



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 197 811**

② Número de solicitud: 200200794

⑤ Int. Cl.7: **C07D 499/44**

C07D 499/04

G01N 21/64

C09K 11/06

C12Q 1/34

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **05.04.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2004**

Fecha de la concesión: **04.04.2005**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
03.03.2005

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.2005**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.05.2005

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Orellana Moraleda, Guillermo;
Aparicio Lara, Santiago;
Moreno Bondi, María Cruz y
Benito Peña, Elena**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Síntesis de derivados fluorescentes de antibióticos β -lactámicos.**

㉑ Resumen:

Síntesis de derivados fluorescentes de antibióticos β -lactámicos.

Se describe la síntesis, purificación y caracterización de antibióticos beta-lactámicos (b-lactámicos) altamente fluorescentes que tienen aplicaciones, entre otras, para la determinación de la actividad enzimática de beta-lactamasas, el estudio de proteínas de la membrana bacteriana, el análisis de medios de fermentación microbianos o en el desarrollo de métodos analíticos rápidos y sensibles para detectar cualitativa o cuantitativamente antibióticos (en fluidos de origen biológico, en preparados y formulaciones farmacéuticas, en alimentos de origen animal, etc.). Dichos métodos analíticos pueden basarse, si bien no está limitado a ellos, en procedimientos cromatográficos, enzimáticos, inmunológicos o en el uso de polímeros de impresión molecular (molecularly imprinted polymers).

ES 2 197 811 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Síntesis de derivados fluorescentes de antibióticos β -lactámicos.

5 Sector de la técnica

La invención se refiere a los campos bioquímico/biotecnológico/biológico (ensayos de actividad enzimática e inmunoensayos), médico-farmacéutico (compuestos con actividad antibiótica y antimicrobial), químico-analítico (determinaciones de compuestos antibióticos y fármacos, especialmente por cromatografía líquida o HPLC) y químico-orgánico (métodos de síntesis de moléculas orgánicas con actividad antibiótica).

Estado de la técnica

15 Penicilinas y cefalosporinas (Figura 1) constituyen el grupo de los denominados antibióticos beta-lactámicos "clásicos" (varios autores, *Analytical Profiles of Drug Substances*, vols. 1-17, Academic Press, Nueva York, 1972-1988), ya que su estructura contiene un anillo heterocíclico de tipo beta-lactama. No obstante, existen muchos análogos estructurales con propiedades antibióticas que contienen el anillo beta-lactámico, tales como los oxacefems y carba-
20 penems, en los cuales el átomo de azufre heterocíclico de penicilinas y cefalosporinas es reemplazado por oxígeno o por carbono, o las nocardinas y monobactamas, que son monocíclicas. Los mecanismos de la acción bactericida de estas moléculas son extremadamente complejos, aunque los fundamentos esenciales sí se conocen. Los antibióticos beta-lactámicos son letales para las bacterias pero ino-
25 cuos para los mamíferos debido a que su toxicidad resulta de la interferencia de dichas moléculas con la biosíntesis de la pared celular bacteriana, que las células de los mamíferos no poseen. Existe una gran presión osmótica en el interior de una célula bacteriana en crecimiento debido al incremento de nutrientes y, por ello, la ausencia de una fuerte pared celular causa la ruptura de la membrana celular con la consecuente pérdida del contenido celular, lo que conduce a la muerte de la misma.

Así, los antibióticos beta-lactámicos son atacados químicamente por alguno de los grupos nucleofílicos de la enzima que regula la biosíntesis de la pared celular. Esta reacción, que conlleva la apertura del tenso anillo de la beta-lactama y la acilación del grupo nucleofílico de la enzima, da lugar a productos que no son capaces de catalizar de
30 forma efectiva el crecimiento de la pared celular, causando la inhibición irreversible de la enzima. Un antibiótico beta-lactámico efectivo debe ser lo suficientemente estable para alcanzar a la enzima bacteriana sin descomposición, pero a la vez debe ser capaz de sufrir el ataque nucleofílico de dicha enzima.

El diseño de antibióticos β -lactámicos eficaces no resulta sencillo debido a la alta susceptibilidad del grupo carbonilo beta-lactámico a sufrir ataque nucleofílico, lo que se traduce, por ejemplo, en una gran facilidad para experimentar hidrólisis. La reactividad de las penicilinas es incluso mayor que la de las beta-lactamas simples debido a la presencia de dos anillos fusionados en su esqueleto fundamental.

La derivatización fluorescente de sondas moleculares es un área de gran actualidad, pues está permitiendo avances
40 espectaculares en diagnóstico médico, técnicas de imagen en Fisiología, investigación bioquímica, monitorización medioambiental y análisis químico en general (ver, por ejemplo, R.P. Haughland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9th edition, Molecular Probes, Eugene, OR, 2004; Prasanna de Silva *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 8336). La síntesis de compuestos beta-lactámicos fluorescentes, y más concretamente de antibióticos tales como las penicilinas, incluyendo la amoxicilina o la ampicilina, es un objetivo de máximo interés, debido al gran
45 número de aplicaciones que presentan estas moléculas, ya sea para la determinación de la actividad enzimática de beta-lactamasas, el estudio de proteínas de la membrana bacteriana, el análisis de medios de fermentación microbianos o en el desarrollo de métodos analíticos rápidos y sensibles para detectar cualitativa o cuantitativamente antibióticos (en fluidos de origen biológico, en preparados y formulaciones farmacéuticas, en alimentos de origen animal, entre otros) (ver, por ejemplo, varios autores, *Analytical Profiles of Drug Substances*, vols. 1-17, Academic Press, Nueva York, 1972-1988; Chen *et al.*, *Patente* US 4740459; Chen, *Patente* WO 8903889; Tsien y Zlokarnik, *Patente* WO 9630540 y *Patente* US 5741657; Rogers *et al.*, *J. Chromatography* 1984, 297, 385; Medina, *ACS Symp. Ser.* 1996, 636, 132; Sternesjö y Johnsson, *J. Food Prot.* 1998, 61, 808). Dichos métodos analíticos pueden basarse, si bien no está limitado a ellos, en procedimientos cromatográficos, enzimáticos, inmunológicos o en el uso de polímeros de impresión molecular (*molecularly imprinted polymers*). Estas aplicaciones requieren o hacen muy deseable disponer
50 de antibióticos marcados fluorescentemente para llevar a cabo, con elevada sensibilidad y selectividad, la etapa de detección tras, por ejemplo, un ensayo de tipo competitivo con el antibiótico no marcado.

El estudio de los enlaces que tienen lugar en las PBPs (*penicillin-binding proteins* o proteínas que se unen a penicilinas) presentes en las membranas bacterianas representa el modo más sencillo para determinar el papel que desempeñan estas proteínas en procesos como la división celular (Spratt y Pardee, *Nature* 1975, 254, 516) o en los mecanismos intrínsecos de resistencia en bacterias patógenas de gran importancia como *Streptococcus*, *Enterococcus* o *Pseudomonas*. Una de las técnicas más utilizadas para llevar a cabo este tipo de estudios ha sido la descrita por B. G. Spratt (*Eur. J. Biochem.* 1977, 72, 341) hace más de 20 años, en la que se emplean penicilinas marcadas radiactivamente. Sin embargo, la principal limitación del método estriba en el tiempo necesario para realizar los ensayos que, en el caso de la detección de PBPs puede llegar a ser de varios días o incluso semanas. Además existe una dificultad
65 añadida debido a la peligrosidad intrínseca de los marcajes radiactivos del antibiótico beta-lactámico.

Por ello, se han desarrollado otros procedimientos de derivatización fluorescente de penicilinas, que permiten la

detección de menos de 10 fmol de PBPs. Así, J.-M. Frère y cols. (*Biochem. J.* **1994**, *300*, 14 y *Biochem. J.* **1993**, 291, 19) han descrito y llevado a cabo la síntesis, purificación y el estudio de propiedades cinéticas de antibióticos marcados con fluoresceínas, o con compuestos de coordinación de boro, flúor y pirrometeno (Zhao *et al.*, *Antimicrobial Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1124), que han permitido desarrollar nuevos métodos muy sensibles para la identificación y cuantificación de PBPs. Sin embargo, estos autores no mencionan ni describen los antibióticos fluorescentes objeto de la presente patente. Además, la polaridad intrínseca del marcador fluorescente utilizado por Frère y cols. (fluoresceína), una molécula aniónica, resulta indeseable si se precisan, por ejemplo, antibióticos fluorescentes solubles en medio no acuoso. Más aún, la intrínseca emisión verde de la fluoresceína puede resultar indeseable o interferente en ensayos combinados con otros sustratos o moléculas marcadas cuya fluorescencia aparezca en la misma región. Por otra parte, el marcador fluorescente utilizado por Zhao *et al.* exhibe un pequeño desplazamiento Stokes entre la longitud de onda necesaria para la excitación (504 nm) y la longitud de onda necesaria para la detección (511 nm), lo que dificulta la fácil separación de ambas imprescindible para la correcta cuantificación de PBPs. Los derivados fluorescentes objeto de la presente invención presentan desplazamientos Stokes muy superiores, facilitando grandemente la discriminación de la luz emitida y la utilizada para excitar el derivado fluorescente.

Se ha descrito la preparación de derivados fluorescentes de antibióticos beta-lactámicos con *orto*-ftaldialdehído (Rogers *et al.*, *J. Chromatography* **1984**, *297*, 385), fluorescamina (Nakagawa *et al.*, *Yakugaku Zasshi* **1985**, *105*, 1096), 9-isotiocianatoacridina (Sinseimer *et al.* *J. Pharm. Sci.* **1969**, *58*, 1041) o dansil-hidrazina (Munns *et al.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1985**, *68*, 968) para la determinación cromatográfica de dichos antibióticos. Asimismo, se ha descrito anteriormente la preparación de antibióticos beta-lactámicos que incorporan en su estructura complejos luminiscentes de rutenio(II) para la cuantificación de la actividad de beta-lactamasas (Liang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9198). Sin embargo, todos estos documentos no mencionan, ni sugieren los antibióticos fluorescentes objeto de la presente patente. Además, las longitudes de onda de excitación y de emisión de la fluorescencia de dichos derivados conocidos, no se encuentran en la misma región que las de los antibióticos fluorescentes que aquí se describen por vez primera, lo que puede resultar inapropiado para muchas aplicaciones de las mencionadas más arriba. Más aún, ninguna de estas publicaciones describe el aislamiento y purificación de los antibióticos beta-lactámicos fluorescentes, sino su generación *in situ* en una extensión desconocida, por lo que no podrían utilizarse en algunas aplicaciones de las mencionadas más arriba.

Por su parte, Cartwright; y Fink (*FEBS Lett.* **1982**, *137*, 186) han publicado la síntesis de dansil-penicilina (G) y su empleo como sustrato fluorogénico para la determinación de la actividad de enzimas beta-lactamasas. Además de no hacer mención ni sugerencia alguna a la posibilidad de preparación de los antibióticos fluorescentes objeto de la presente invención, el muy pequeño rendimiento cuántico de emisión de los derivados dansilados cuando se encuentran en medio acuoso, como señalan dichos autores, hace muy difícil la monitorización de su fluorescencia en dicho medio, cuando no están asociados a la enzima.

También se ha descrito la preparación y usos de sustratos para beta-lactamasas dotados simultáneamente de una entidad fluorescente y una entidad desactivadora de la fluorescencia en la misma molécula (Tsien y Zlokarnik, *Patente* WO 9630540; Tsien y Zlokarnik, *Patente* US 5,955,604; Tsien y Zlokarnik, *Patente* US 5,741,657). Sin embargo, mientras que los sustratos descritos por estos autores poseen un anillo de beta-lactama y algunas de las aplicaciones enumeradas más arriba, la necesaria presencia simultánea del grupo fluorogénico y del desactivador de su emisión, limita el número y variedad de antibióticos beta-lactámicos que se pueden preparar. Además, los autores no revelan, describen, ni sugieren la utilización de los marcadores fluorescentes objeto de la presente invención.

Por otra parte y debido a los límites máximos establecidos por la Unión Europea y otros gobiernos u organismos reguladores, para las concentraciones de antibióticos en leche (por ejemplo, EC Commission Regulation no. 2701/94 de Nov. 1994), se han desarrollado diversos procedimientos analíticos cromatográficos para la determinación de penicilinas y otros antibióticos beta-lactámicos en leche (Fletouris *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 617; Moats y Harik-Khan, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1995**, *78*, 49; Blanchflower *et al.*, *Analyst* **1994**, *119*, 2595). También se han empleado métodos de detección de los antibióticos beta-lactámicos por espectroscopía de absorción UV, aunque la absorción a longitudes de onda de 220 nm o 230 nm presenta muchos problemas debido a las interferencias de otras especies y a los límites de detección del método. Por esta razón se están desarrollando métodos de detección por fluorescencia, en los que la sensibilidad es mucho mayor. Sin embargo, la mayoría de los antibióticos de interés carecen de fluoróforos, por lo que resulta imprescindible llevar a cabo la derivatización de los antibióticos empleando la funcionalidad amino que presentan, o sintetizar análogos fluorescentes con el esqueleto básico del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) en su estructura, aspectos ambos que revela la presente invención.

Los ejemplos de moléculas de este tipo recogidos en la bibliografía ponen de manifiesto las dificultades sintéticas que conlleva la preparación de estas estructuras ya que, aunque se encuentran descritas diversas técnicas de derivatización de antibióticos, en la mayoría de los casos las correspondientes penicilinas fluorescentes no se han aislado ni purificado. Además, las referencias generales mencionadas más arriba (Haughland; Prasanna de Silva *et al.*) no revelan ni sugieren en modo alguno los grupos fluorogénicos ni los antibióticos fluorescentes objeto de la presente patente.

La presente invención revela la síntesis, purificación y caracterización de antibióticos beta-lactámicos fluorescentes (derivados de la estructura de penicilinas, incluyendo amoxicilina, ampicilina, cefalosporinas y ácido 6-aminopenicilánico, aunque no limitados de ningún modo a éstos) que poseen en su estructura una entidad de pireno como agente altamente fluorogénico.

Descripción de la invención

Síntesis de derivados fluorescentes de antibióticos beta-lactámicos.

5 La presente invención revela la síntesis, purificación y caracterización de antibióticos beta-lactámicos altamente fluorescentes que tienen aplicaciones, entre otras pero sin estar restringido a ellas, para la determinación de la actividad enzimática de beta-lactamasas, el estudio de proteínas de la membrana bacteriana, el análisis de medios de fermentación microbianos o en el desarrollo de métodos analíticos rápidos y sensibles para detectar cualitativa o cuantitativamente antibióticos (en fluidos de origen biológico, en preparados y formulaciones farmacéuticas, en alimentos de origen animal, etc.). Dichos métodos analíticos pueden basarse, si bien no está limitado a ellos, en procedimientos cromatográficos, inmunológicos, enzimáticos o en el uso de polímeros de impresión molecular (*molecularly Imprinted polymers, MIPs; como los descritos por* Sellergren, editor, “*Molecularly Imprinted Polymers*”, Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 23, Elsevier, Amsterdam, 2001).

15 Asimismo, la invención describe la obtención de derivados de antibióticos beta-lactámicos (derivados de la estructura de penicilinas y cefalosporinas, incluyendo amoxicilina, ampicilina y ácido 6-aminopenicilánico, aunque no limitados en ningún modo a éstos) que poseen en su estructura un fluoróforo o grupo fluorogénico de tipo pireno, unido a través del grupo amino que presenta el antibiótico o su precursor beta-lactámico.

20 Más concretamente, la invención describe la obtención y el empleo de derivados de antibióticos beta-lactámicos en cuya estructura se ha introducido un grupo de átomos o sub-estructura molecular que emite luz (fluorescencia) ultravioleta y visible (360-470 nm) al ser excitado o iluminado con luz ultravioleta (200-370 nm), sin afectar a la bioactividad de la molécula original. Los derivados que aquí se revelan se obtienen, en general, por procedimientos químicos que comprenden dos etapas de síntesis, a partir del ácido 6-aminopenicilánico o del propio antibiótico original, siempre que este último contenga en su estructura molecular un grupo amino libre.

La síntesis de los derivados, que incluyen *pireno* como grupo fluorogénico en su estructura, consta de dos etapas. En la primera, tiene lugar la activación de los correspondientes ácidos carboxílicos derivados del pireno (por ejemplo, ácido 1-pirenoacético o ácido 1-pirenobutírico comerciales o cualquier otro ácido carboxílico que presente en su estructura una o más unidades de pireno) a su forma reactiva frente al ataque de un grupo amina. Los derivados activados se obtienen con unos rendimientos excelentes al hacer reaccionar, por procedimientos convencionales (por ejemplo, los descritos por G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, New York, 1996), los ácidos carboxílicos mencionados con *N*-hidroxisuccinimida o *N,N*-diciclohexilcarbodiimida comerciales, entre otros agentes descritos en la bibliografía para tal fin solubles en agua o en medios no acuosos (R. P. Hughland, editor, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 8ª edición, Molecular Probes, Leiden, Holanda).

En la segunda etapa tiene lugar la unión o condensación, en medio básico, entre el derivado activado del ácido carboxílico obtenido previamente y el antibiótico o el ácido 6-aminopenicilánico, de forma análoga al procedimiento descrito por Lakaye *et al.* en *Biochem. J.* **1994**, *300*, 141. Esta etapa se lleva a cabo, preferiblemente, en ausencia de luz con el fin de evitar fotodegradaciones del grupo fluorogénico y controlando cuidadosamente la acidez del medio, ya que a valores del pH superiores a 8.5 o inferiores a 2.5, aproximadamente, los antibióticos beta-lactámicos se degradan significativamente de forma rápida.

El aislamiento y purificación de los antibióticos fluorescentes se realiza preferiblemente mediante sucesivas extracciones a medios acuosos y orgánicos, ya que dichos compuestos descomponen térmicamente, por lo que no es conveniente recristalizarlos. Los productos obtenidos deben almacenarse preferiblemente protegidos de la luz, a -5°C y bajo atmósfera de argón.

La única limitación encontrada a estas reacciones es que no deben alterar la estructura molecular fundamental (responsable de su actividad como tal) del antibiótico beta-lactámico o del ácido 6-aminopenicilánico precursor, excepto en lo que se refiere al grupo amino libre de los mismos.

Más aún, en una forma de llevarla a cabo aunque sin estar restringida a ella, la patente revela, la aplicación de los antibióticos beta-lactámicos fluorescentes para la determinación de antibióticos beta-lactámicos en una muestra cuya concentración se desconoce *a priori* y, en particular, en alimentos de origen animal, mediante el empleo de los denominados polímeros de impresión molecular (*molecularly imprinted polymers* o *MIPs*).

Descripción de las figuras

60 La invención incluye unas figuras que con carácter representativo muestran:

La Figura 1 muestra las estructuras moleculares típicas de antibióticos beta-lactámicos de tipo penicilinas y cefalosporinas (R es la parte de la molécula que contiene el grupo amino) y del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), además de las estructuras resultantes de unir a los mismos un grupo pireno (R es la parte de la molécula que contiene el grupo fluorogénico de tipo pireno).

La Figura 2 muestra con un ejemplo un esquema general de la obtención de antibióticos beta-lactámicos (Ab)

ES 2 197 811 B2

provistos de un grupo fluorogénico de tipo pireno no activados; Clave: Py = grupo pireno (a modo de ejemplo se muestra el 1-pirenil).

Modo de realización de la invención

5

La invención referida a la obtención de derivados de antibióticos beta-lactámicos altamente fluorescentes se obtienen por un procedimiento químico que comprende bien una o dos etapas (Figura 2).

Primera etapa

10

Preferiblemente, para la activación previa de los correspondientes ácidos carboxílicos derivados del pireno (por ejemplo, ácido 1-pirenoacético o ácido 1-pirenobutírico comerciales o cualquier otro ácido carboxílico que presente en su estructura una o más unidades de pireno) a su forma reactiva frente al ataque de un grupo amina, se hace reaccionar 1 equivalente de ácido carboxílico disuelto en 1,4-dioxano anhidro con 1.1 equivalentes de N-hidroxisuccinimida y 1.1 equivalentes de N,N-diciclohexilcarbodiimida, preferiblemente bajo atmósfera de argón y en ausencia de luz. La mezcla de reacción se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante los tiempos que se indican en cada ejemplo. Transcurrido este tiempo, se enfría a 0°C con baño de hielo y se filtra a través de placa filtrante. El precipitado se lava sucesivamente con 1,4-dioxano frío (2x10 mL) y con éter dietílico frío (2x10 mL). El filtrado se despoja del disolvente por destilación del mismo a presión reducida, dando lugar a un sólido que, atendiendo a sus datos espectroscópicos, se identifica como el correspondiente succinimidil éster.

Segunda etapa

25

Una vez realizada la activación del ácido carboxílico que contiene pireno, se añade bicarbonato sódico acuoso al 4% (2.5 equivalentes) sobre una suspensión en acetona de 1.3 equivalentes de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) o el antibiótico beta-lactámico que posee uno o más grupos amino libres. Cuando se ha disuelto el antibiótico o el 6-APA y preferiblemente en ausencia de luz, se adiciona una disolución en acetona de 1 equivalente del N-hidroxisuccinimidil éster del ácido carboxílico que presente en su estructura una o más unidades de pireno sintetizado previamente, y se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se elimina la acetona por destilación a presión reducida y se añade agua. Se extrae la mezcla con éter dietílico y la fase acuosa se acidifica hasta pH 2.5 con ácido fosfórico acuoso al 10%. El sólido que precipita en estas condiciones se extrae repetidamente con éter dietílico. Después de secar sobre sulfato magnésico anhidro los extractos orgánicos combinados, se elimina el disolvente a presión reducida, obteniendo el correspondiente antibiótico marcado fluorescentemente, que se purifica por extracción a medio básico acuoso (bicarbonato sódico acuoso al 5%), posterior acidulación (ácido fosfórico acuoso al 10%) y re-extracción con éter dietílico.

30

A título ilustrativo y sin que sea considerado como limitación al alcance de la presente patente, se ilustran a continuación ejemplos de la unión química de los grupos fluorogénicos pireno al grupo amino libre de antibióticos beta-lactámicos o al ácido 6-aminopenicilánico (Figura 1), así como el empleo de uno de los derivados que contiene el grupo pireno, para análisis cuantitativo en una muestra de un antibiótico beta-lactámico (por ejemplo, Penicilina G) mediante el uso de polímeros de impresión molecular. Los reactivos químicos y disolventes que se mencionan en los ejemplos están disponibles comercialmente de uno o más fabricantes entre los que se encuentran, por ejemplo, Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Avocado, Molecular Probes, etc.

40

Ejemplo 1

Preparación del éster succinimidílico del ácido 1-pirenoacético

A partir de una disolución de 103 mg (0.39 mmol) de ácido 1-pirenoacético comercial en 15 mL de dioxano anhidro, 50.1 mg (0.43 mmol) de N-idroxisuccinimida y 87.9 mg (0.43 mmol) de N,N-diciclohexilcarbodiimida y siguiendo el procedimiento general de síntesis y purificación, descrito más arriba, se obtienen, tras 2 horas de agitación a temperatura ambiente, 116 mg (85%) de un sólido marrón-verdusco (punto de fusión: 195-197°C) que se identifica como el éster succinimidílico del ácido 1-pirenoacético por sus espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono-13, su espectro de absorción infrarroja, su espectro de masas y su microanálisis elemental.

55

Ejemplo 2

Preparación del éster succinimidílico del ácido 1-pirenobutírico

A partir de una disolución de 2.0 g (6.94 mmol) de ácido 1-pirenobutírico comercial en 69 mL de dioxano anhidro, 879 mg (7.64 mmol) de N-hidroxisuccinimida y 1.57 g (7.64 mmol) de N,N-diciclohexilcarbodiimida y siguiendo el procedimiento típico de síntesis y purificación, descrito más arriba, se obtienen, tras 25 horas de agitación a temperatura ambiente, 2.66 g (98%) de un sólido blanco (punto de fusión: 128-129°C) que se identifica como el éster succinimidílico del ácido 1-pirenoacético por sus espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono-13, su espectro de absorción infrarroja, su espectro de masas y su microanálisis elemental.

65

ES 2 197 811 B2

Ejemplo 3

Obtención del ácido [2S-(2 α 5 α 6 β)]-6-(1'pirenilacetilamino)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0.]heptano-2-carboxílico

5 (abreviadamente PAAP; ver fórmula en la figura sobre el rótulo “penicilinas”, donde R=(1-pirenil)-CH₂-).

10 Sobre una suspensión de 315 mg (1.45 mmol) de 6-APA en 2 mL de acetona, se añaden 8 mL de bicarbonato sódico acuoso al 4%. Cuando se ha disuelto el antibiótico beta-lactámico, se adicionan 400 mg (1.12 mmol) del éster succinimidílico del ácido 1-pirenoacético, cuya síntesis se describe en el Ejemplo 1, disuelto en 12 mL de acetona y, siguiendo el procedimiento general descrito más arriba, se obtienen 228 mg (44%) de un sólido amarillo pálido (punto de fusión: 148°C, descompone), que se identifica como el PAAP por sus espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono-13, su espectro de absorción infrarroja, su espectro de masas y su microanálisis elemental. El antibiótico resultante PAAP emite una intensa fluorescencia cuyo máximo se encuentra a 376 nm, cuando se ilumina con luz de longitud de onda inferior a 367 nm.

Ejemplo 4

20 *Obtención del ácido [2S-(2 α 5 α ,6 β)]-6-[4'-(1"pirenil)-1'-oxobutilamino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0.]heptano-2-carboxílico*

(abreviadamente PBAP; ver fórmula en la figura sobre el rótulo “penicilinas”, donde R=(1-pirenil)-CH₂-CH₂-CH₂-).

25 Sobre una suspensión de 129.2 mg (0.59 mmol) de 6-APA en 3 mL de acetona, se añaden 4 mL de bicarbonato sódico acuoso al 4%. Cuando se ha disuelto el antibiótico beta-lactámico, se adicionan 177 mg (0.46 mmol) del succinimidil éster del ácido pirenobutírico disuelto en 7 mL de acetona y siguiendo el procedimiento general descrito más arriba, se obtienen 71 mg (32%) de un sólido amarillo pálido (punto de fusión: 89°C, descompone) que se identifica como el PBAP por sus espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono-13, su espectro de absorción infrarroja, su espectro de masas y su microanálisis elemental. El antibiótico resultante PBAP emite una intensa fluorescencia cuyo máximo se encuentra a 374 nm, cuando se ilumina con luz de longitud de onda inferior a 367 nm.

Ejemplo 5

35 *Obtención del ácido [2S-(2 α ,5 α ,6 β)]-6-[(N-(1'-pirenilacetil)amino)(4'-hidroxifenil)acetilamino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0.]heptano-2-carboxílico*

(abreviadamente PAAX; ver fórmula en la figura sobre el rótulo “penicilinas”, donde R=(1-pirenil)-CH₂-CONH-CH-C₆H₄-OH).

40 Sobre una suspensión de 224.7 mg (0.61 mmol) de amoxicilina comercial en 1 mL de acetona, se añaden 3.5 mL de bicarbonato sódico acuoso al 4%. Cuando se ha disuelto el antibiótico beta-lactámico, se adicionan 169 mg (0.47 mmol) del éster succinimidílico del ácido 1-pirenoacético disuelto en 6 mL de acetona y, siguiendo el procedimiento general descrito más arriba, se obtienen 147 mg (45%) de un sólido amarillo pálido (punto de fusión: 159°C, descompone) que se identifica como PAAX por sus espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono-13, su espectro de absorción infrarroja, su espectro de masas y su microanálisis elemental. El antibiótico resultante PAAX emite una intensa fluorescencia cuyo máximo se encuentra a 374 nm, cuando se ilumina con luz de longitud de onda inferior a 367 nm.

Ejemplo 6

50 *Determinación del antibiótico beta-lactámico penicilina G en una muestra mediante un polímero de impresión molecular y el antibiótico beta-lactámico fluorescente PAAP*

55 Se comienza realizando múltiples medidas de la fluorescencia a 373 nm del PAAP, obtenido según el Ejemplo 3, en disolución en acetonitrilo-agua 99:1 v/v, a concentración inferior a 1 mmol L⁻¹, cuando éste se ilumina a 333 nm con un espectrofluorímetro comercial (por ejemplo el SPEX-Fluorolog 2 que manufactura y comercializa la firma Jobin-Yvon-Horiba, Francia). La representación gráfica de dichas mediciones constituye la curva de calibrado del método analítico que permite establecer una correspondencia biunívoca entre concentración de antibiótico fluorescente y la fluorescencia del mismo a 373 nm. Seguidamente y para la preparación previa de un polímero de impresión molecular (MIP) insoluble, específico para penicilina G se emplean, por ejemplo, las proporciones de monómero, entrecruzante, iniciador, disolvente y penicilina G comerciales descritas por Skudar *et al.*, *Anal. Commun.* 1999, 36, 327. Una cantidad conocida del polímero de impresión molecular así obtenido, triturado y tamizado por ejemplo a un tamaño de partícula comprendido entre 25-100 μ m, se pone en contacto durante 12 horas con agitación mecánica, con una disolución del antibiótico beta-lactámico fluorescente PAAP en acetonitrilo-agua 99:1 v/v, determinando a 65 continuación la fluorescencia a 373 nm del sobrenadante cuando éste se ilumina a 333 nm con un espectrofluorímetro comercial (por ejemplo el SPEX-Fluorolog 2). A partir del valor de la fluorescencia medida, y por comparación de la fluorescencia determinada en idénticas condiciones para una solución del PAAP que no ha estado en contacto con el polímero de impresión molecular, se calcula a partir de la curva de calibrado previamente determinada la concentración

ES 2 197 811 B2

de antibiótico fluorescente PAAP que ha quedado unido al polímero. Seguidamente, se adicionan cantidades crecientes de penicilina G comercial, midiendo la señal de fluorescencia del sobrenadante que resulta en cada caso. Una vez más, a partir de esta señal, se calcula en cada caso la concentración de PAAP unida al MIP. La curva de respuesta para el antibiótico beta-lactámico penicilina G se obtiene representando el tanto por ciento (%) de PAAP unido al polímero de impresión molecular, en función de la cantidad de penicilina G presente en la disolución. A partir de la curva de respuesta resultante se puede obtener la concentración de penicilina G presente en una muestra cualquiera que contiene dicho antibiótico en concentración desconocida, siempre que se ponga en contacto con una cantidad perfectamente conocida de PAAP cuyo valor óptimo depende de la concentración de penicilina G en la muestra.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Derivados de antibióticos beta-lactámicos que contienen en su molécula un grupo fluorogénico o fluorescente, **caracterizados** porque el grupo fluorogénico es pireno.

2. Derivados de antibióticos beta-lactámicos según reivindicación 1, **caracterizados** porque emiten fluorescencia ultravioleta o visible al ser iluminados por luz de menor longitud de onda que la emitida.

10 3. Procedimiento de obtención de derivados de antibióticos beta-lactámicos que contienen en su molécula un grupo fluorogénico o fluorescente, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la síntesis posee dos etapas: (1) activación del grupo fluorogénico y (2) unión del grupo activado al precursor.

15 4. Procedimiento de obtención de derivados de antibióticos beta-lactámicos que contienen en su molécula un grupo fluorogénico o fluorescente, según reivindicación 3, **caracterizado** porque el precursor es el ácido 6-aminopenicilánico o cualquier antibiótico beta-lactámico que contenga en su estructura molecular un grupo amino libre.

20 5. Procedimiento de obtención de derivados de antibióticos beta-lactámicos que contienen en su molécula un grupo fluorogénico o fluorescente, según reivindicaciones 3, y 4, **caracterizado** porque cuando la molécula que contiene el grupo pireno está activada, la síntesis consta de una etapa de unión entre dicha molécula y el antibiótico o el ácido 6-aminopenicilánico.

25 6. Uso de los derivados de antibióticos beta-lactámicos, según las reivindicación 1, para la determinación de la actividad enzimática de beta-lactamasas, para el estudio de la membrana bacteriana, para el análisis de medios de fermentación microbianos o en el desarrollo de métodos analíticos rápidos y sensibles para detectar cualitativa y cuantitativamente dichos antibióticos beta-lactámicos.

30 7. Uso de los derivados de antibióticos beta-lactámicos, según las reivindicación 1, para la cuantificación de residuos de antibióticos beta-lactámicos mediante procedimientos analíticos de tipo competitivo que utilizan un anticuerpo o un polímero de impresión molecular específico para el antibiótico beta-lactámico.

35

40

45

50

55

60

65

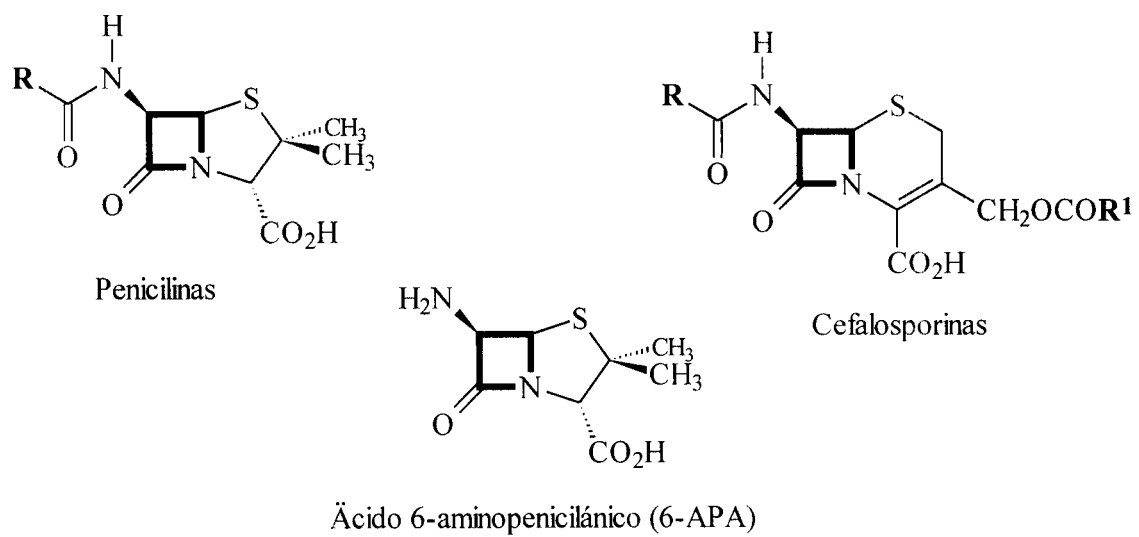


FIGURA 1

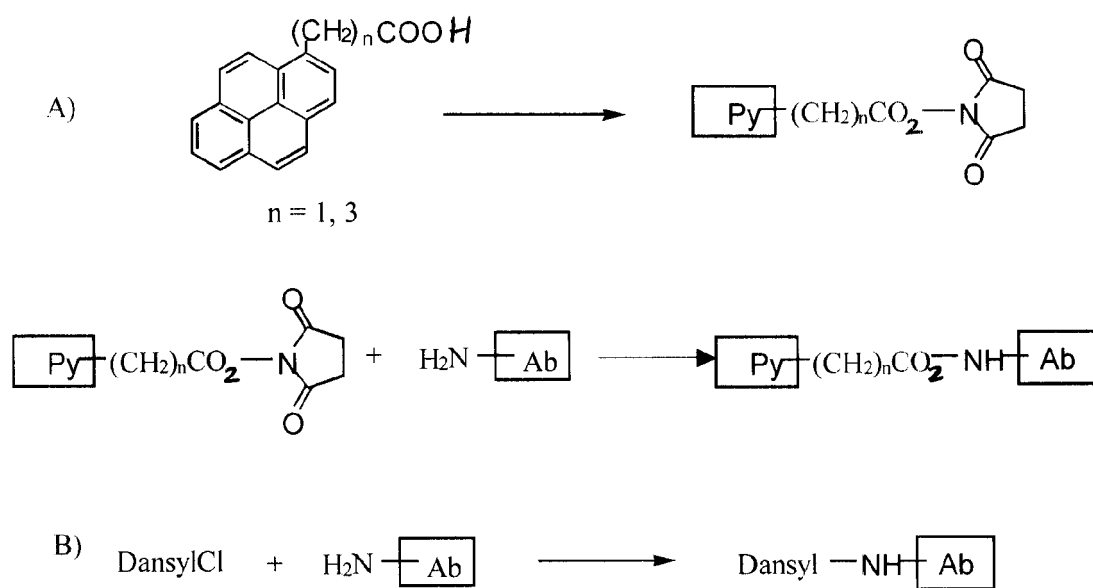


FIGURA 2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 197 811

② Nº de solicitud: 200200794

③ Fecha de presentación de la solicitud: **05.04.2002**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.7:** C07D 499/44, 499/04, G01N 21/64, C09K 11/06, C12Q 1/34

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CARTWRIGHT, S.J. & FINK, A.L. Isolation of a covalent intermediate in beta-lactamase I catalysis. FEBS Letters. Enero 1982, Vol. 137, Nº 2, páginas 186-188.	1-7
X	US 5741657 A (TSIEN, R.Y. & ZLOKARNIK, G.) 21.04.1988, todo el documento.	1-8
X	ZHAO, G. et al. BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of Penicillin-Binding Proteins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Mayo 1999, Vol. 43, Nº 5, páginas 1124-1128.	1,3,8
X	ZLOKARNIK, G. et al. Emerging fluorescence sensing technologies: From photophysical principles to cellular applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Julio 1999, Vol. 96, páginas 8336-8337.	1,3
A	MUNNS, R.K. et al. Multiresidue method for determination of eight neutral beta-lactam Penicillins in milk by Fluorescence-Liquid Chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1985, Vol. 68, Nº 5, páginas 968-971.	8,9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.11.2003

Examinador

G. Esteban García

Página

1/1