

①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①1 Número de publicación: **2 373 836**

②1 Número de solicitud: 201030724

⑤1 Int. Cl.:
C12Q 1/04 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **17.05.2010**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2012**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
09.02.2012

⑦1 Solicitante/s: **Fundación Rioja Salud**
Edificio Cibir
c/ Piqueras, 98
26006 Logroño, La Rioja, ES

⑦2 Inventor/es: **Oteo Revuelta, José Antonio;**
García Álvarez, Lara María;
Avenzoza Aznar, Alberto;
Peregrina García, Jesús María;
Busto Sancirán, Jesús Héctor y
Portillo Barrio, Aranzazu

⑦4 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑤4 Título: **Método para evaluar la susceptibilidad de una población microbiana ante fármacos mediante resonancia magnética nuclear (RMN).**

⑤7 Resumen:

Método para evaluar la susceptibilidad de una población microbiana ante fármacos mediante resonancia magnética nuclear (RMN), que comprende: preparar una muestra del medio de cultivo apta para ser analizada por RMN, preparar una muestra apta para ser analizada por RMN de la población microbiana, añadir el fármaco antimicrobiano a una muestra igual que la de la etapa b), y analizar y/o cuantificar por RMN el resultado obtenido de las etapas anteriores utilizando unos controles adecuados.

ES 2 373 836 A1

DESCRIPCIÓN

Método para evaluar la susceptibilidad de una población microbiana ante fármacos mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

5

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un método para evaluar la susceptibilidad de una población microbiana ante fármacos mediante resonancia magnética nuclear (RMN), el cual se encuentra dentro del sector de las técnicas de análisis de susceptibilidad antimicrobiana de fármacos.

10

Estado de la técnica

Existen numerosos métodos convencionales estandarizados utilizados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana, los cuales, a menudo, son lentos y laboriosos. Frecuentemente, estos métodos muestran problemas tanto en la precisión como en la reproducibilidad, lo que se corresponde con una mala correlación con el resultado terapéutico.

15

Hay bacterias que necesitan condiciones especiales para su manejo y crecimiento, lo que dificulta la realización de estudios de susceptibilidad antimicrobiana. Además, existen pocos estudios *in vitro* de susceptibilidad antimicrobiana frente a estas bacterias, debido a que son bacterias intracelulares obligadas que necesitan sistemas de cultivo celular para llevarlos a cabo, tal como propone Rolain JM *et al.*, en “*In vitro* susceptibilities of 27 rickettsiae to 13 antimicrobials” (Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:1537-1541).

20

Los resultados obtenidos mediante los métodos de referencia disponibles deben ser interpretados con precaución ya que, muchas veces, los datos no pueden extrapolarse directamente a los regímenes de tratamiento usados en la práctica clínica como establecen y, por tanto, no predicen la eficacia terapéutica:

25

- Raoult D. *et al.* “Antimicrobial therapy of rickettsial diseases” (Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:2457-2462).

30

- Maurin M. *et al.* “*In vitro* susceptibilities of spotted fever group rickettsiae and *Coxiella burnetti* to clarithromycin” (Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:2633-2637).

35

En los últimos años han surgido nuevos métodos basados en técnicas moleculares que han ayudado al estudio de la susceptibilidad antibiótica en estos patógenos de difícil manejo. El método de IFI (inmunofluorescencia indirecta) requiere mucho tiempo para lograr la obtención de resultados y, además, no son muy consistentes con la experiencia clínica lo que sugiere la reconsideración del método de Ives TJ, *et al.* “*In vitro* susceptibilities of *Rickettsia* and *Bartonella* spp. to 14-hydroxy-clarithromycin as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected vero cell monolayers” (J Antimicrob Chemother 2000; 45:305-310). La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a tiempo real, a pesar de los buenos resultados obtenidos, todavía debe ser desarrollada, adaptada y estandarizada como establece Rolain JM, *et al.* “Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by a quantitative PCR DNA assay” (Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:2747-2751).

40

45

Descripción de la invención

La presente invención desarrolla un método o técnica que es útil para determinar la susceptibilidad a fármacos antimicrobianos mediante la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), como alternativa para el estudio del metabolismo bacteriano.

50

El estudio de susceptibilidad antimicrobiana tiene como objetivo primordial determinar el fármaco más específico para la terapia de un paciente que sufre un proceso de tipo infeccioso. Se trata de métodos *in vitro* con unas condiciones estandarizadas, que son útiles frente a agentes patógenos cuya susceptibilidad a fármacos no sea predecible o en aquellos microorganismos que hayan adquirido mecanismos de resistencia.

55

Al contrario que otras técnicas analíticas, el método o técnica que se propone aquí emplea la espectroscopia de RMN para el análisis de mezclas. Como consecuencia, los resultados obtenidos son cuantitativos, altamente reproducibles y robustos. Basta una simple preparación de la muestra, que además, puede ser estudiada a menudo en su estado natural, sin necesidad de tratamiento previo.

60

La metabolómica y la metabonomía se desarrollan en el ámbito de la RMN y permiten analizar mezclas directamente, y, en colaboración con métodos de análisis estadístico y quimiométrico, permiten estudiar los resultados obtenidos.

65

ES 2 373 836 A1

En lo que respecta a la investigación de sistemas biológicos, se pueden distinguir tres tipos de aplicaciones:

- En primer lugar, el estudio de la estructura y función de macromoléculas.

5 - En segundo lugar, el estudio de los cambios metabólicos en organismos ante estímulos externos, por medio de la identificación y cuantificación de metabolitos (metabolómica/metabonomía).

10 - Por último, la obtención de imágenes *in vivo* con la técnica de tomografía por resonancia magnética, utilizada en diagnóstico médico.

El método de la presente invención, para evaluar la susceptibilidad de una población microbiana ante fármacos mediante resonancia magnética nuclear (RMN), comprende:

- 15 a) preparar una muestra del medio de cultivo apta para ser analizada por RMN,
- b) preparar una muestra apta para ser analizada por RMN de dicha población microbiana,
- 20 c) añadir el fármaco antimicrobiano a una muestra igual que la de la etapa b), y
- d) analizar y/o cuantificar por RMN el resultado obtenido de las etapas anteriores utilizando unos controles adecuados.

25 De modo preferente, en el método descrito anteriormente, los controles de la etapa d) comprenden:

- obtener el espectro RMN E0 del medio de cultivo,
- 30 - obtener el espectro RMN E1 de la población microbiana,
- obtener el espectro RMN E2 de dicha población microbiana una vez añadido el fármaco antimicrobiano a distintos tiempos,
- 35 - determinar las concentraciones mínimas inhibitorias,
- determinar mediante el cálculo del punto final metabólico, la presencia de metabolitos en M2, punto final metabólico del espectro RMN E2, asociados con el grado de efectividad del fármaco antimicrobiano,
- 40 - comparar los espectros E0, E1 y E2, para identificar ausencia o reducción de picos entre ambos.

Breve descripción de las figuras

45 La figura 1 muestra un esquema general de los componentes de un equipo de RMN.

La figura 2 muestra un ejemplo de espectro con experimentos sobre *Escherichia coli*.

Descripción detallada de un modo de realización

50 Equipo

De forma general, el espectrómetro de RMN consta de varios componentes integrados, capaces de realizar todos los procesos necesarios para obtener un espectro de RMN a partir de una muestra: imán, sonda, consola y ordenador. Debido a la especial naturaleza de los estudios metabólicos (amplio rango de metabolitos para analizar, gran cantidad de muestras disponibles) se requiere un alto grado de automatización en los procesos de preparación de la muestra, realización del análisis y procesado y evaluación de los datos (que puede incluir trabajar con bases de datos).

60 A continuación, se describirá de forma esquemática y desde un punto de vista metabólico, el equipamiento de un espectrómetro de RMN:

- el imán (1) es la parte fundamental del equipo, puesto que genera el campo magnético inductor de la magnetización. En la actualidad se basa en el uso de superconductores realizados con materiales que sólo presentan dicha propiedad a temperaturas cercanas al cero absoluto, por lo que deben estar inmersos en helio líquido. Cuanto más alto sea el campo magnético, mayor será la frecuencia de resonancia de los núcleos y se resolverán mejor las señales de los distintos metabolitos. En la actualidad, se han alcanzado campos de hasta 23.5 Teslas (o 1000 MHz de frecuencia para ¹H), pero dado su alto coste, la mayoría de estudios metabólicos citados en la literatura se han llevado a cabo en equipos de 400 y 600 MHz.

ES 2 373 836 A1

- la sonda (2) es el compartimento donde se coloca la muestra, bien en tubos de cristal de diversos diámetros o en continuo a través de un capilar (sonda de flujo). La sonda también posee los sensores para emitir pulsos de radiofrecuencia y recibir las señales de RMN de los núcleos. Recientemente, nuevos desarrollos tecnológicos en la sonda han permitido mejoras en la obtención de datos de la muestra, como las sondas criogénicas (que no congelan la muestra) y el RMN con rotación en ángulo mágico (HRMAS-NMR) que permite la RMN en estado sólido.

- la utilización de un sistema automatizado para introducir la muestra en la sonda es un requisito casi indispensable en los estudios de metabonómica, por la gran cantidad de muestras y los pequeños volúmenes disponibles. Para ello, se utilizan diversos cambiadores de muestras. En las sondas de flujo las muestras se colocan en una placa de muestras.

- la consola electrónica (3) contiene el transmisor, que genera los pulsos de radiofrecuencia, así como la unidad amplificadora de gradientes, tecnología aconsejable para poder llevar a cabo experimentos metabólicos. También controla la homogeneidad del campo magnético y detecta la señal de la FID (Free Induction Decay) proveniente de la muestra, a través del receptor.

- por último, el ordenador (4) es el encargado de procesar la FID, aplicando la Transformada de Fourier para proporcionar el espectro con las intensidades y frecuencias. También lleva a cabo el procesado y evaluación de los datos.

Tratamiento de la muestra

La obtención de espectros de RMN de calidad depende de diversas variables que influyen en el proceso que va desde la recogida de la muestra hasta la obtención de los datos finales. La recogida de la muestra implica muchos parámetros que pueden afectar a la calidad de la muestra, como son: tipo y medio de la muestra, contenedores usados, aditivos (preservantes, estabilizantes), tiempo (recogida, transporte, almacenamiento).

La espectroscopia de RMN de muestras biológicas precisa un tratamiento previo en función del experimento o programa de pulsos que se ejecute. La preparación de la muestra requiere, por lo general, pocos y simples pasos, para evitar la introducción de compuestos ajenos a ella. Además, se necesita una buena reproducibilidad y robustez en el proceso, dado el alto número de muestras y la obtención de señales débiles y poco resueltas en muchos casos.

Por ejemplo, se realizan pruebas para establecer la cantidades necesarias de agua deuterada (D_2O) así como del patrón interno de referencia necesario para la interpretación. También hay que establecer la necesidad de tamponar la muestra para no tener diferencias en el pH y realizar los experimentos por duplicado o triplicado a fin de reducir al máximo las variaciones en los resultados.

Con cualquiera de los tipos de experimento que se realicen, es preciso obtener una homogeneidad en los desplazamientos químicos de todos los espectros realizados. Para ello, es conveniente adquirir los espectros a un mismo pH, ya que el desplazamiento químico es sensible a esta variable. El pH se ajusta con una disolución amortiguadora fosfatada. La presencia de metales en el medio de la muestra, también puede afectar al desplazamiento químico. Es por esta razón por lo que se adiciona EDTA, que forma quelatos con los metales presentes, no interfiriendo en las señales de RMN.

Una vez realizados estos ajustes se pueden utilizar dos metodologías diferentes para la adquisición del experimento:

a) Concentración de la muestra por medio de liofilización y posterior reconstitución con un disolvente deuterado. Con esta metodología se pueden utilizar experimentos de RMN sin supresión de disolvente, permitiendo aumentar la sensibilidad de la técnica y detener la actividad enzimática. Tiene el riesgo de introducir contaminantes y sobre todo de pérdida de compuestos volátiles.

b) Adición de una pequeña cantidad de D_2O sobre la muestra acuosa. El experimento de RMN correspondiente se realiza con un programa de pulsos que permite suprimir la señal de agua, que, de otra manera, enmascararía las señales del resto de la muestra. Este método implica una mínima manipulación de la muestra y la posibilidad de detectar compuestos volátiles, siendo el más adecuado para el análisis de metabolitos procedentes de células vivas.

Además de todos estos procesos, al ser los microbios muestras biológicas potencialmente contagiosas, en el transcurso de todos los pasos del tratamiento de muestras, en tanto no estén inactivados los organismos, se debe trabajar en condiciones de seguridad, por medio de protocolos y laboratorios con el nivel de bioseguridad adecuado al organismo.

Tratamiento de datos

El análisis espectral constituye otro de los pasos a la hora de llevar a cabo esta técnica. El objetivo es determinar uno o varios marcadores metabólicos que sirvan para establecer un parámetro medible. Una vez obtenido el espectro o conjunto de señales que permite la identificación de diferentes sustancias, se interpreta mediante la comparación con el espectro patrón (sin fármaco), observando el efecto del fármaco sobre la utilización de los nutrientes del medio y/o la producción de metabolitos bacterianos.

ES 2 373 836 A1

De forma más detallada, consiste en:

- experimento de RMN sobre una muestra que sólo contenga el medio de cultivo utilizado, en la misma concentración y volumen que las muestras a investigar que presentan bacterias y diferentes concentraciones de fármaco,

5 - posteriormente, se procede a someter a RMN la muestra que además del medio contenga población bacteriana (al igual que antes, en las mismas condiciones de volumen y concentración). El espectro obtenido se comparará con el resultante de la muestra que sólo contenía medio. Si hubiera, tal y como es de esperar, señales nuevas distintas a cualquiera de las anteriores, desaparición de las ya presentes en la muestra inicial o diferencia en las intensidades de picos de las mismas señales, se procederá a su identificación y cuantificación a partir del área del pico espectral.

15 Por último y del mismo modo que en el caso anterior, se observarán los espectros obtenidos de la(s) muestra(s) que contienen además el antimicrobiano objeto de estudio. El objetivo de estas muestras es observar la ausencia o reducción de crecimiento bacteriano en comparación con la anterior, de modo que, se encuentre uno o varios marcadores identificativos de este proceso:

20 • Que los metabolitos nuevos identificados en la muestra que contiene bacterias pero no en aquellas que carecían de éstas, desaparezcan o disminuyan en esta última prueba (la bacteria no ha podido llevar a cabo su proceso metabólico o a menor número de bacterias menos cantidad de metabolitos).

25 • Que las señales presentes en la muestra que sólo contenía medio de cultivo pero ausentes o disminuidas en aquella que presentaba bacterias (la bacteria ha consumido del medio) aquí sigan igual que en la muestra del medio de cultivo o sean mayores que en la muestra con bacterias (a menor número de bacterias menos consumo o ante ausencia de crecimiento bacteriano los metabolitos del medio sigan intactos).

• Que aparezcan nuevas señales, no presentes en los espectros previos por causas distintas a las anteriores (diferentes rutas metabólicas o productos de degradación ...).

30 Los espectros obtenidos tras someter la muestra a RMN se interpretan en función de los metabolitos producidos y/o consumidos estableciendo un parámetro medible, el MEP o punto final metabólico, a partir del área de los picos espectrales. Éste se define como la concentración más baja de fármaco en la que la utilización de nutrientes del medio o la producción de metabolitos bacterianos sea inhibida $\geq 50\%$ y se compara con las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) obtenidas de otros métodos (PCRrt e IFI). Para obtener este parámetro cuantificable, se calcularán las integrales de área de protón correspondientes a las resonancias obtenidas de los metabolitos deseados y se calcularán en relación a la señal del patrón interno de referencia para la cuantificación y se compararán con las integrales de las muestras de blanco. La creación de curvas de susceptibilidad derivadas del trazado de la concentración de antibiótico ($\mu\text{g}/\text{mL}$) frente a las integrales de pico relativas de determinados metabolitos producidos o nutrientes utilizados

40 permitirá la determinación del MEP.

Para completar los estudios de metabonomía el tratamiento de los datos de RMN obtenidos se realiza de la siguiente forma.

45 En primer lugar, se realiza el pre-procesado de los datos de RMN, etapa en la que se refinan los espectros de RMN y se eliminan interferencias y datos erróneos.

50 Una vez tratados los espectros, se puede obtener información de los metabolitos, bien a través de la cuantificación directa mediante patrones o aplicando los métodos de análisis de datos y modelado. En este último caso se utilizan técnicas de Quimiometría y análisis multivariante, para poder identificar y cuantificar los diferentes metabolitos presentes en la muestra. La existencia de bases de datos de RMN de metabolitos puede facilitar en gran medida estos últimos procesos.

55 *Hongos*

60 Los métodos estandarizados disponibles en la actualidad para realizar estudios de susceptibilidad con hongos son poco fiables y relativamente lentos. La espectroscopia de RMN es un indicador sencillo, objetivo, rápido (los cambios metabólicos detectados por este método son visibles más rápidamente que la inhibición del crecimiento en el caldo de cultivo) y potencialmente valioso para determinar la composición metabólica de suspensiones de levaduras incubadas con fármaco. Además, se trata de un método automatizado, de alto rendimiento y bajo gasto de funcionamiento, de manera que se reducen considerablemente los costes de reactivos y el tiempo del operador.

65 La técnica de RMN se puede aplicar para observar el efecto de microorganismos frente a determinados fármacos. Por ejemplo, especies fúngicas de relevancia médica analizadas tales como *Cryptococcus neoformans*, especies de *Candida* y de *Aspergillus* spp. como *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* y *A. flavus*. En dichos estudios se han podido identificar los metabolitos fúngicos producidos en la realización de perfiles comparativos de éstos y en el seguimiento de la utilización de nutrientes desde el medio de incubación en presencia de determinadas concentraciones

de fármaco (caspofungina, anfotericina B y voriconazol). En particular, para la monitorización de las respuestas metabólicas se utilizó la espectroscopia de RMN de ^1H , mediante un espectrofotómetro Bruker Avance a una frecuencia de 600 y 360 MHz. Los espectros obtenidos tras someter la muestra a RMN se interpretan en función de los metabolitos producidos (fumarato, malato, etanol ...) y/o consumidos (tirosina, fenilalanina, valina ...) estableciendo un parámetro medible, el MEP o punto final metabólico, a partir del área de los picos espectrales. Éste se define como la concentración de fármaco más baja en la que la utilización de nutrientes del medio o metabolitos producidos es inhibida $\geq 50\%$ y se compara con las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) utilizadas en el método de referencia.

Los resultados en forma de MEP mostraron correlación con las CMIs, las cuales se determinaron mediante una modificación del método de referencia en caldo de microdilución M27-Adel Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Con la espectroscopia de RMN se determina la composición metabólica de los microorganismos incubados con fármaco permitiendo una fácil reproducción y rapidez (son necesarias 16 h frente a las 48 h que requiere el método de referencia) lo que resulta ventajoso para la determinación de la susceptibilidad antifúngica.

Existen estudios en los que se analiza el metabolismo de flucitosina en cepas de *Candida* spp. con diferentes susceptibilidades al fármaco mediante la RMN de ^{19}F , que a pesar de mostrar ciertas desventajas (como la baja sensibilidad), es una metodología no invasiva para el análisis directo de muestras biológicas, lo que unido a su aplicación cuantitativa ha sido muy útil para el seguimiento metabólico de este fármaco. Además, el núcleo de ^{19}F es una parte inherente al fármaco y sus metabolitos, y por tanto no requiere un mareaje previo del antifúngico. El análisis de las muestras por RMN de ^{19}F permitió la identificación y cuantificación de diferentes metabolitos fluorados (nucleótidos de F, nucleósidos de F y 5-fluorouracilo) cuyas concentraciones varían en función de la susceptibilidad o resistencia al fármaco (la concentración de metabolitos fluorados era mayor en la cepa susceptible a flucitosina). De modo que, la metodología de la RMN de ^{19}F aplicada al estudio cualitativo en el metabolismo de la flucitosina, podría constituir un método para el estudio de la sensibilidad de varias cepas o microorganismos al fármaco.

Bacterias

La espectroscopia de RMN es útil para identificación y cuantificación bacteriana y para estudios de rutas metabólicas de las mismas.

Se han realizado numerosas investigaciones para el diagnóstico de bacterias causantes de infecciones en el tracto urinario (ITU). Algunos se centran en el uso de la espectroscopia de RMN de ^1H para la identificación y cuantificación de uropatógenos comunes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* en muestras de orina. Las investigaciones se basan en propiedades específicas del metabolismo de la bacteria en estudio.

La determinación cuantitativa y cualitativa de *P. aeruginosa* mediante el uso de RMN se basa en la propiedad específica de la bacteria de metabolizar ácido nicotínico (NA) a ácido 6-hidroxinicotínico (6-OHNA). Sólo esta bacteria es capaz de producir esta reacción. La adición de NA a las muestras de orina, tras incubación y posterior análisis por espectroscopia de RMN de ^1H , demostró que las señales de NA desaparecían del medio tras un tiempo de incubación, mientras que la aparición de nuevas señales correspondientes al metabolito 6-OHNA indicaban la presencia de *P. aeruginosa*. A medida que aumentaba la intensidad de las señales del metabolito, junto con la disminución en las señales de NA, aumentaba proporcionalmente en el número de bacterias. Esto demuestra la posibilidad que ofrece esta técnica para la identificación cuantitativa y cualitativa, simultáneamente, de la bacteria.

Algo similar ocurre en la determinación de *K. pneumoniae*. En este caso, la reacción metabólica específica es la transformación de glicerol en 1,3-propanodiol, de modo que la sustancia que se añadió al medio fue el glicerol. A pesar de que *Citrobacter freundii* es también capaz de llevar a cabo esta reacción, ambas bacterias son fácilmente diferenciadas por examen microscópico observando su motilidad. *K. pneumoniae* no es móvil mientras que *C. freundii* sí. Además, *C. freundii* no es un agente nosocomial común en infecciones del tracto urinario. La combinación de ambos métodos mostró una muy buena sensibilidad y especificidad (90% y 100%, respectivamente) sugiriendo la potencial utilidad de la RMN para el diagnóstico bacteriano.

El mismo experimento en *E. coli* y *P. mirabilis* reveló que los metabolitos específicos para estas bacterias son el lactato y el ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butírico (MOBA) tras la incubación con lactosa y metionina, respectivamente.

Los resultados obtenidos con el uso de esta técnica alternativa proporcionan la justificación para el desarrollo de este método en la identificación y la cuantificación bacteriana, así como de otros microorganismos. Con experiencia, el análisis espectral y la interpretación de datos pueden hacerse de forma rápida y fiable.

Los estudios metabólicos realizados *in vivo* por espectroscopia de RMN, muestran cierta limitación en la eficacia por el bajo número de metabolitos en concentración suficiente para ser observados. Si a este hecho, se le suma la baja sensibilidad que presenta la RMN utilizando los núcleos de ^{13}C o de ^2H , la eficacia mediante este tipo de RMN se ve empeorada. A pesar de que la constante giromagnética del núcleo de ^2H es menor que en el de ^{13}C , presenta ciertas ventajas en lo referente a la eficiencia de las adquisiciones gracias a los cortos tiempos de relajación del

núcleo de ^2H . Además, la sensibilidad de la RMN de ^2H se puede reforzar añadiendo deuterones a sitios específicos. Las investigaciones de rutas metabólicas utilizando estos tipos de RMN se realizan previo mareaje selectivo de los sustratos a estudio, lo cual supone una pequeña desventaja en el método. La pérdida, por ejemplo, de un deuterón en la RMN de ^2H , supone un gran problema ya que muchos de los metabolitos serían inobservables. Aún así, las moléculas marcadas son seguidas con facilidad a lo largo de los procesos metabólicos. En el caso de RMN de ^{13}C , el origen de los átomos de carbono en los productos finales puede ser fácilmente identificado. Estos experimentos de RMN parecen ser los más apropiados para estudios de este tipo debido a su poder analítico, a que el mareaje suministrado a los productos puede ser fácilmente monitorizado de manera no invasiva, a sus características no destructivas y al gran número de compuestos que pueden ser analizados simultáneamente.

La RMN de ^{13}C se ha aplicado en estudios llevados a cabo con *Lactococcus lactis* en los que se demuestran interrelaciones existentes entre el metabolismo del citrato y el de la glucosa así como en investigaciones centradas en la utilización de glucosa en una cepa de *L. lactis* deficiente en el enzima LDH. Otro ejemplo lo constituye el estudio de las capacidades catabólicas de *Helicobacter pylori*. En él, la RMN de ^{13}C permite observar, tanto el metabolismo de la glucosa como el del piruvato, reflejando las adaptaciones fisiológicas sufridas por la bacteria en las condiciones de crecimiento empleadas³⁴. El uso de esta RMN de ^{13}C se ha extendido también al estudio del metabolismo de fármacos. Esta técnica se ha utilizado para observar el seguimiento intracelular de β -lactámicos y determinar la cinética de las reacciones que sufren éstos.

Estudios con espectroscopia de RMN de ^2H se han llevado a cabo para demostrar su aplicación en la monitorización de rutas metabólicas complejas, como el metabolismo anaerobio, de distintas bacterias. La identificación de productos por este método podría constituir un método potencial para la caracterización de bacterias patógenas a pesar de las limitaciones con las que cuenta.

Uno de ellos investiga una enfermedad bacteriana denominada síndrome de marchitamiento de la oreja de mar o abulón, *Halitotis* spp (un molusco), importante en la acuicultura, causada por un patógeno de la familia Rickettsiaceae: "*Candidatus Xenohalitotis californiensis*" que infecta las células epiteliales digestivas del animal. Se trata de la primera aplicación de la espectroscopia de RMN basada en el estudio de perfiles metabólicos en una especie del medio acuático.

La RMN de ^1H basada en la metabonomía permitió realizar con éxito una clasificación de los animales (sanos, con retraso en el crecimiento y enfermos) mediante los cambios metabólicos asociados a la progresión de la enfermedad a partir de muestras de biofluidos y de extractos tisulares del molusco. Los espectros obtenidos, medidos a 500,11 MHz, mostraron diferencias metabólicas permitiendo identificar los metabolitos más representativos involucrados en el proceso de la enfermedad así como los cambios porcentuales de éstos. Estos resultados permitieron identificar biomarcadores metabólicos característicos del síndrome. Éstos no sólo proporcionan información sobre la enfermedad, sino que podrían utilizarse para posteriores estudios que evalúen rápidamente la situación sanitaria del abulón así como la eficacia de los antibióticos necesarios para su tratamiento. Basándose en esto, los mismos autores en años posteriores llevaron a cabo estudios con los mismos organismos para observar los efectos del antibiótico oxitetraciclina en los perfiles metabólicos mediante RMN de ^1H . Éste fármaco, usado para tratar infecciones bacterianas en especies acuáticas, reduce la intensidad y la mortalidad del síndrome de marchitamiento. El objetivo por tanto de esta investigación fue observar si la recuperación del metabolismo durante el tratamiento con oxitetraciclina coincidía con la desaparición de la enfermedad causada por la rickettsia.

Para ello, se examinaron los constituyentes metabólicos presentes en el músculo del pie del molusco tras tratamiento con oxitetraciclina durante unos determinados días a diferentes temperaturas del agua marina (13.4°C y 17.3°C). Se observaron cambios metabólicos a las dos temperaturas: elevación de los niveles de taurina, homarina y glicina-betaína, así como disminución de los aminoácidos y los hidratos de carbono. La detección de diferencias metabólicas entre los animales tratados y los no tratados con antibiótico se observaron sólo a la temperatura más alta. De modo que, la oxitetraciclina erradica la enfermedad y a su vez reduce el descenso metabólico relativo al síndrome a la temperatura más elevada. Las conclusiones obtenidas de los experimentos sugieren del desarrollo de la RMN basada en estudios metabólicos y su complementariedad con otras técnicas, como la histología, para la identificación de procesos patológicos en especies acuáticas así como para la optimización de tratamientos farmacológicos. Esta herramienta muestra un alto rendimiento ya que analiza rápidamente y con pocos costes el estado funcional de un organismo.

El uso de una RMN Multidimensional de Alta Resolución con Rotación en Ángulo Mágico (HRMAS NMR: Multidimensional High Resolution Magic Angle Spinning NMR) ha permitido también realizar estudios de monitorización del metabolismo de fármacos así como la búsqueda de dianas para el desarrollo de nuevos tratamientos antibacterianos.

La técnica de RMN de HRMAS consiste en una hibridación entre la RMN en disolución y la RMN de estado sólido que permite la obtención de espectros de alta resolución de muestras heterogéneas que no son ni sólidos ni líquidos puros. Esta RMN permite realizar estudios *in vivo* con bacterias de una manera no destructiva de modo que se facilite el estudio de la pared celular bacteriana. Las enzimas implicadas en la biosíntesis de los componentes estructurales, juegan un papel muy importante en la determinación de dianas para el desarrollo de nuevos fármacos. Además, la pared celular bacteriana es crítica en el desarrollo de resistencias a los antimicrobianos empleados.

Por ejemplo, en bacterias vivas (micobacterias) se estudió la diferente composición relativa en la estructura de la pared bacteriana con el objetivo de demostrar las dianas en las que actúa el etambutol, observar las diferencias en

la composición entre especies y observar los efectos de mutaciones en la pared celular de estas bacterias. El análisis estructural de la pared celular se realizaba de forma destructiva mediante degradación por aislamiento y fragmentación de los componentes de la pared celular por separado. El estudio se basó en la determinación de los componentes mayoritarios de la pared mediante RMN de HRMAS en 2D y 3D de células intactas de *Mycobacterium smegmatis* no tratadas, de bacterias tratadas con etambutol, de células con mutación embB y en la observación de diferencias en la composición estructural de la pared entre las especies *M. smegmatis* y *M. bovis*. Las estructuras más abundantes encontradas, correspondientes a las señales del espectro, fueron arabinogalactano y lipoarabinomano. Centrándonos en el efecto del antituberculoso etambutol mediante esta técnica, se observa que la reducción o ausencia del pico en el espectro se relaciona con la inhibición de la ruta biosintética de la arabinosa. Se sabe que el etambutol actúa inhibiendo las arabinosiltransferasas EmbA-C de la micobacteria, y en particular a la EmbB, enzimas encargadas de la biosíntesis de la pared celular. Los estudios mediante la espectroscopia de RMN revelaron que, al comparar las bacterias *M. smegmatis* tratadas con el antituberculoso frente a las micobacterias control, se producía la inhibición de las arabinosiltransferasas EmbA-C (reducción drástica de las señales de arabinosa) tras tratamiento con etambutol. Un análisis espectroscópico en *M. smegmatis* con una mutación embB *knockout* validó este efecto inhibitorio. El tratamiento con etambutol reduce el contenido de arabinano de la pared celular por inhibición de las citadas enzimas.

Por tanto, lo más relevante de este estudio fue la comprobar la posibilidad que ofrecía esta técnica para observar los efectos inhibitorios del fármaco en estudio en la estructura de la pared celular y su correspondiente validación con la micobacteria mutada. La habilidad que presenta la RMN de HRMAS para observar estos efectos es muy significativa ya que permite la observación directa de cambios estructurales en la pared bacteriana debidos a la exposición farmacológica o a la mutación y podría servir para el desarrollo de nuevos fármacos que tengan efecto inhibitorio a nivel de la pared celular así como estudios de resistencia de antimicrobianos.

Otra aplicación potencial mediante este tipo de RMN es la monitorización del metabolismo *in vivo* de etionamida.

La etionamida (ETH) es un profármaco que necesita activarse dentro de la micobacteria para lograr su eficacia. El uso de la RMN de HRMAS de ^1H , con un campo magnético relativamente bajo (300 MHz), se usó para investigar el proceso de activación del profármaco ETH a través de la proteína EthA en micobacterias vivas. Esta técnica permitió detectar y localizar el metabolito mayoritario del fármaco (ETH*) en el interior de las bacterias vivas. Este hecho no ha podido ser demostrado por estudios anteriores *in vitro*. La selección de una cepa de la bacteria que sobreproduce la enzima EthA demostró que la presencia del metabolito dependía de la presencia de ETH.

Los resultados mostrados mediante esta herramienta espectroscópica no invasiva, el uso de un precursor no marcado y la baja frecuencia del espectrómetro, sugieren la posibilidad de esta técnica para estudios de seguimiento metabólico de fármacos *in vivo* así como para análisis estructural.

Experimentos sobre Escherichia coli

Con estos precedentes se decidió abordar un estudio preliminar de susceptibilidad a un antimicrobiano (Gentamicina) mediante RMN de ^1H . Para ello se utilizaron réplicas de cultivos procedentes de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) de *Escherichia coli* ATCC 25922 cultivadas en leche. Se realizó un primer reaislamiento para comprobar la viabilidad bacteriana y posteriormente otro para asegurar el cultivo puro. Por triplicado, se prepararon en leche 0,5 de Me Farland y dos de ellas se incubaron en presencia de 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina. De cada muestra se tomaron 10 μL para posterior recuento en placa. Del resto, se tomó un 1 mL de cada tubo y se centrifugaron durante 3 min a 9500 g. Del sobrenadante, 450 μL se transfirieron a tubos de 5 mm de RMN y se adicionó 50 μL de D_2O (agua deuterada) con TSP (2,2'-3,3'-tetra deuterio-trimetil-silil-propionato sódico) como referencia interna en concentración de 1,125 mM.

El equipo empleado para la adquisición de los espectros fue un espectrómetro Bruker Avance 400, equipado con una sonda BBI H-BB Z-GRD, específica para una adecuada adquisición de protón. La adquisición del espectro fue llevada a cabo con el programa TOPSPIN (versión 2.1). El procesado de los espectros se llevó a cabo mediante el programa MestReNova (versión 6.0.3). Para la obtención de los espectros se ajustó el campo para la mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ y se realizaron todos los experimentos a 25°C. Los espectros de RMN de ^1H fueron registrados con una secuencia de pulsos de pre saturación de la señal de agua situada a 1875 Hz usando el programa de pulsos zgpr y con un tiempo total de adquisición de 13 minutos.

En la figura 2 se analizan los espectros adquiridos. En el espectro A se observan los metabolitos correspondientes al medio de cultivo. En el experimento B, se muestra la evolución metabólica causada por el efecto de las bacterias. Fundamentalmente, se observa la aparición de los ácidos succínico, acético y láctico así como de etanol. El espectro C, realizado sobre el cultivo con bacterias y fármaco en concentración sub inhibitoria (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) muestra un mínimo cambio metabólico (descenso de la relación de ácido láctico frente al etanol). Sin embargo, cuando la concentración de gentamicina presente en el cultivo es mayor (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se observa una inhibición total del crecimiento bacteriano reflejado en la ausencia de los metabolitos producidos por las bacterias.

ES 2 373 836 A1

REIVINDICACIONES

5 1. Método para evaluar la susceptibilidad de una población microbiana ante fármacos mediante resonancia magnética nuclear (RMN), **caracterizado** por que comprende:

a) preparar una muestra del medio de cultivo apta para ser analizada por RMN,

b) preparar una muestra apta para ser analizada por RMN de la población microbiana,

10 c) añadir el fármaco antimicrobiano a una muestra igual que la de la etapa b), y

d) analizar y/o cuantificar por RMN el resultado obtenido de las etapas anteriores utilizando unos controles adecuados.

15 2. Método según la reivindicación 1, en el que dichos controles de la etapa d) comprenden:

- obtener el espectro RMN E0 del medio de cultivo,

20 - obtener el espectro RMN E1 de la población microbiana,

- obtener el espectro RMN E2 de dicha población microbiana una vez añadido el fármaco antimicrobiano a distintos tiempos,

25 - comparar los espectros E0, E1 y E2, para identificar ausencia o reducción de picos entre ellos,

- determinar, mediante el cálculo de M2, punto final metabólico del espectro RMN E2, la presencia de metabolitos asociados con el grado de efectividad del fármaco antimicrobiano,

30 - comparar dicho punto final metabólico, M2, con las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas de otros métodos.

35

40

45

50

55

60

65

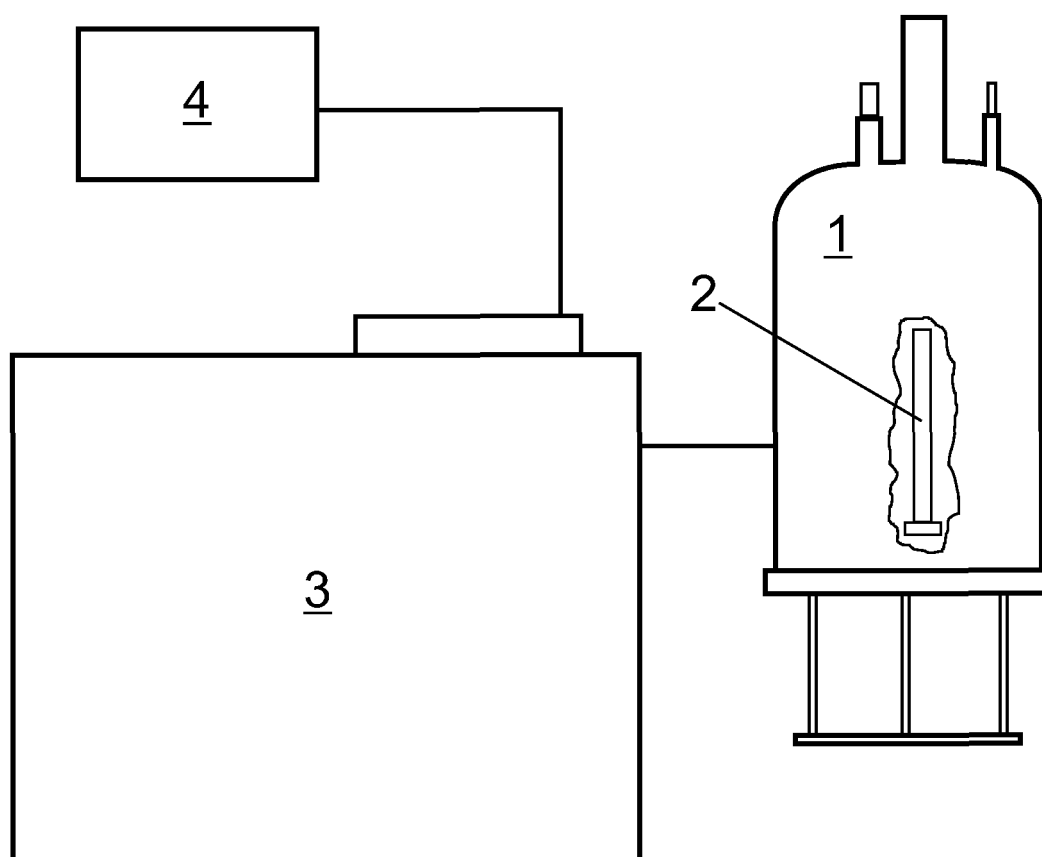


FIG. 1

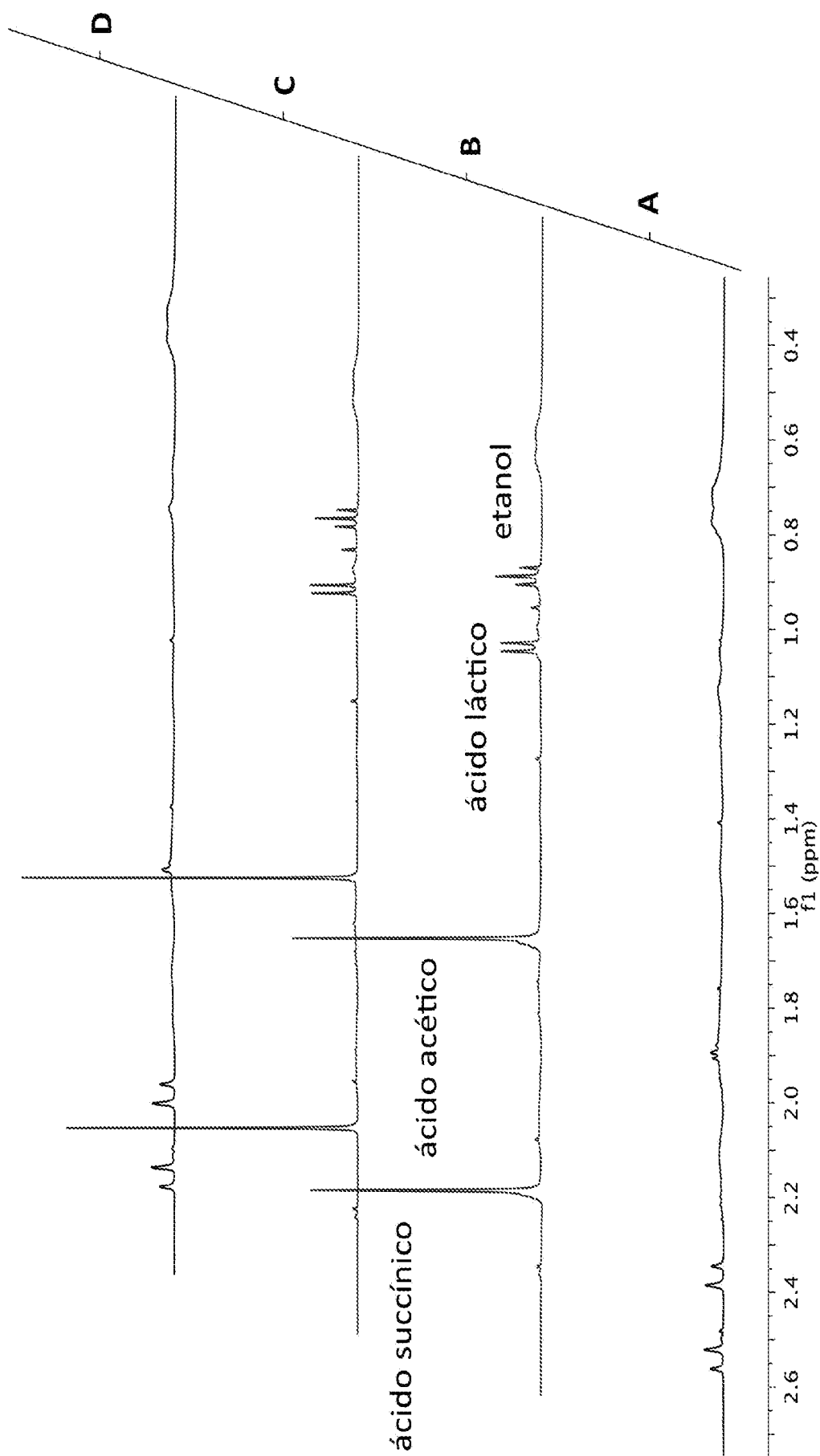


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201030724

②² Fecha de presentación de la solicitud: 17.05.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/04** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PLUMMER, R., BODKIN, J., POWER, D., et al. Effect of caspofungin on metabolite profiles of Aspergillus species determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nov 2007. Vol 51, Nº 11, páginas 4077-4084. ISSN0066-4804.	1,2
X	COEN, M., BODKIN, J., POWER, D., et al. Antifungal effects on metabolite profiles of medically important yeast species measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Dic 2006, Vol 50, Nº 12, páginas 4018-4026, ISSN0066-4804.	1,2
A	LEE, R., LI, W., CHATTERJEE, D., et al. Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D HR-MAS NMR: structural changes in the arabinan due to ethambutol Treatment and gene mutation are observed. Glycobiology, 2004. Páginas 1-13.	1,2

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
27.01.2012

Examinador
A. Barrios de la Fuente

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT, MEDLINE, NPL, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.01.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1,2	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1,2	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PLUMMER, R., BODKIN, J., POWER, D., et al. Effect of caspofungin on metabolite profiles of <i>Aspergillus</i> species determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> , Nov 2007. Vol 51, Nº 11, páginas 4077-4084. ISSN0066-4804.	Nov-2007
D02	COEN, M., BODKIN, J., POWER, D., et al. Antifungal effects on metabolite profiles of medically important yeast species measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy, <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> , Dic 2006, Vol 50, Nº 12, páginas 4018-4026, ISSN0066-4804.	Dic-2006
D03	LEE, R., LI, W., CHATTERJEE, D., et al. Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D HR-MAS NMR: structural changes in the arabinan due to ethambutol Treatment and gene mutation are observed. <i>Glycobiology</i> , 2004. Páginas 1-13	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud tiene por objeto un método para evaluar la susceptibilidad de una población microbiana ante fármacos mediante resonancia magnética nuclear (RMN) que comprende; preparar una muestra del medio de cultivo, otra muestra con la población microbiana y otra muestra que comprende la población microbiana sobre la que se añade un fármaco antimicrobiano, y analizar posteriormente los resultados obtenidos por resonancia magnética nuclear utilizando una serie de controles (Reivindicación 1). Dichos controles comprenden; obtener un espectro de RMN E0 del medio de cultivo, un espectro RMN E1 de la población microbiana y un espectro RMN E2 de dicha población microbiana una vez añadido el fármaco antimicrobiano, comparar dichos espectros para identificar la ausencia o reducción de picos entre ellos, determinar mediante el cálculo del punto final metabólico del espectro RMN E2 (M2) la presencia de metabolitos asociados al grado de efectividad del fármaco antimicrobiano y por último, comparar el punto final metabólico M2 con las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas de otros métodos.

El documento D01 y D02 tienen por objeto un estudio en el que se evalúa mediante RMN la susceptibilidad de diferentes poblaciones microbianas a distintos fármacos.

El documento D03 divulga un estudio en el que se analiza mediante RMN la estructura de la pared bacteriana en micobacterias vivas. Este estudio se lleva a cabo bajo distintas condiciones, como por ejemplo el tratamiento con etambutol, fármaco que inhibe las arabinosil transferasas, enzimas implicadas en la formación de la pared celular. Para analizar el efecto del etambutol, se comparan los espectros obtenido de una muestra que comprende la población bacteriana frente a otra en la que las micobacterias han sido tratadas con etambutol, y se observa una reducción significativa de las señales de arabinosa en el espectro de bacterias tratadas con etambutol. (ver páginas 9-10, figura 7)

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6 y 8 de la Ley 11/86)

El documento D01 tiene por objeto un método para evaluar mediante RMN la susceptibilidad de distintas poblaciones microbianas constituidas por diferentes especies de *Aspergillus* a dos fármacos distintos, Anfotericina B y caspofungina. Para llevar a cabo este método se preparan muestras de medio de cultivo, otras muestras que comprende la población microbiana y otras muestras que comprenden la población microbiana sobre las que se añaden distintas concentraciones de los fármacos a estudiar. Posteriormente, se analizan por RMN cada una de las muestras y se comparan los espectros obtenidos para identificar la ausencia o reducción de picos entre ellos (ver figuras 2 y 3). Se calculan los puntos finales metabólicos o MEPs (Ver páginas 4078-4082, figuras 2 y 3), que se definen como una reducción mayor o igual al 50 % en el consumo de nutrientes (en este caso glucosa) o en la producción de metabolitos (como por ejemplo, fumarato). Adicionalmente se comparan los valores de lo MEPs con los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidos por otros métodos (ver página 4082, tabla 3).

El método objeto de las reivindicaciones 1 y 2, por tanto, estaría ya anticipado en D01.

El documento D02 divulga un método para evaluar mediante RMN la susceptibilidad de distintas poblaciones antimicrobianas constituidas por distintas especies de *Candida* a 3 fármacos distintos; Anfotericina B, caspofungina, y voriconazol. Para evaluar el efecto de cada uno de los fármacos, se prepara; una muestra de caldo de cultivo, otra muestra que comprende la población microbiana y otras muestras que comprenden la población microbiana sobre las que se añaden distintas concentraciones de los fármacos. Posteriormente se analizan por RMN cada una de las muestras y se comparan los espectros obtenidos para identificar la ausencia o reducción de picos entre ellos (ver figura 2). Se calculan los puntos finales metabólicos o MEPs (Ver figura 3 y tabla 2), que se definen como una reducción mayor o igual al 50 % en el consumo de nutrientes (en este caso glucosa) o en la producción de metabolitos (por ejemplo, etanol). Adicionalmente se comparan los valores de los MEPs con los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidos por otros métodos (ver tabla 2).

El método objeto de las reivindicaciones 1 y 2, por tanto, estaría ya anticipado en D02.

En conclusión, sobre la base de lo divulgado en D01 y D02, el método objeto de las reivindicaciones 1 y 2 no es nuevo y por consiguiente, tampoco implica actividad inventiva en el sentido de los artículos 6 y 8 de la ley de patentes 11/86.