

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 800**

51 Int. Cl.:
C07K 1/13 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05805806 .6**
96 Fecha de presentación: **09.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1786828**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2007**

54 Título: **Nuevos sustratos enzimáticos derivados de fenoxazinona y su utilización como revelador en la detección de microorganismos con actividad peptidasa**

30 Prioridad:
10.09.2004 FR 0409593

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2012

73 Titular/es:
**BIOMERIEUX
CHEMIN DE L'ORME
69280 MARCY-L'ETOILE, FR**

72 Inventor/es:
**ANDERSON, Rosaleen Joy;
GROUNDWATER, Paul William;
JAMES, Arthur;
MONGET, Daniel y
ZAYTSEV, Andrey Victorovich**

74 Agente/Representante:
García-Cabrerizo y del Santo, Pedro

ES 2 380 800 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

Nuevos sustratos enzimáticos derivados de fenoxazinona y su utilización como revelador en la detección de microorganismos con actividad peptidasa.

5 La presente invención se refiere a nuevos sustratos enzimáticos cromógenos para la detección de actividad peptidasa. Estos sustratos son utilizables en las aplicaciones que comprenden una etapa de hidrólisis enzimática que produce una señal físico-química, particularmente en microbiología, bioquímica, inmunología, biología molecular, histología, etc. Comparativamente a los sustratos existentes, la mayor parte únicamente fluorógenos, los sustratos cromógenos de la invención pueden utilizarse particularmente en medio gelificado para la detección de microorganismos, ya que producen una coloración que no se difunde en el medio de reacción, por lo tanto, concentrada a nivel de las colonias.

10 La invención también se refiere a medios de reacción que contienen dichos sustratos, a la utilización de los sustratos o de los medios para la detección de bacterias Gram negativas, Gram positivas y de levaduras que expresan una actividad peptidasa, y a procedimientos de utilización.

15 Se denomina en general aminopeptidasa a una enzima capaz de escindir mediante hidrólisis el grupo amida formado entre un acilo de aminoácido y una amina primaria, y se denomina peptidasa a una enzima capaz de escindir mediante hidrólisis el grupo amida formado entre el resto acilo de un péptido y una amina primaria. En la presente solicitud, el término "peptidasa" puede designar, según los casos, tanto una peptidasa como una aminopeptidasa, tal como se han definido anteriormente.

20 Los sustratos cromógenos enzimáticos para la detección de actividad peptidasa que no se difunden se describen y ya se conocen en el estado de la técnica. De este modo, dichos sustratos son abarcados por las solicitudes de patente WO98/04735 y WO99/38995 depositadas por la Solicitante. Sin embargo, estos sustratos presentan diferentes inconvenientes: su síntesis es difícil, la pureza es reducida y los rendimientos escasos. Además, para una utilización en medios de cultivo, es preciso definir una composición del medio muy precisa para observar un color.

25 Los únicos sustratos existentes que pueden utilizarse en medios sólidos para la detección de microorganismos en cultivos mixtos son sustratos derivados de acridina y se describen en la solicitud de patente PCT WO2004/069804 depositada por la Solicitante.

Se conocen moléculas derivadas de fenoxazinona por su capacidad para producir fluorescencia. Éstas pueden utilizarse:

- 30 - como indicadores ácido-básicos, como se describe por ejemplo en el documento Stuzka, V. et al., 1963, Collection Czech. Chem. Commun., 28, 1399-1407 o bien
- 35 - como marcadores fluorescentes, por ejemplo para seguir modificaciones de conformaciones de proteínas, como se describe en el documento J. et al., 2001, Analytical Chemistry, 73(13), 2920-2928, o bien por ejemplo para la detección de microorganismos, como se describe en la patente US5.336.600. En este último caso, los compuestos descritos tienen como inconvenientes que solamente pueden utilizarse en medios líquidos y que la detección de los microorganismos, que se realiza mediante la demostración de un crecimiento bacteriano, se realiza mediante modificación del potencial de óxido-reducción (redox). Por lo tanto, no hay ninguna especificidad con respecto a una actividad enzimática ni con respecto a un género o una especie bacteriana.

Ningún derivado de aminofenoxazinona descrito actualmente, y en particular ningún derivado de resorufamina, se ha utilizado nunca como sustrato cromógeno enzimático utilizable en medio gelificado.

40 El documento DE10251894 describe compuestos y su utilización como sustratos enzimáticos cromógenos para la detección de actividad peptidasa. Los documentos US6235493, WO0142491 y Agban A et al (1990), *Annales Pharmaceutiques Françaises*, vol. 48, no. 6, págs. 326-334 describen ensayos de detección de la actividad peptidasa de microorganismos. El documento WO2004101536 describe derivados de fenoxazinona y su aplicación para la detección de la actividad peptidasa de microorganismos.

45 Resumen de la invención: La invención, en su sentido más amplio, es tal como se define mediante las reivindicaciones.

50 De acuerdo con la presente invención, se proponen nuevos sustratos cromógenos enzimáticos para la detección de microorganismos que expresan una actividad peptidasa. La invención también se refiere a medios de reacción que contienen dichos sustratos, así como a la utilización de los sustratos o de los medios para la detección de actividades peptidasas, y a procedimientos de utilización.

En efecto, la Solicitante ha descubierto de manera sorprendente que era posible detectar microorganismos que expresan una actividad peptidasa mediante la utilización de nuevos derivados de fenoxazinona cromógenos que producen una coloración que no se difunde en el medio de reacción, por lo tanto concentrada a nivel de las colonias,

quedando demostrada la actividad peptidasa mediante una modificación de la coloración de las colonias en el medio de cultivo.

Después de la siembra de los medios de reacción que contienen los sustratos de la invención con los microorganismos a ensayar, se observan colonias de incoloras a blancas cuando éstas no son capaces de hidrolizar el sustrato. Por el contrario, se observan colonias coloreadas cuando son capaces de hidrolizar el sustrato de la invención.

Los derivados de fenoxazinona de la invención son a la vez cromógenos y fluorógenos y tienen como ventaja una buena sensibilidad de detección. Además, la excitación y la emisión de fluorescencia se realizan en el espectro visible, de modo que la fluorescencia puede detectarse a simple vista y con iluminación normal.

De acuerdo con la invención, se entiende particularmente por arilo un anillo aromático de C₆-C₁₂, particularmente fenilo, bencilo, 1-naftilo o 2-naftilo. Lo mismo se aplica para la parte arilo de los grupos aralquilo. De este modo, el grupo alquilo del grupo aralquilo de C₆-C₁₄ es de C₂-C₈.

Se entiende por alquilo de C_x-C_y, un alquilo lineal o ramificado que tiene de x a y átomos de carbono, en el presente caso de 1 a 12 átomos de carbono, de 1 a 6 átomos de carbono, o de 1 a 3 átomos de carbono o de 2 a 8 átomos de carbono. Como ejemplo, pueden mencionarse metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo y dodecilo.

Por átomo de halógeno, se entiende cloro, bromo, yodo y flúor.

Por heteroátomo, se entiende un átomo diferente de un átomo de carbono, tal como por ejemplo O, N o S.

Los anillos heterocíclicos que pueden formar R'' y R''' pueden ser de cualquier tamaño, pero preferentemente contienen de 5 a 7 miembros.

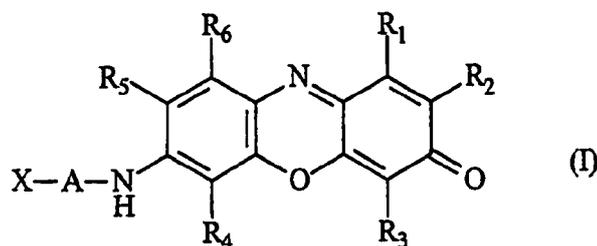
Los ejemplos de anillo heterocíclico comprenden el anillo de morfolina, piperazina, piperidina, pirrolidina e imidazolidina.

Los agentes de bloqueo de acuerdo con la invención comprenden cualquier agente de bloqueo conocido por el experto en la materia que es capaz de proteger a las aminas. Como ejemplo, pueden mencionarse t-butoxicarbonilo (N-tBOC), 9-fluoreniloxycarbonilo, un agente de solubilización tal como succinilo, o bien un aminoácido no metabolizable, es decir no natural, tal como el ácido pipecólico.

Los agentes de bloqueo no están sistemáticamente presentes en los compuestos de la invención. En este caso, es decir cuando los compuestos de la invención no poseen ningún agente de bloqueo (X es nada), los compuestos de la invención están en forma de sal, tal como cloruro, bromuro o trifluoroacetato.

Los aminoácidos que se representan mediante A en la fórmula (I), son cualquier aminoácido conocido por el experto en la materia.

La presente invención se refiere a sustratos enzimáticos cromógenos de fórmula (I):



en la que

- 35 - R₁ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de C₁-C₁₂, un grupo aralquilo de C₆-C₁₄, un grupo arilo, -COOH, -COOR' o -NR''R''',
- R₂ representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo de C₁-C₁₂, -COOH o -COOR', entendiéndose que al menos uno de entre R₁ y R₂ es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno,
- R₃ representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, -CN, -CONH₂, -COOR' o -COR',
- 40 - R₄, R₅ y R₆, cada uno independientemente, representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁-C₃, entendiéndose que al menos uno de entre R₄, R₅ y R₆ es un átomo de hidrógeno,

- R' representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁-C₆,
- R'' y R''' representan, cada uno independientemente, un grupo alquilo de C₁-C₆, o bien R'' y R''', junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico que contiene uno o más heteroátomos,
- A representa al menos un aminoácido y

5 - X representa un agente de bloqueo o nada.

De acuerdo con una realización de la invención, A representa un aminoácido o un péptido que tiene, como máximo, 10 aminoácidos en el que los aminoácidos son idénticos o diferentes. Preferentemente, por una cuestión de coste del sustrato, A representa un aminoácido o un péptido que tiene, como máximo, 4 aminoácidos en el que los aminoácidos son idénticos o diferentes.

10 Entre los aminoácidos apropiados para los fines de la invención, pueden mencionarse, por ejemplo, α -alanina y β -alanina, leucina, prolina y piroglutamina.

De acuerdo con una realización de la invención, se prefieren los compuestos de la invención para los cuales R₁ representa un grupo alquilo y R₂ representa un átomo de hidrógeno. Más preferentemente, R₁ representa un grupo alquilo de C₁-C₆, o incluso C₃-C₆, prefiriéndose particularmente metilo y pentilo.

15 Los compuestos para los cuales R₁ representa un átomo de hidrógeno y R₂ representa un grupo alquilo de C₁-C₆ constituyen otra realización de la invención. Se prefieren los compuestos para los cuales R₂ representa un grupo etilo o hexilo.

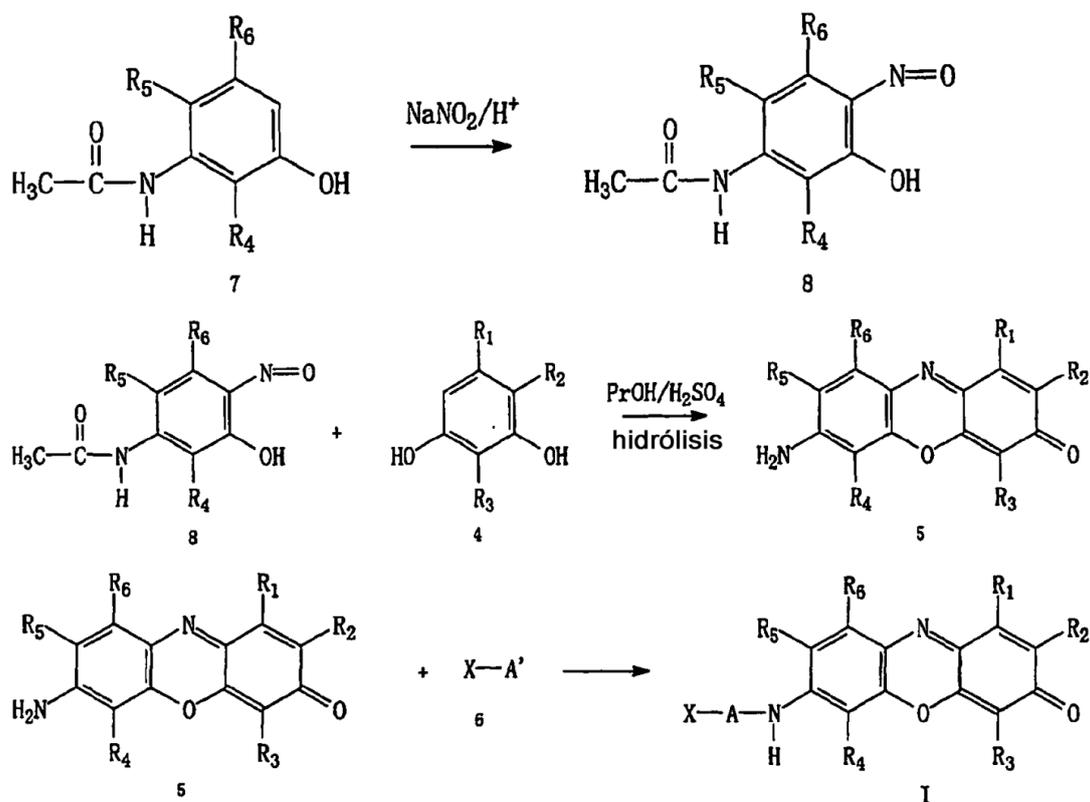
De acuerdo con otra realización más, los compuestos de la invención son tales que R₃, R₄, R₅ y R₆ representan cada uno un átomo de hidrógeno.

20 Los compuestos de la invención pueden prepararse de acuerdo con el modo operatorio representado en el esquema 1 siguiente:

25 De acuerdo con el esquema 1, la dicloroimina (3) apropiada se prepara mediante cloración oxidativa de p-fenilendiamina sustituida de forma apropiada (1) en presencia del compuesto (2) de acuerdo con el protocolo de Willstaetter y Mayer (1904). La dicloroimina (3) obtenida de este modo se condensa a continuación en una solución etanólica con resorcinol sustituido de forma apropiada (4) para dar resorrufamina (5). La resorrufamina (5) se hace reaccionar a continuación con uno o más aminoácidos eventualmente protegidos (6) en un baño enfriado a aproximadamente -12°C, para dar el compuesto de fórmula (I). Debe observarse en este caso que, por supuesto, cuando A es un único aminoácido, A' en el compuesto (6) corresponde a A del compuesto (I), pero comprendiendo un grupo hidroxilo suplementario. En otras palabras, cuando A es un único aminoácido, A' termina en -C(O)OH, mientras que A está unido a NH- mediante -C(O)-, perdiendo -OH. Cuando A es una sucesión de al menos dos aminoácidos, el último aminoácido de A' es tal como se ha descrito anteriormente, es decir que comprende, con respecto al último aminoácido de A, un grupo hidroxilo suplementario.

35 Este procedimiento puede utilizarse para preparar todos los compuestos de la invención. Sin embargo, preferentemente, los compuestos de fórmula (I) para los cuales R₁ o R₂ son un grupo alquilo pueden prepararse de acuerdo con el protocolo descrito en el esquema 2 a continuación.

Esquema 2

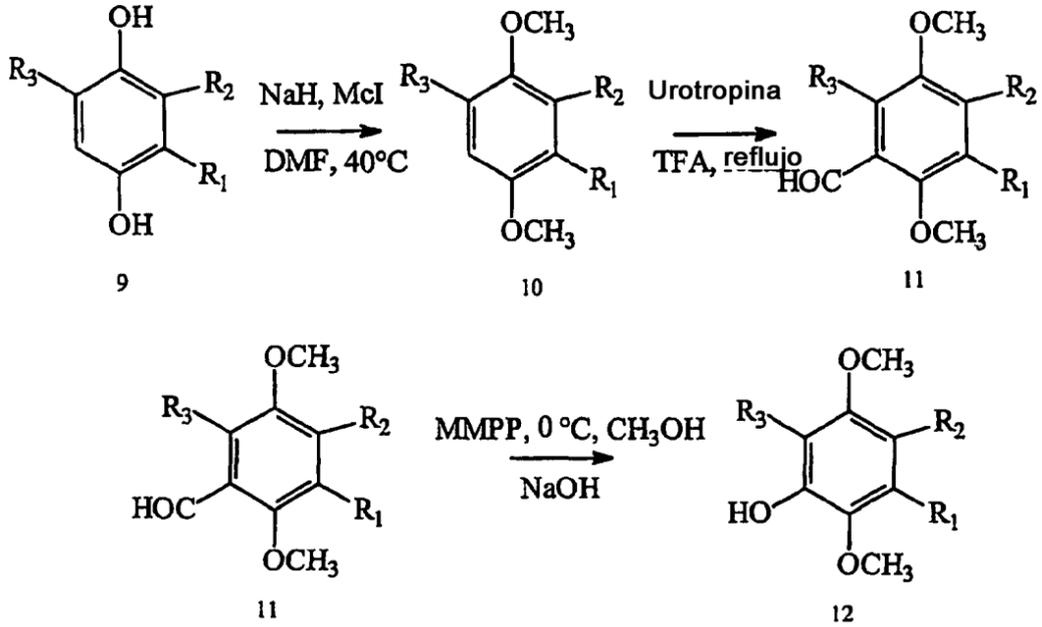


En el esquema 2 anterior, el compuesto nitroso (8) se prepara mediante reacción de un 3-aminofenol sustituido de forma apropiada (7) con un nitrito de metal alcalino, tal como nitrito de sodio, en presencia de ácido fosfórico o de ácido sulfúrico, a una temperatura de 0 a -3°C . El compuesto nitrosoacetamidofenol (8) obtenido de este modo se hace reaccionar a continuación con un resorcinol sustituido de forma apropiada (4) en un disolvente tal como propanol o butanol, en presencia de ácido sulfúrico como catalizador ácido, y un agente de ciclación. La acetamidofenoxazinona obtenida de este modo se desacetila mediante un breve periodo de calentamiento en presencia de ácido sulfúrico a 90°C , operación seguida por un enfriamiento y por una precipitación acuosa. La resorufamina (5) obtenida de este modo se hace reaccionar a continuación con uno o más aminoácidos eventualmente protegidos (6) como se ha indicado en el modo operatorio del esquema 1.

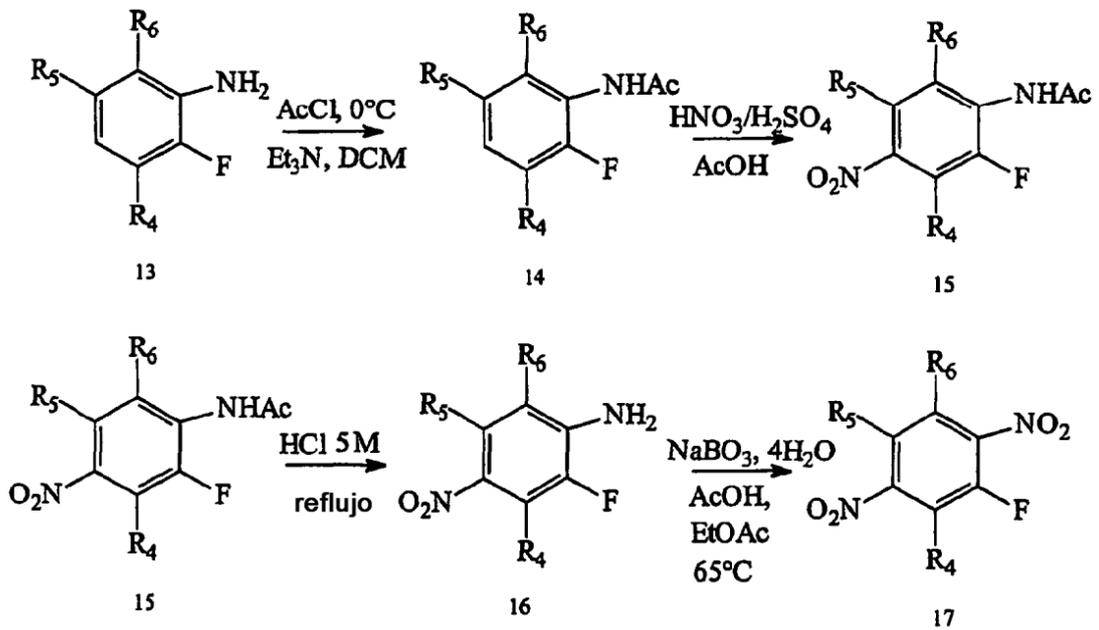
Los compuestos también pueden prepararse de acuerdo con el modo operatorio siguiente, tal como se representa en el esquema 3:

Esquema 3

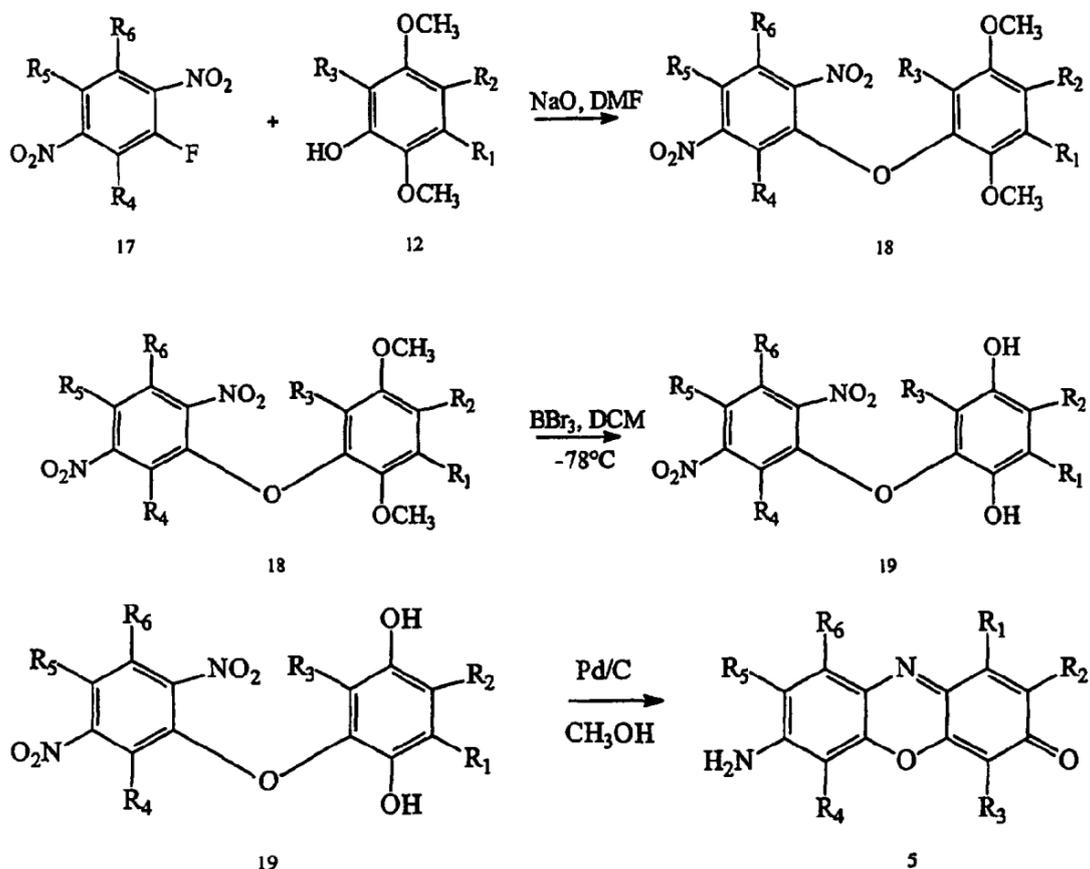
Síntesis de 2,5-dimetoxifenoles sustituidos



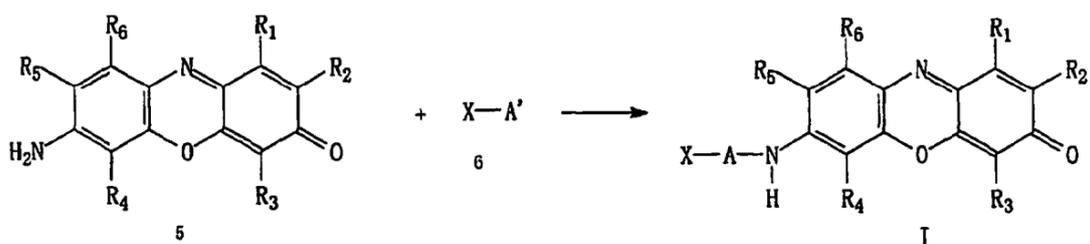
Síntesis de 2,5-dinitrofluorobencenos sustituidos



Síntesis de resorrufamina o 7-aminofenoxazin-3-ona



Acoplamiento de los péptidos



En el esquema 3 anterior, los compuestos de la invención se preparan en 4 etapas.

5 De acuerdo con la primera etapa, el compuesto 2,5-dimetoxifenol sustituido de forma apropiada (12) se prepara a partir de un compuesto hidroquinona (9), también sustituido de forma apropiada. Este compuesto (9) se hace reaccionar en dimetilformamida (DMF) con NaH, y a continuación con yoduro de metilo, reacción seguida por una agitación a 40°C, para dar el compuesto 2,5-dimetoxifenilo sustituido de forma apropiada (10). Este compuesto se hace reaccionar a continuación en trifluoroacetato. (TFA) con urotropina a reflujo de acuerdo con la reacción de Duff (Smith WE, 1972, J Org. Chem., 37: 3972) para dar 2,5-dimetoxibenzaldehído sustituido de forma apropiada (11).
 10 Finalmente, el compuesto (11) se hace reaccionar en metanol con monoperóxido de magnesio a 0°C, y a continuación en DMF con NaOH de acuerdo con la reacción de Bayer-Villiger (Capecchi T., et al., 2000, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2681) para dar 2,5-dimetoxifenol sustituido de forma apropiada (12).

15 De acuerdo con la 2ª etapa, el 2,5-dinitrofluorobenceno (17) se prepara a partir de una fluoroanilina (13) sustituida de forma apropiada. Este compuesto (13) se hace reaccionar a 0°C en la trietilamina y diclorometano (DCM) con cloruro de acetilo para dar N-acetil-fluoroanilina sustituida de forma apropiada (14). Este compuesto se hace reaccionar a continuación con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y de ácido nítrico en ácido acético para dar el compuesto nitroanilina (15) sustituido de forma apropiada. Este compuesto (15) se lleva a reflujo con ácido clorhídrico para dar el compuesto nitroanilina (16) que, a su vez, se hace reaccionar en ácido acético con perborato sódico a 65°C para dar el compuesto (17).

- De acuerdo con la 3ª etapa, la resorrufamina (5) se obtiene mediante reacción del 2,5-dimetoxibenceno (12) obtenido en la 1ª etapa y del 2,5-dinitrofluorobenceno (17) obtenido en la 2ª etapa de la siguiente manera: los compuestos (12) y (17) se hacen reaccionar en DMF con NaH a temperatura ambiente para dar biariléter (18) sustituido de forma apropiada. Este compuesto (18) se hace reaccionar a continuación en DCM con BBr₃ para dar dihidroxibiariléter (19) que, a su vez, se hace reaccionar en presencia del catalizador Pd/C y de metanol para dar resorrufamina (5).
- Finalmente, de acuerdo con la última etapa, la resorrufamina (5) obtenida de este modo se hace reaccionar a continuación con uno o más aminoácidos eventualmente protegidos (6) como se ha indicado en el modo operatorio del esquema 1.
- En los modos operatorios anteriores, los reactivos de partida (compuestos (1), (2), (4), (6), (7), (9) y (13)) están disponibles en el mercado, particularmente de Sigma.
- La invención también se refiere a un medio de reacción que comprende al menos un sustrato cromógeno enzimático de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, en solitario o en combinación con al menos otro sustrato enzimático específico de una actividad enzimática diferente de la actividad peptidasa detectada por el sustrato de acuerdo con la invención.
- En efecto, cuando microorganismos que expresan una actividad peptidasa se siembran en o sobre un medio de reacción que contiene los compuestos de la invención, se produce una coloración que no se difunde en o sobre el medio de reacción, y por lo tanto concentrada a nivel de las colonias.
- Por medio de reacción de acuerdo con la invención, se entiende un medio que permite el desarrollo de al menos una actividad enzimática de al menos un microorganismo.
- Este medio de reacción puede servir únicamente como medio de revelación o como medio de cultivo y de revelación. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos se realiza antes de la siembra y, en el segundo caso, el medio de reacción constituye también el medio de cultivo, lo que constituye una realización particular de la invención.
- El medio de reacción puede ser sólido, semi-sólido o líquido. Por medio sólido, se entiende, por ejemplo, un medio gelificado.
- El agar es el medio sólido tradicional en microbiología para el cultivo de microorganismos, pero es posible utilizar gelatina, agarosa u otro gelificante. Cierta número de preparaciones están disponibles en el mercado, como por ejemplo la gelosa Columbia, la gelosa Trypcase-soja, la gelosa Mac Conkey, la gelosa Sabouraud o de forma más general las descritas en el documento *Handbook of Microbiological Media* (CRC Press).
- Preferentemente, cuando el medio de reacción también es un medio de cultivo, está en forma gelificada.
- La cantidad de agar en el medio de reacción es de 2 a 40 g/l. Para los medios sólidos, la cantidad de agar es preferentemente de 9 a 25 g/l, más preferentemente de 12 a 14 g/l, y para los medios semi-sólidos, la cantidad de agar es preferentemente de 2 a 6 g/l.
- Los sustratos enzimáticos de la invención pueden utilizarse en un amplio intervalo de pH, particularmente entre pH 5,5 y 10.
- La concentración de sustrato enzimático de la invención en el medio de reacción está comprendida entre 0,01 y 1 g/l, preferentemente entre 0,025 y 0,40 g/l y, ventajosamente, es de 0,05 g/l. En efecto, a esta concentración de sustrato, se obtiene un mejor contraste de coloración.
- El medio de reacción puede comprender al menos otro sustrato específico de una actividad enzimática diferente de la actividad peptidasa detectada por el sustrato de acuerdo con la invención. La hidrólisis enzimática del o de los otros sustratos genera una señal detectable, diferente de la señal detectada por el sustrato de la invención, como por ejemplo productos coloreados o fluorescentes diferentes, para permitir la demostración como la detección y/o la identificación y/o la cuantificación de uno o más microorganismos:
- Como otro sustrato específico, pueden mencionarse los sustratos de tipo indoxilo tales como 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glucósido (BIOSYNTH) o 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-β-D-galactósido (BIOSYNTH), o cualquier otro sustrato utilizado en la detección de los microorganismos.
- La concentración del otro sustrato enzimático específico está generalmente comprendida entre 0,01 y 2 g/l. El experto en la materia podrá determinar fácilmente dicha concentración en función del sustrato utilizado.
- El medio de reacción también puede comprender uno o más elementos en combinación, tales como aminoácidos, peptonas, hidratos de carbono, nucleótidos, minerales, vitaminas, antibióticos, tensioactivos, tampones, sales de

fosfato, de amonio, de sodio, de metales. Los ejemplos de medios se describen en las solicitudes de patente de la Solicitante, EP 656 421 y WO99/09 207.

Los sustratos enzimáticos y medios de reacción de la invención son, por lo tanto, útiles en el diagnóstico de microorganismos con actividad peptidasa.

5 De este modo, la presente invención también se refiere a la utilización de un sustrato enzimático cromógeno de fórmula (I), o de un medio de reacción tal como se ha definido anteriormente, para la detección y/o la identificación y/o la cuantificación *in vitro* de microorganismos que expresan al menos una actividad peptidasa.

La invención también se refiere a un procedimiento para la detección y/o la identificación y/o la cuantificación de microorganismos que expresan al menos una actividad peptidasa, caracterizado porque consiste en:

- 10
- disponer de un medio de reacción, tal como se ha definido anteriormente,
 - sembrar el medio con una muestra biológica a ensayar,
 - dejar incubar, y
 - revelar la presencia de al menos una actividad peptidasa en solitario o en combinación con al menos otra actividad enzimática diferente de esta misma actividad peptidasa.

15 Las etapas de siembra y de incubación son muy conocidas por el experto en la materia.

Por ejemplo, la temperatura de incubación está generalmente comprendida entre 20 y 55°C, generalmente entre 25 y 45°C, siendo las temperaturas de 30, 35 y 37°C las temperaturas de incubación utilizadas más frecuentemente. Tratándose de la atmósfera de incubación, ésta es, de forma indiferente, anaerobia o aerobia.

20 La revelación se realiza a simple vista mediante visualización de un cambio de coloración que no se difunde en el medio de reacción, por lo tanto, concentrada a nivel de las colonias.

Como microorganismos que pueden diagnosticarse gracias al sustrato enzimático de la invención, pueden mencionarse las bacterias Gram negativas, Gram positivas y las levaduras.

25 Como bacterias Gram negativas, pueden mencionarse las bacterias de los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Morganella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Branhamella*, *Neisseria*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella* y *Legionella*.

Como bacterias Gram positivas, pueden mencionarse las bacterias de los siguientes géneros: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Mycobacteria* y *Corynebacteria*.

30 Los ejemplos de levaduras comprenden las levaduras de los siguientes géneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*.

Los sustratos de la invención son particularmente apropiados para la detección de las bacterias Gram negativas, ya que se obtiene a la vez un crecimiento de los microorganismos y una coloración neta de las colonias.

En particular, los sustratos cromógenos de la invención, en los que A es L-alanina, tienen la ventaja de que permiten diferenciar claramente las bacterias Gram negativas de las bacterias Gram positivas.

35 De este modo, otro objeto de la invención consiste en un procedimiento para la diferenciación en bacterias de su pertenencia a los gérmenes Gram positivos o a los gérmenes Gram negativos, caracterizado porque consiste en:

- disponer de un medio de reacción, tal como se ha definido anteriormente y en el que el sustituyente A del sustrato cromógeno es L-alanina,
 - sembrar el medio con una muestra biológica a ensayar,
 - dejar incubar, y
 - revelar la presencia de al menos una variación de coloración sinónima de la presencia de un germen o gérmenes Gram negativos.
- 40

Los sustratos cromógenos de la invención en los que A es β -alanina o piroglutamina tienen la ventaja de que permiten distinguir *Pseudomonas aeruginosa* de los otros géneros, y también de las otras especies de *Pseudomonas*.

45

De este modo, otro objeto de la invención consiste en un procedimiento para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*, caracterizado porque consiste en:

- disponer de un medio de reacción, tal como se ha definido anteriormente y en el que el sustituyente A del sustrato cromógeno es β -alanina o piroglutamina,
- 5 • sembrar el medio con una muestra biológica a ensayar,
- dejar incubar, y
- revelar la presencia de al menos una variación de coloración sinónima de la presencia de un germen o gérmenes de *Pseudomonas aeruginosa*.

10 Las muestras biológicas a analizar son cualquier muestra clínica como una extracción de saliva, de sangre, de orina, de heces o cualquier otra muestra cuyo análisis pueda ayudar a un facultativo a realizar un diagnóstico. La muestra también puede ser una muestra de producto obtenido o básico de la industria alimentaria y/o farmacéutica en el que es preciso garantizar la ausencia de microorganismos patógenos, o cuantificar una flora contaminante, o detectar microorganismos específicos.

La invención se entenderá mejor con ayuda de los siguientes ejemplos que se dan a título ilustrativo y no limitante.

15 **Ejemplo 1: Síntesis de 7-N-(*N*'-t-butoxicarbonil-L-alanil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona y de 7-N-(*N*'-t-butoxicarbonil-L-alanil)-amino-1-pentilfenoxazin-3-ona**

Se preparó 1,4-diclorobenzoquinonadiimina mediante cloración de 1,76 g (10 mmoles) de p-fenilendiamina y se disolvió calentando en presencia de metanol anhidro (50 ml) y 9 g de urea añadidos a la solución agitada. A continuación se añadieron 1,8 g (10 mmoles) de 5-pentilresorcinol a la solución a 40-50°C y, después de la disolución completa, la mezcla de reacción se llevó a reflujo con precaución para evitar una exotermia excesiva. El calentamiento prosigue durante 1,5 h, después de las cuales se añadió lentamente la mezcla de reacción enfriada a una mezcla de hielo/agua bien agitada, que contenía amoniaco. El precipitado se recogió mediante filtración por aspiración y se lavó con agua, y a continuación se secó al aire para obtener 2,2 g de producto bruto constituido por una mezcla de los compuestos del título, siendo mayoritario el producto no clorado.

25 Se añadió gota a gota, mientras se agitaba, ácido acético (30%, 200 cm³) de un matraz con 2 bocas, a una solución constituida por aproximadamente 5 g de borohidruro de sodio y 200 mg de hidróxido de sodio disueltos en 200 cm³ de agua. Se hace pasar gas hidrogenado en un matraz de 3 bocas en el que la mezcla de 7-amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona y de 7-amino-1-pentilfenoxazin-3-ona (0,564 g) se disolvió en dimetilformamida anhidra (15 cm³ calentando, y a continuación enfriando) y la solución se diluyó con tetrahidrofurano (THF) anhidro (15 cm³). Un catalizador Pd/C (5%, 200 mg) se añadió a la solución. Se hizo burbujear suavemente hidrógeno gaseoso en la solución y se continuó mucho tiempo después de la reducción aparente (aproximadamente 1 h). La reducción se demostró mediante la sustitución del púrpura de la solución por un color gris-verde. De este modo, se obtuvo una solución de resorufamina.

35 En un matraz diferente, se disolvieron 0,756 g (4,0 mmoles) de *N*-t-Boc-L-alanina y 0,408 g (4,0 mmoles) de N-metilmorfolina en THF anhidro (10 cm³), se enfrió la solución a -20°C y se añadieron 0,56 cm³ (4,0 mmoles) de cloroformiato de isobutilo mientras se agitaba. Se agitó la mezcla a -20°C durante 30 minutos suplementarios, después de lo cual se introdujo a -10°C la mezcla en la solución de resorufamina en agitación, mientras se hacía burbujear hidrógeno gaseoso. Después de 15 minutos, se detuvo la admisión de hidrógeno, se selló el sistema y la mezcla de reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción y se hizo evaporar el disolvente a presión reducida, se disolvió el sólido residual en diclorometano (DCM), se filtró y se lavó la solución de DCM con NaHCO₃ (5%, 2 veces 50 cm³) y agua (50 cm³). Se secó la fase orgánica con MgSO₄, se filtró y se concentró para obtener un residuo constituido por los dos productos del título. Se les purificó mediante cromatografía en columna de sílice, eluyendo con una mezcla de gasolina y de acetato de etilo (7:3). La primera mancha corresponde a 7-N-(*N*'-t-butoxicarbonil-L-alanil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona en forma de sólido naranja y la segunda mancha corresponde a 7-N-(*N*'-t-butoxicarbonil-L-alanil)-amino-1-pentilfenoxazin-3-ona en forma de sólido marrón.

45 **Ejemplo 2: Síntesis de 7-N-(*N*'-t-butoxicarbonil- β -alanil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona y de 7-N-(*N*'-t-butoxicarbonil- β -alanil)-amino-1-pentilfenoxazin-3-ona**

Se repitió el modo operatorio descrito en el ejemplo 1 anterior, excepto que se utilizó *N*-t-Boc- β -alanina en lugar de *N*-t-Boc-L-alanina.

50 Para recuperar los compuestos del título, se procedió a realizar una cromatografía en columna de sílice eluyendo con una mezcla de gasolina/acetato de etilo (6:4). La primera mancha corresponde a 7-N-(*N*'-t-butoxicarbonil- β -alanil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona en forma de sólido naranja y la segunda mancha corresponde a 7-N-(*N*'-t-butoxicarbonil- β -alanil)-amino-1-pentilfenoxazin-3-ona en forma de sólido naranja.

Ejemplo 3: Desprotección de los derivados aminados

Para ello, se disolvieron en 2 cm³ de TFA (trifluoroacetato) los compuestos obtenidos en los ejemplos 1 y 2 de acuerdo con las siguientes proporciones: 0,10 g (0,21 mmoles) para 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-L-alanil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona y 80 mg (0,18 mmoles) cada una para 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-L-alanil)amino-1-pentilfenoxazin-3-ona, 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-β-alanil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona y 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1-pentilfenoxazin-3-ona.

Se conservó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se registró el avance de la reacción mediante cromatografía en capa fina hasta que ya no se detectaba ningún material suplementario de partida. Se hizo evaporar al vacío el TFA y se lavó completamente el residuo con éter y se secó para obtener los diferentes compuestos en forma de sal de trifluoroacetato (sólido marrón) de acuerdo con los siguientes rendimientos: 0,095 g (92%) para 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-L-alanil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona y 80 mg (97%) cada una para 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-L-alanil)amino-1-pentilfenoxazin-3-ona, 7-N-(*N*-*t*-butoxi-carbonil-β-alanil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona y 7-N-(*N*-*t*-butoxi-carbonil-β-alanil)amino-1-pentilfenoxazin-3-ona.

Ejemplo 4: Síntesis de 7-N-(L-piroglutamil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona y de 7-N-(L-piroglutamil)amino-1-pentilfenoxazin-3-ona

Se repitió el modo operatorio descrito en el ejemplo 1 anterior, excepto que se utilizaron 0,516 g de ácido L-piroglutámico en lugar de *N*-*t*-Boc-L alanina.

Para recuperar los compuestos del título, se procedió a realizar una cromatografía en columna de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/MeOH (95:5). La primera mancha corresponde a 7-N-(L-piroglutamil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona en forma de sólido marrón y la segunda mancha corresponde a 7-N-(L-piroglutamil)amino-1-pentilfenoxazin-3-ona en forma de sólido marrón.

Ejemplo 5: Síntesis de 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1,2-dimetilfenoxazin-3-ona y de 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1,2,4-trimetilfenoxazin-3-ona**5.1. Procedimiento general para la preparación de dimetoxibencenos**

En un matraz seco de fondo redondo y de 2 bocas provisto de un condensador, de un imán recto de agitación y de un tubo de protección de cloruro de calcio, se disolvió hidroquinona (1 equivalente molar) en 50 ml de dimetilformamida (DMF) anhidra y se añadieron 2,2 equivalentes molares de NaH en pequeñas cantidades. Después de la adición de la base y cuando el H₂ había dejado de desprenderse, se añadieron gota a gota 4 equivalentes molares de yoduro de metilo en 15-20 minutos. Al finalizar la adición, se agitó la mezcla de reacción a 40°C durante 2 horas. Se añadieron 200 ml de agua salada al matraz y se extrajo la mezcla resultante con dietiléter (3 veces 50 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con agua (2 veces 50 ml) y se secaron sobre MgSO₄. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se sometió el residuo a una cromatografía en columna.

5.1.1 1,4-Dimetoxi-2,3-dimetilbenceno

Se procedió como se ha descrito en el punto 5.1 anterior a partir de 1,957 g (0,01416 moles) de 2,3-dimetilhidroquinona. Se aisló el producto en forma de sólido blanco (2,27 g, 80%) utilizando una mezcla 95:5 de gasolina mineral ligera:dietiléter.

5.1.2. 1,4-Dimetoxi-2,3,5-trimetilbenceno

Se procedió como se ha descrito en el punto 5.1 anterior a partir de 2,175 g (0,41429 moles) de 2,3,5-trimetilhidroquinona. Se aisló el producto en forma de aceite incoloro (2,367 g, 92%).

5.2. Formilación de dimetoxibencenos mediante la reacción de Duff

Se disolvió 1 equivalente de dimetoxibenceno en 20 ml de TFA y se añadieron 1,05 equivalentes de urotropina a la solución resultante. Se llevó a reflujo la mezcla de reacción durante 2 horas en condiciones anhidras. Se evaporó el TFA a presión reducida, se disolvió el residuo en 100 ml de éter y se lavó la solución orgánica con agua (3 veces 50 ml), y a continuación se secó sobre MgSO₄. Se evaporó el disolvente y se sometió el residuo a una cromatografía en columna, realizando una elución con una mezcla 80:20 de gasolina mineral ligera (60-80°C):dietiléter.

5.2.1. 2,5-Dimetoxi-3,4-dimetilbenzaldehído

Se procedió como se ha descrito en el punto 5.2 anterior a partir de 2,270 g (0,01366 moles) de 1,4-dimetoxi-2,3-dimetilbenceno. Se aisló el producto del título en forma de un sólido blanco (1,18 g, 44%).

5.2.2 2,5-Dimetoxi-3,4,6-trimetilbenzaldehído

Se procedió como se ha descrito en el punto 5.2 anterior a partir de 2,274 g (0,01262 moles) de 1,4-dimetoxi-2,3,5-trimetilbenceno. Se aisló el producto del título en forma de un sólido amarillo (1,21 g, 46%).

5.3 Procedimiento general para la preparación de fenoles utilizando oxidación de Bayer-Villiger

5 Se disolvieron 0,033 moles de dimetoxibenzaldehído en 50 ml de metanol y se añadieron gota a gota a una suspensión de monoperoxifalato de magnesio (MMPP) (0,018 moles) en 50 ml de metanol mientras se mantenía la mezcla de reacción a 0°C. Al finalizar la adición, se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas. Se hidrolizó el éster resultante en condiciones básicas utilizando 50 ml de NaOH 1 M. Después de 1 hora, se retiraron tres cuartos del metanol a presión reducida, se neutralizó la base en exceso con HCl 1 M y se ajustó el pH a 3. Se extrajo el fenol en acetato de etilo (3 veces 50 ml), se secaron las capas orgánicas combinadas sobre MgSO₄, se evaporó el disolvente y se sometió el residuo a una cromatografía en columna.

5.3.1. 2,5-Dimetoxi-3,4-dimetilfenol

15 Se procedió como se ha descrito en el punto 5.3 anterior a partir de 1,126 g (5,797 mmoles) de 2,5-dimetoxi-3,4-dimetilbenzaldehído. Se aisló el producto del título en forma de un aceite amarillo (0,239 g, 23%) utilizando, como eluyente, una mezcla de 60:40 de gasolina mineral ligera (60-80°C):dietiléter.

5.3.2. 2,5-Dimetoxi-3,4,6-trimetilfenol

Se procedió como se ha descrito en el punto 5.3 anterior a partir de 1,205 g (5,786 mmoles) de 2,5-dimetoxi-3,4,6-dimetilbenzaldehído. Se aisló el producto del título en forma de un sólido blanco (0,856 g, 75%) utilizando, como eluyente, una mezcla de 75:25 de gasolina mineral ligera (60-80°C):dietiléter.

5.4. Procedimiento general de preparación de biariléteres

20 Se disolvió 1 equivalente molar de fenol apropiado en 10 ml de DMF anhidro y se añadieron 1,1 equivalentes molares de NaH en pequeñas cantidades. Después del desprendimiento total del gas, se agitó la solución resultante de fenolato de sodio a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió gota a gota al matraz 1 equivalente molar de una solución de 2,5-dinitrofluorobenceno en 5 ml de THF anhidro y se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas. Al final, se vertió el contenido del matraz en 50 ml de agua, se extrajo con éter (3 veces 50 ml) y se secaron las capas orgánicas combinadas sobre MgSO₄. Se retiró el disolvente a presión reducida y se sometió el residuo a una cromatografía en columna.

5.4.1 1-(2',5'-dinitrofenoxi)-3,4-dimetilbenceno

30 Se procedió como se ha descrito en el punto 5.4 anterior a partir de 0,293 g (1,575 mmoles) de 2,5-dinitrofluorobenceno y de 0,287 g (1,575 mmoles) de 2,5-dimetoxi-3,4-dimetilfenol. Se obtuvo el producto del título en forma de un sólido naranja (0,415 g, 76%) después de cromatografía en columna utilizando, como eluyente, una mezcla 85:15 de gasolina mineral ligera (60-80°C):acetato de etilo.

5.4.2 1-(2',5'-dinitrofenoxi)-3,4,6-trimetilbenceno

35 Se procedió como se ha descrito en el punto 5.4 anterior a partir de 0,812 g (4,362 mmoles) de 2,5-dinitrofluorobenceno y de 0,856 g (4,362 mmoles) de 2,5-dimetoxi-3,4,6-trimetilfenol. Se obtuvo el producto del título en forma de un sólido amarillo (1,412 g, 89%) después de cromatografía en columna utilizando, como eluyente, una mezcla 75:25 de gasolina mineral ligera (60-80°C):dietiléter.

5.5. Procedimiento general para la desprotección de hidroquinona-metil-éteres

40 Se disolvió 1 equivalente molar de dimetilariéter en 30 ml de DCM anhidro y se enfrió a -78°C. Se añadieron gota a gota 2,5 equivalentes molares de BBr₃ 1 M en hexano a la solución enfriada de éter y se agitó el producto de reacción a -78°C durante 30 minutos. A continuación se calentó a temperatura ambiente y se agitó hasta el final de la reacción (seguido por cromatografía en capa fina). Se diluyó la mezcla de reacción con 10 ml de metanol a 0°C y se vertió en 50 ml de agua. Se separó la capa orgánica y se lavó la capa acuosa con acetato de etilo (3 veces 25 ml). Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre MgSO₄. Se retiró el disolvente y se sometió el residuo a una cromatografía en columna.

5.5.1. 1-(2',5'-dinitrofenoxi)-3,4-dimetil-2,5-dihidroxibenceno

45 No se aisló el compuesto del título, sino que se formó, y a continuación se redujo y se cicló directamente de acuerdo con una reacción en un mismo recipiente (véase el punto 5.6.1. a continuación).

5.5.2. 1-(2',5'-dinitrofenoxi)-3,4,6-trimetil-2,5-dihidroxibenceno

Se procedió como se ha descrito en el punto 5.5 anterior a partir de 0,626 g (1,728 mmoles) de 1-(2',5'-dinitrofenoxi)-2,5-dimetoxi-3,4,6-dimetilbenzaldehído. Se aisló el producto del título en forma de un sólido naranja (0,435 g, 75%) utilizando, como eluyente, una mezcla 70:30 de gasolina mineral ligera (60-80°C):dietiléter.

5 5.6. Procedimiento general para preparar 7-aminofenoxazin-3-onas

Se disolvieron 1,3 mmoles de dihidroxibiariléter en 5 ml de metanol y se añadió el catalizador Pd/C al 5% (10% peso/peso) a la solución. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente en el aparato de hidrogenación en atmósfera de hidrógeno durante 4 horas. Se añadió sílice al matraz (en cantidad suficiente en vista de la carga de residuo a introducir en la cromatografía en columna) y se agitó la mezcla vigorosamente durante 4 horas
10 suplementarias con entrada libre de aire. Al final de la oxidación, se retiró el disolvente y se sometió el residuo a una cromatografía en columna utilizando un gradiente de eluyente, partiendo de una mezcla 50:50 de gasolina mineral ligera (60-80°C):acetato de etilo, y pasando a continuación a una mezcla 25:75 y a continuación una mezcla 0:100 de los mismos disolventes. Finalmente, se utilizó una mezcla 90:10 de acetato de etilo:metanol como eluyente.

5.6.1. 7-Amino-1,2-dimetilfenoxazin-3-ona

15 Se procedió como se ha descrito en el punto 5.6 anterior partiendo de 0,266 g (0,7636 mmoles) de 1-(2',5'-dinitrofenoxi)-3,4-dimetil-2,5-dihidroxibenceno de acuerdo con una reacción en el mismo recipiente. Se obtuvo el producto del título en forma de un sólido marrón-rojo (0,125 g, 68%).

5.6.2. 7-Amino-1,2,4-trimetilfenoxazin-3-ona

20 Se procedió como se ha descrito en el punto 5.6 anterior partiendo de 0,435 g (1,3013 mmoles) de 1-(2',5'-dinitrofenoxi)-3,4,6-trimetil-2,5-dihidroxibenceno. Se obtuvo el producto del título en forma de un sólido marrón-rojo (0,237 g, 72%).

5.7 Procedimiento general de acoplamiento de péptido a las 7-aminofenoxazin-3-onas

25 Se disolvieron 0,4 mmoles de 7-aminofenoxazin-3-ona en 5 ml de DMF anhidro en un pequeño matraz de fondo redondo que contenía un imán recto de agitación y se añadieron 0,010 g de catalizador Pd/C 5% a la solución. Se colocó el matraz en un aparato de hidrogenación a temperatura ambiente y se mantuvo una atmósfera de hidrógeno mientras se agitaba la mezcla de reacción durante 1 hora. Se pudo confirmar la reducción completa mediante
30 sustitución de un color púrpura intenso de la solución por un color gris verde. En un matraz diferente, se disolvieron 0,089 g (0,4719 mmoles) de N-t-Boc-Alanina, 0,072 g (0,4719 mmoles) de hidroxibenzotriazol (HOBt) y 0,07 ml (0,4719 mmoles) de diisopropilcarbodiimida (DIC) en 5 ml de DCM anhidro y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de este periodo, se introdujo el contenido del segundo matraz en el primer matraz (que contenía la forma reducida de 7-aminofenoxazin-3-ona) por medio de una jeringa en atmósfera
35 inerte. La presencia de oxígeno del aire se evitó debido a la muy rápida oxidación del reactivo. Se agitó la mezcla durante 20 horas suplementarias a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se evaporó. Se disolvió de nuevo el residuo en 20 ml de acetato de etilo, se lavó la capa orgánica con 20 ml de HCl 1 M, 20 ml de Na₂CO₃ al 10% y 20 ml de agua. Se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla 30:70 de gasolina mineral ligera (60-80°C):acetato de etilo como eluyente.

5.7.1 7-N-(N'-t-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1,2-dimetilfenoxazin-3-ona

40 Se procedió como se ha descrito en el punto 5.7 anterior a partir de 0,110 g (0,4578 mmoles) de 7-amino-1,2-dimetilfenoxazin-3-ona. Se obtuvo el producto del título en forma de sólido marrón-rojo (0,104 g, 55%).

5.7.2 7-N-(N'-t-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1,2,4-trimetilfenoxazin-3-ona

Se procedió como se ha descrito en el punto 5.7 anterior a partir de 0,100 g (0,3933 mmoles) de 7-amino-1,2,4-trimetilfenoxazin-3-ona. Se obtuvo el producto del título en forma de sólido naranja (0,113 g, 68%).

5.8. Desprotección del grupo N-t-butoxicarbonilo

45 Se disolvieron 0,2 mmoles del compuesto protegido por el N-t-butoxicarbonilo correspondiente en 3 ml de DCM anhidro y se añadió 1 ml de TFA a la solución. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente hasta el final de la reacción (seguido por cromatografía en capa fina). Se hizo evaporar el disolvente y el TFA en exceso a presión reducida y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna corta utilizando un gradiente de eluyente, partiendo de una mezcla 50:50 de gasolina mineral ligera (60-80°C):acetato de etilo, y a continuación pasando a una
50 mezcla 0:100 de los mismos disolventes. Finalmente, se utilizó una mezcla 90:10 de acetato de etilo:metanol como eluyente.

5.8.1. Sal trifluoroacética de 7-N-(β-alanil)amino-1,2-dimetilfenoxazin-3-ona

Se procedió como se ha indicado en el punto 5.8 anterior a partir de 0,047 g (0,1138 moles) de 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1,2-dimetilfenoxazin-3-ona. Se obtuvo el producto del título en forma de un sólido rojo (0,046 g, 95%).

5 5.8.2. Sal trifluoroacética de 7-N-(β-alanil)amino-1,2,4-trimetilfenoxazin-3-ona

Se procedió como se ha indicado en el punto 5.8 anterior a partir de 0,081 g (0,1897 mmoles) de 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1,2,4-trimetilfenoxazin-3-ona. Se obtuvo el producto del título en forma de un sólido rojo (0,080 g, 96%).

10 Ejemplo 6: Preparación de 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1-metil-2-clorofenoxazin-3-ona-4-carboxilato de metilo

Se disolvieron 1,76 g (10 mmoles) de 1,4-diclorobenzoquinonimina en 50 ml de etanol absoluto agitando suavemente. A esta solución agitada, se le añadieron 1,82 g (10 mmoles) de 4-metil-2,6-dihidroxibenzoato de metilo. Se calentó suavemente a reflujo la solución agitada hasta el punto en el que aparecía una exotermia importante, que requería la retirada del matraz de la fuente de calor. Después de la disminución de la exotermia, se llevó a reflujo la mezcla de reacción durante 30 minutos suplementarios y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después de dejar 15 3 horas más a temperatura ambiente, se recogió el producto sólido mediante filtración por aspiración, se lavó con un poco de agua caliente y se aspiró para obtenerlo lo más seco posible antes del secado en un secador al vacío. Se sometió al residuo a una cromatografía en capa fina en gel de sílice con acetato de etilo como fase móvil. Se observó una cantidad considerable de producto de base de color oscuro, así como el componente rosa fluorescente. 20 Se disolvió el producto sólido en acetato de etilo, se filtró y se le hizo pasar a través de un cono de gel de sílice. El filtrado está esencialmente desprovisto producto de base. Se retiró el disolvente a presión reducida y se aisló el producto sólido.

Se sometió al producto sólido a una aminoacilación utilizando *t*-BOC-β-alanina, como se ha descrito anteriormente, para obtener el compuesto del título.

25 Ejemplo 7: Síntesis de 7-N-(*N*-*t*-butoxicarbonil-β-alanil)amino-6-metil-fenoxazin-3-ona7.1. Síntesis de N-acetil-2-metil-3-fluoroanilina

A una solución de 3,161 g (25,26 mmoles de 2-metil-3-fluoroanilina y de 3,87 ml (27,78 mmoles) de trietilamina en 50 ml de DCM a 0°C, se le añadieron 1,98 ml (27,78 mmoles) de cloruro de acetilo mientras se agitaba. Se dejó que la solución se calentara a temperatura ambiente y se le agitó durante 1 hora. Se lavó la solución con agua (3 veces 30 50 ml), se secó con MgSO₄ y se retiró el disolvente a presión reducida. Después de la recristalización de una mezcla de aceite mineral/acetato de etilo (EtOAc), se obtuvieron 3,844 g (91 %) del compuesto del título en forma de cristales blancos.

7.2. Síntesis de N-acetil-2-metil-3-fluoro-4-nitroanilina

Se hizo reaccionar al compuesto obtenido en el punto 7.1 anterior con una mezcla de 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y de 5 ml de ácido nítrico en 10 ml de ácido acético a 18°C durante 1 hora. A continuación se diluyó la solución de reacción en 100 ml de agua y se extrajo en acetato de etilo (EtOAc) (3 veces 50 ml), y se secó sobre MgSO₄ y se retiró el disolvente al vacío. Se aisló el compuesto del título en forma de sólido blanco (1,96 g, 71%).

7.3. Síntesis de 2-metil-3-fluoro-4-nitroanilina

Se llevaron a reflujo 1,311 g (6,18 mmoles) del compuesto obtenido en el punto 7.2 anterior en ácido clorhídrico 5 M durante 2 horas. Se neutralizó la solución con carbonato de sodio, y a continuación se extrajo con dietiléter (3 veces 40 50 ml), se secó sobre MgSO₄ y se retiró el disolvente al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla 70:30 de gasolina mineral:EtOAc como eluyente. Se aisló el producto del título en forma de un sólido amarillo (0,589 g, 94%).

7.4. Síntesis de 2-fluoro-3,6-dinitrotolueno

Se añadió gota a gota una solución de 0,357 g (2,10 mmoles) del compuesto obtenido en el punto 7.3 anteriormente en 4 ml de ácido acético, a una solución de 1,61 g (10,46 mmoles) de perborato sódico tetrahidratado en 1 ml de EtOAc, a 65°C, y se agitó la mezcla durante 6 horas. Se diluyó la solución de reacción en 50 ml de agua, se extrajo en dietiléter (3 veces 20 ml), se secó sobre MgSO₄ y se retiró el disolvente al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla 70:30 de gasolina mineral:triclorometano como eluyente para 45 50 obtener el producto del título en forma de líquido amarillo (0,274 g, 65%).

7.5 Síntesis de 2,5-dimetoxifenol

Se procedió como se ha indicado en el punto 5.3 anterior a partir de 5,53 g (0,0333 moles) de 2,5-dimetoxibenzaldehído. Se aisló el producto del título en forma de aceite amarillo utilizando una mezcla 80:20 de gasolina mineral ligera (60-80°C):dietiléter como eluyente (4,27 g, 83%).

5 7.6 Síntesis de 1-(3',6'-dinitro-2'-metilfenoxi)-2,5-dimetoxibenceno

Se procedió como se ha indicado en el punto 5.4 anterior a partir de 0,366 g (1,83 mmoles) de 2-fluoro-3,6-dinitrotolueno preparado en el punto 7.4 anterior y 0,282 g (1,83 mmoles) de 2,5-dimetoxifenol preparado en el punto 7.5 anterior. Se aisló el producto del título en forma de sólido amarillo utilizando una mezcla 70:30 de gasolina mineral ligera (60-80°C):dietiléter como eluyente (0,400 g, 65,5%).

10 7.7. Síntesis del compuesto del título

Se puede obtener el compuesto del título como se ha indicado en los puntos 5.5 a 5.7 anteriores.

Ejemplo 8: Detección de la actividad L-alanina peptidasa de las bacterias Gram negativas

15 Se utilizaron los compuestos, clorados o no, preparados en el ejemplo 1, a saber 7-N-(*N'*-*t*-butoxicarbonil-L-alanil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona (Compuesto L-alanilo clorado) y 7-N-(*N'*-*t*-butoxicarbonil-L-alanil)amino-1-pentilfenoxazin-3-ona (Compuesto L-alanilo no clorado), los cuales se desprotegeron de acuerdo con el modo operatorio descrito en el ejemplo 3.

Se disolvieron 10 mg de cada uno de los compuestos L-alanilo en 1 ml de dimetilsulfóxido, y se añadió la mezcla a 200 ml de agar Columbia fundido a 50°C. El medio constituido de este modo se repartió en placas de Petri (concentración final de cada sustrato: 50 mg/l).

20 A continuación se sembraron, con un asa calibrada a 10 µl, en cada medio, cepas de colecciones internacionales o procedentes de la colección de la Solicitante, a partir de suspensiones calibradas de 0,5 McFarland. Todas las cepas también se inocularon en medios de agar Columbia sin sustrato cromógeno como control de crecimiento. Todos los cultivos se incubaron de 24 a 48 h a 37°C.

25 Los resultados de crecimiento y de coloración obtenidos entre 24 y 48 h de incubación se dan en la tabla 1, en el que C significa crecimiento, Co significa color, I significa incoloro, el signo ++ significa muy buen crecimiento, el signo + significa buen crecimiento de la cepa, el signo +/- significa crecimiento medio de la cepa y el signo - significa ausencia de crecimiento de la cepa.

Tabla 1

Nº	Nombre de la cepa	Nº de entrada internacional	Compuesto L-analilo no clorado		Compuesto L-analilo clorado		Control
			Co	C	Co	C	C
1	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i>	NCTC 10418	púrpura	+	Rosa/Púrpura	+	+
2	<i>pneumoniae</i> <i>Salmonella</i>	NCTC 10896	púrpura	+	Rosa/Púrpura	+	+
3	<i>hadar</i>		púrpura	+	Rosa/Púrpura	+	+
4	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Staphylococcus</i>	NCTC 10975	púrpura	+	Rosa/Púrpura	+	+
5	<i>aureus</i>	NCTC 6571	I	-	I	+	+
6	<i>Providencia rettgeri</i>	NCTC 7475	púrpura	+	Rosa/Púrpura	+	+
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 10662	púrpura	+	Rosa/Púrpura	+	++

8	<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 11994		-		+	+
9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	NCTC 8306		-		+/-	+/-

Los resultados en la tabla 1 anterior muestran que el sustrato enzimático de la invención permite la detección de todas las cepas de bacterias, ya que éstas crecen todas, pero que se observa una modificación de coloración únicamente para las cepas Gram - (cepas 1 a 4 y 6 a 7), lo que también permite realizar una discriminación entre las cepas Gram - y las cepas Gram +.

Ejemplo 9: Detección de la actividad β-alanina peptidasa de las bacterias del género *Pseudomonas aeruginosa*

Para ello, se utilizaron los compuestos de β-alanina, clorados o no, preparados en el ejemplo 2, a saber 7-N-(*N*'-t-butoxicarbonil-β-alanil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona (compuesto beta-alanilo clorado) y 7-N-(*N*'-t-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1-pentilfenoxazin-3-ona (compuesto beta-alanilo no clorado), los cuales se desprotegeron de acuerdo con el modo operatorio descrito en el ejemplo 5.

También se prepararon las placas de Petri y se inocularon las cepas de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 5.

Los resultados de coloración entre 24 y 48 h de incubación se indican en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Nombre de la cepa	N° de entrada internacional	Compuesto beta-alanilo no clorado	Compuesto beta-alanilo clorado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		púrpura	púrpura
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		púrpura	púrpura pálido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		púrpura	púrpura pálido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		púrpura	púrpura
<i>Burkholderia cepacia GI</i>	LMG1222	amarillo	amarillo
<i>Burkholderia cepacia GIII</i>	LMG 18832	amarillo	amarillo
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	incoloro	incoloro
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		incoloro	incoloro
<i>Pseudomonas fragilis</i>	NCIMB 8987	incoloro	incoloro
<i>Pseudomonas maltophilia</i>		incoloro	incoloro
<i>Ralstonia basilensis</i>		incoloro	incoloro
<i>Ralstonia taiwanensis</i>		incoloro	incoloro

Los resultados en la tabla 2 anterior demuestran que los compuestos de la invención permiten detectar preferentemente las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (desarrollo de una coloración de púrpura pálido a púrpura).

Ejemplo 10: Detección de la actividad piroglutamil-peptidasa

5 Para ello, se utilizaron los compuestos de piroglutamilo clorado o no, preparados en el ejemplo 4, a saber 7-N-(L-piroglutamil)amino-2-cloro-1-pentilfenoxazin-3-ona (compuesto L-piroglutamilo clorado) y 7-N-(L-piroglutamil)amino-1-pentilfenoxazin-3-ona (compuesto L-piroglutamilo no clorado), los cuales se desprotegeron de acuerdo con el modo operatorio descrito en el ejemplo 5.

También se prepararon las placas de Petri y se inocularon las cepas de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 5.

Los resultados de coloración entre 24 y 48 h de incubación se indican en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Nombre de la cepa	N° de entrada internacional	Compuesto piroglutamilo no clorado	Compuesto piroglutamilo clorado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		púrpura	púrpura
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		púrpura	púrpura
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		púrpura	púrpura
<i>Burkholderia cepacia GI</i>	LMG1222	amarillo	amarillo
<i>Burkholderia cepacia GIII</i>	LMG 18832	amarillo	amarillo
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	incoloro	incoloro
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		incoloro	incoloro
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		incoloro	incoloro
<i>Pseudomonas fragilis</i>	NCIMB 8987	incoloro	incoloro
<i>Pseudomonas maltophilia</i>		incoloro	incoloro
<i>Ralstonia basilensis</i>		incoloro	incoloro
<i>Ralstonia taiwanensis</i>		incoloro	incoloro

10 Los resultados en la tabla 3 anterior demuestran que los compuestos de la invención permiten detectar preferentemente las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*.

Ejemplo: Detección de la actividad β-alanina-peptidasa de las bacterias del género *Pseudomonas aeruginosa*

15 Para ello, se utilizaron los compuestos de β-alanina preparados en los ejemplos 5 y 6, a saber 7-N-(N'-t-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1,2-dimetilfenoxazin-3-ona (b-ala-DMP), 7-N-(N'-t-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1,2,4-trimetilfenoxazin-3-ona (b-ala-TMP) y 7-N-(N'-t-butoxicarbonil-β-alanil)amino-1-metil-2-cloro-4-(oxo-1-metil)fenoxazin-3-ona (b-ala-MCMP), los cuales se desprotegeron como se ha descrito en los ejemplos anteriores.

También se prepararon las placas de Petri y se inocularon las cepas de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 7. Los resultados de coloración entre 24 y 48 h de incubación se indican en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4

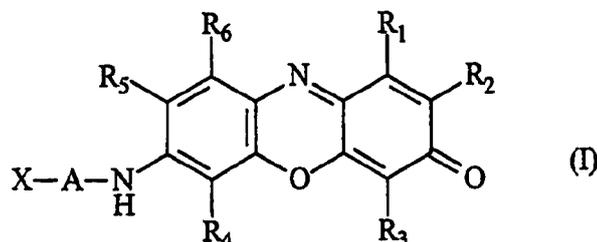
Nombre de la cepa	N° de entrada internacional	b-ala-DMP	b-ala-TMP	b-ala-MCMP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	Rosa intenso	Rosa anaranjado	Violeta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Rosa	Rosa	Violeta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*	Rosa intenso	Rosa anaranjado	Violeta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Rosa intenso	Rosa	Rosa-Violeta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*	Incoloro	Incoloro	Incoloro
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	*	Incoloro	Incoloro	Incoloro
<i>Pseudomonas putida</i>	*	Incoloro	Incoloro	Incoloro
<i>Burkholderia cepacia</i>	LMG 18941	Rosa pálido	Rosa pálido	Incoloro
<i>Burkholderia Gladioli</i>	LGM 6880	Incoloro	Incoloro	Incoloro
<i>Escherichia coli</i>	*	Naranja	Naranja	Incoloro

* Colección de la Solicitante

5 Los resultados en la tabla 4 anterior demuestran que los compuestos de la invención permiten detectar preferentemente las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (desarrollo de una coloración Rosa a Violeta). También puede observarse que los resultados pueden variar en términos de color, intensidad del color, al igual que en términos de sensibilidad y especificidad frente a la especie *Pseudomonas aeruginosa*, de acuerdo con los sustituyentes utilizados y su posición en el anillo principal, de modo que puede preverse la utilización de estos diferentes sustratos en aplicaciones particulares diferentes, de acuerdo con el objetivo pretendido.

REIVINDICACIONES

1. Sustrato enzimático cromógeno, **caracterizado porque** responde a la fórmula (I) siguiente:



en la que

- 5
- R₁ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de C₁-C₁₂, un grupo aralquilo de C₆-C₁₄, un grupo arilo, -COOH, -COOR' o -NR''R''',
 - R₂ representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo de C₁-C₁₂, -COOH o -COOR', entendiéndose que al menos uno de entre R₁ y R₂ es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno,
 - R₃ representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, -CN, -CONH₂, -COOR' o -COR',
 - R₄, R₅ y R₆, cada uno independientemente, representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁-C₃, entendiéndose que al menos uno de entre R₄, R₅ y R₆ es un átomo de hidrógeno,
 - R' representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁-C₆,
 - R'' y R''' representan, cada uno independientemente, un grupo alquilo de C₁-C₆, o bien R'' y R''', junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico que contiene uno o más heteroátomos,
 - A representa al menos un aminoácido, y
 - X representa un agente de bloqueo o nada.
- 10
- 15
2. Sustrato enzimático cromógeno de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** R₁ representa un grupo alquilo, preferentemente de C₃-C₆, y R₂ representa un átomo de hidrógeno.
3. Sustrato enzimático cromógeno de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** R₁ representa un átomo de hidrógeno y R₂ representa un grupo alquilo, preferentemente un grupo etilo o hexilo.
- 20
4. Sustrato enzimático cromógeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** R₃, R₄, R₅ y R₆ representan un átomo de hidrógeno.
- 25
5. Medio de reacción que comprende al menos un sustrato cromógeno enzimático, como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en solitario o en combinación con al menos otro sustrato enzimático específico de una actividad enzimática diferente de la actividad peptidasa detectada por dicho sustrato como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30
6. Medio de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** es un medio de cultivo.
7. Medio de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 ó 6, **caracterizado porque** está en forma gelificada.
8. Utilización de un sustrato enzimático cromógeno como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o de un medio de reacción como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, para la detección y/o la identificación y/o la cuantificación *in vitro* de microorganismos que expresan al menos una actividad peptidasa.
9. Procedimiento para la detección y/o la identificación y/o la cuantificación de microorganismos que expresan al menos una actividad peptidasa, **caracterizado porque** consiste en:
- disponer de un medio de reacción, como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7,
 - sembrar el medio con una muestra biológica a ensayar,
 - dejar incubar, y
- 35

- revelar la presencia de al menos una actividad peptidasa en solitario o en combinación con al menos otra actividad enzimática diferente de esta misma actividad peptidasa.

10. Procedimiento para la diferenciación en bacterias de su pertenencia a los gérmenes Gram positivo o a los gérmenes Gram negativo, **caracterizado porque** consiste en:

- 5
- disponer de un medio de reacción, como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 y en el que el sustituyente A del sustrato cromógeno es L-alanina,
 - sembrar el medio con una muestra biológica a ensayar,
 - dejar incubar, y
- 10
- revelar la presencia de al menos una variación de coloración sinónima de la presencia de un germen o gérmenes Gram negativos.

11. Procedimiento para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*, **caracterizado porque** consiste en:

- 15
- disponer de un medio de reacción, como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 y en el que el sustituyente A del sustrato cromógeno es β -alanina o piroglutamina,
 - sembrar el medio con una muestra biológica a ensayar,
 - dejar incubar, y
 - revelar la presencia de al menos una variación de coloración sinónima de la presencia de un germen o gérmenes de *Pseudomonas aeruginosa*.