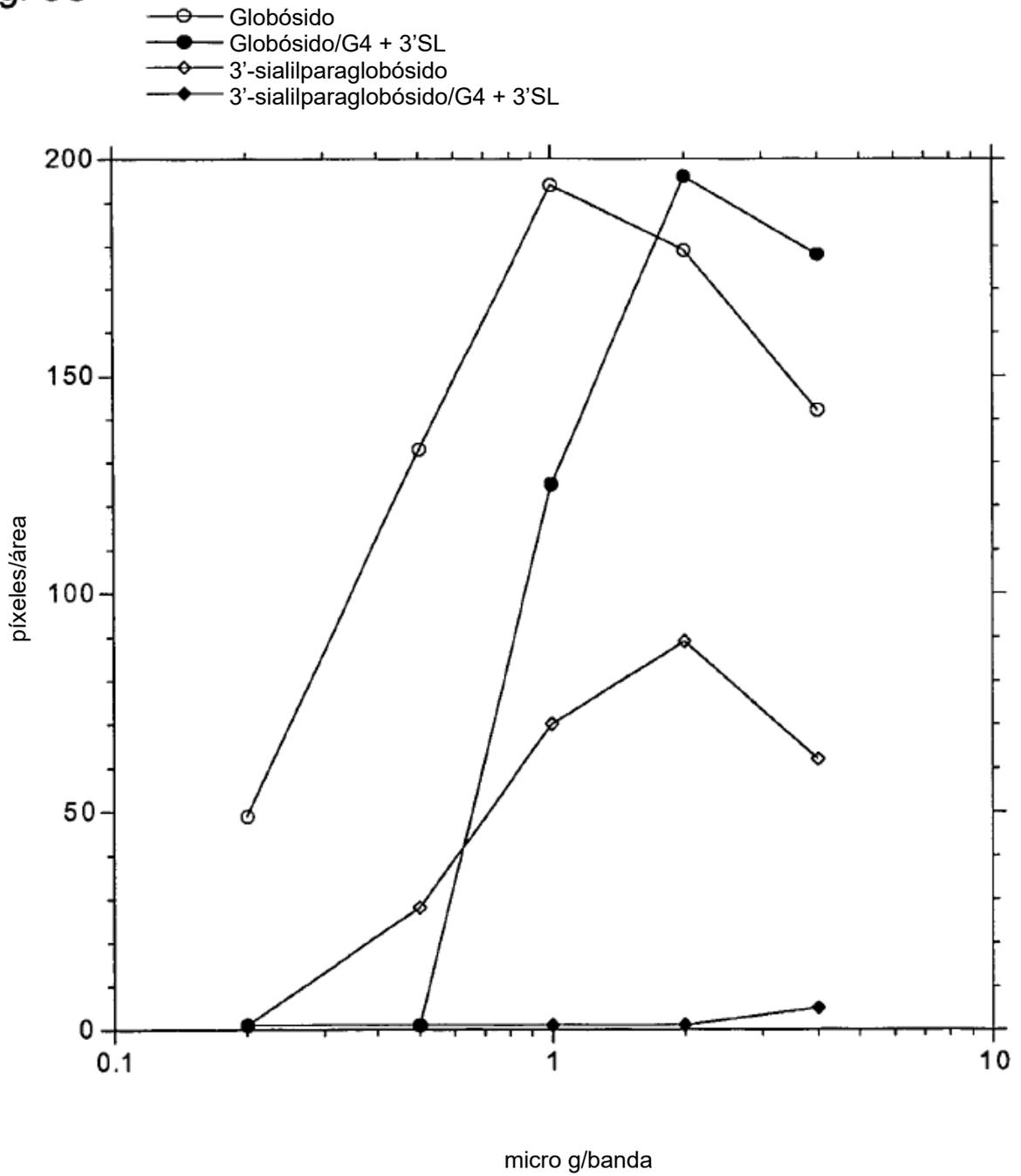


Fig. 4

A. Detección química



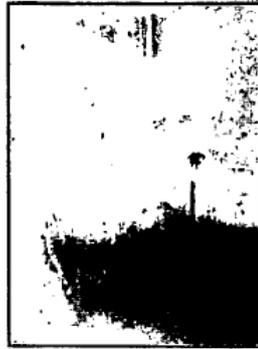
B. *H. pylori* 17875



C. *H. pylori* 17874



D. *H. felis* 28539



1 2 3 4 5 6 7 8

E. *H. bilis* 38995B



1 2 3 4 5 6 7 8

F. *H. hepaticus* 33637



1 2 3 4 5 6 7 8

G. *H. canis*



1 2 3 4 5 6 7 8

H. *H. mustelae* 23951



1 2 3 4 5 6 7 8

I. *H. mustelae* 25715



1 2 3 4 5 6 7 8

Fig. 5

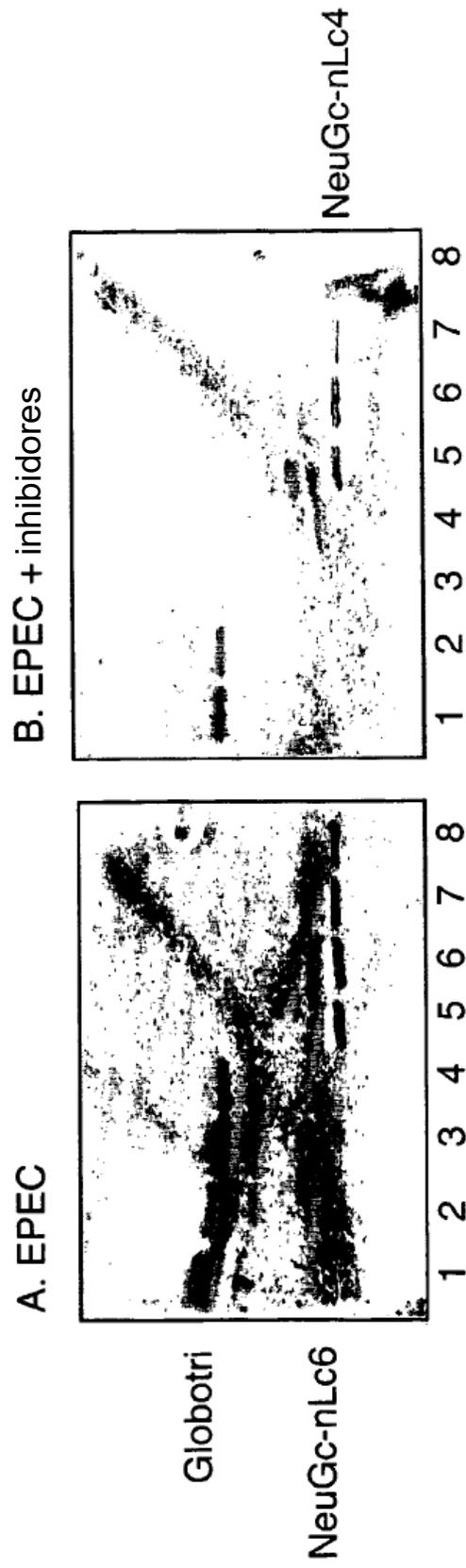
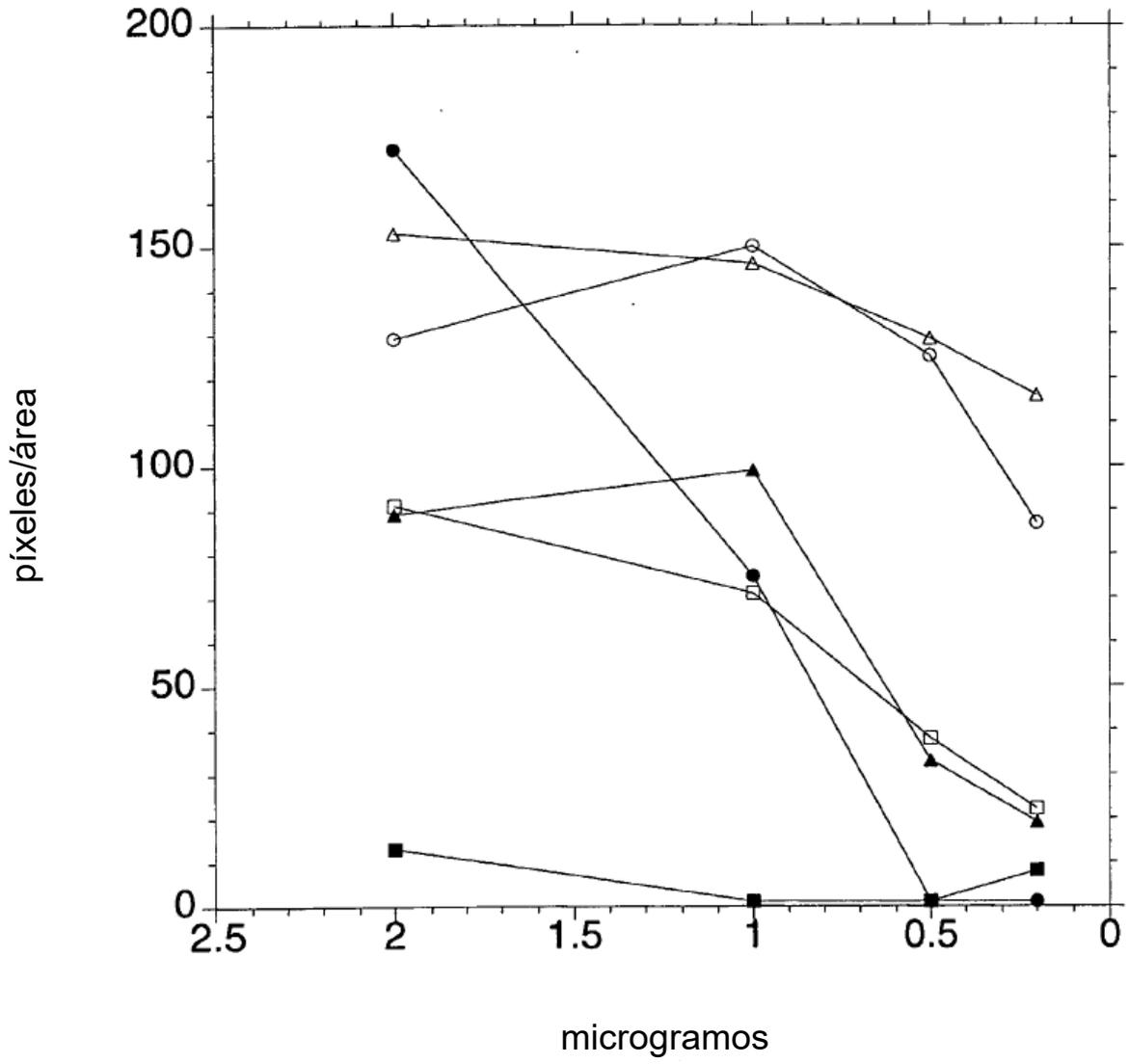


Fig. 5C



EHEC W135A



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Fig. 6

Fig. 7

A. CCUG 38092



1 2 3 4 5 6

B. CCUG 38092



1 2 3 4 5 6