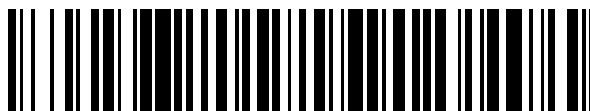


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 221**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/37** (2006.01)

**G01N 33/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2010 E 10752884 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2459734**

54 Título: **Nuevos sustratos de peptidasa**

30 Prioridad:

**30.07.2009 FR 0903768**

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

**21.01.2015**

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)  
Chemin de l'Orme  
69280 Marcy L'Etoile, FR**

72 Inventor/es:

**FABREGA, OLIVIER;  
JAMES, ARTHUR;  
ORENGA, SYLVAIN;  
PERRY, JOHN;  
SALWATURA, VINDHYA LAKSHIKA y  
STANFORTH, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 527 221 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 de peptidasa

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos utilizables a título de indicadores de pH y/o de sustratos enzimáticos para la detección de actividad peptidasa. Estos sustratos son utilizables en las aplicaciones que comprenden una etapa de hidrólisis enzimática que produce una señal fisicoquímica, en particular en microbiología, bioquímica, inmunología, biología molecular, histología, etc. La invención se refiere también a medios de reacción que contienen tales sustratos, a la utilización de los sustratos o de los medios para la detección de actividades peptidasas y/o la diferenciación de bacterias Gram positivas con respecto a bacterias Gram negativas, y a procedimientos de utilización.

10 Existen actualmente muy numerosos medios que permiten la detección de microorganismos. Esta detección se puede basar en particular en la utilización de sustratos particulares, específicos de una enzima del microorganismo que se desea detectar. De manera general, los sustratos sintéticos de enzimas están constituidos de tal manera que el sustrato y el producto de su metabolismo por la enzima diana poseen unas propiedades fisicoquímicas diferentes, que permiten distinguirlos y evaluarlos si todo o parte del sustrato se ha convertido en producto por la enzima. Los  
15 sustratos de hidrolizado están generalmente constituidos de una primera parte específica de la actividad enzimática a revelar, y de una segunda parte que actúa como marcador, generalmente cromógeno o fluorescente. Así, en el caso de las bacterias mediante la selección de los sustratos, según haya reacción o no, es posible caracterizar la naturaleza de un microorganismo. Se puede particularmente utilizar una actividad peptidasa para revelar un grupo, un género o una especie de bacterias. Así, la actividad alanina-aminopeptidasa, por ejemplo, permite diferenciar las  
20 bacterias Gram negativas de las bacterias Gram positivas.

Unos sustratos cromógenos enzimáticos para la detección de actividad peptidasa son conocidos en el estado de la técnica. Se puede citar en particular la publicación de Manafi (Manafi *et al.*, Microbiol Rev 55(3): 335-348, 1991), que es una revista de sustratos enzimáticos utilizados en microbiología. Sin embargo, los sustratos de aminopeptidasa descritos liberan por hidrólisis unos compuestos que se difunden en el medio (beta-naftilamina, 7-amino-4-  
25 metilcumarina). De este modo, en el medio de reacción heterogéneo (colonias sobre cajas de Petri, corte histológico, etc.), no es posible localizar precisamente el lugar de la hidrólisis. Se pueden citar asimismo los sustratos descritos en las solicitudes de patente WO 98/04735 y WO 99/38995 depositadas por la solicitante. Sin embargo, a pesar de que estos sustratos se difunden poco en el medio de cultivo, estos presentan ciertos inconvenientes: su síntesis es difícil, la pureza está reducida, los rendimientos bajos y son tóxicos frente a ciertos microorganismos.

30 Otros sustratos enzimáticos para la detección de actividad peptidasa se describen en la solicitud de patente FR 2916763.

La presente invención propone por lo tanto la utilización de nuevos compuestos, o bien a título de indicadores de pH, o bien a título de sustratos de peptidasa, que permiten la detección de microorganismos. Comparativamente a los sustratos existentes, estos nuevos compuestos son de síntesis fácil, y pueden ser utilizados en particular en medios  
35 gelificados para la detección de microorganismos ya que producen una coloración que se difunde poco o nada en el medio de reacción. En el ámbito de una utilización como sustrato enzimático, esto permite localizar una colonia o un orgánulo que expresa una actividad peptidasa entre otros que no lo expresan.

Antes de avanzar en la descripción de la invención, se dan a continuación las definiciones a fin de facilitar la descripción de la invención.

40 Por sustrato enzimático, se entiende un sustrato que puede ser hidrolizado por una enzima en un producto que permite la detección, directa o indirecta, de un microorganismo, de una célula o de un orgánulo. Este sustrato comprende en particular una primera parte específica de la actividad enzimática a revelar y una segunda parte que actúa como marcador.

Los compuestos según la invención utilizados como sustratos son adecuados para una utilización en citometría de flujo, ya que, al permanecer el producto de la hidrólisis principalmente localizado en la célula que expresa la actividad enzimática, es posible calcular específicamente las células que expresan esta actividad, incluso separarlas del resto de la muestra.

Los compuestos según la invención utilizados como sustratos son también muy adecuados para una utilización en histoenzimología, ya que al permanecer el producto de hidrólisis principalmente localizado en el medio de la hidrólisis, es posible identificar específicamente las células u orgánulos que expresan esta actividad dentro de un tejido.

Debido a su baja toxicidad, los compuestos según la invención son muy adecuados, respectivamente como indicadores de pH, o para el seguimiento de actividad peptidasa en cultivo celular.

Los compuestos según la invención son particularmente muy adecuados para una utilización en el medio de  
55 detección y/o de identificación, ya que producen una coloración o una fluorescencia que no se difunde en el medio de reacción.

En la presente solicitud el término coloración se utiliza para cubrir una coloración, absorción de luz en el espectro visible, o una fluorescencia, absorción a una longitud de onda ( $\lambda_{ex}$ ) y emisión a una longitud de onda superior ( $\lambda_{em}$ ,  $\lambda_{em} > \lambda_{ex}$ ). Los compuestos de la invención pueden ser salificados, es decir en forma de sal tal como cloruro, bromuro, yoduro o trifluoroacetato.

- 5 Por indicador de pH, se entiende una sustancia química cuyo color y/o fluorescencia varía en función de las modificaciones de pH del medio, estando dichas modificaciones relacionadas o no con el metabolismo del o de los microorganismos en crecimiento sobre dicho medio.

10 Por peptidasa, se entiende una enzima capaz de escindir por hidrólisis el grupo amida formado entre el resto acilo de un péptido y una amina primaria. Por aminopeptidasa, se entiende una enzima capaz de escindir por hidrólisis el grupo amida formado entre un acilo de aminoácido y una amina primaria. En la presente solicitud, el término "peptidasa" puede designar, según los casos, tanto una peptidasa como una aminopeptidasa, tales como se han definido anteriormente.

15 Por péptido, se entiende una cadena peptídica que comprende de 1 a 10 aminoácidos, preferiblemente de 1 a 4 aminoácidos. Preferiblemente, el péptido es una di-alanina o tri-alanina. Por aminoácido, se entiende cualquier aminoácido conocido por el experto en la materia, natural o no. Según un modo particular de realización de la invención, el aminoácido es una beta-alanina o L-alanina o D-alanina, o una Glicina, Pirroglutamil, etc.

20 Dicho péptido puede comprender un agente de bloqueo en su extremo N-terminal. Los agentes de bloqueo según la invención comprenden cualquier agente de bloqueo conocido por el experto en la materia que es capaz de proteger las aminas. A título de ejemplo, se puede citar el t-Butoxicarbonilo (N-tBOC), el 9-Fluoreniloxicarbonilo, un agente de solubilización tal como el succinilo, o bien un aminoácido no metabolizable, es decir no natural, tal como el ácido piperídico o la forma D de un aminoácido, tal como la D-fenilalanina. Los agentes de bloqueo no están sistemáticamente presentes en los compuestos de la invención.

25 Por grupo alquilo, se entiende una cadena de grupos hidrocarbonados saturados, tal como en particular un alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, es decir un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. A título de ejemplo, se puede citar el metilo, el etilo, el propilo, el isopropilo, el butilo, el t-butilo, el pentilo, el iso-pentilo y el hexilo.

Por grupo arilo, se entiende un grupo funcional (o sustituyente) que deriva de un núcleo aromático tal como en particular un núcleo aromático de C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, en particular fenilo, bencilo, 1-naftilo o 2-naftilo.

30 Por grupo carboxilo, se entiende en particular un grupo funcional compuesto de un átomo de carbono, unido por un doble enlace a un primer átomo de oxígeno, y por un enlace simple a un segundo átomo de oxígeno, él mismo cargado negativamente o unido a un átomo de hidrógeno. En función del pK<sub>a</sub> de la molécula y del pH del medio, el grupo carboxilo puede estar en forma ionizada, es decir sin H unido al segundo átomo de oxígeno, que está entonces cargado negativamente.

35 Por medio de reacción, se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la expresión de un metabolismo y/o para el crecimiento de microorganismos, de una célula o de un orgánulo. Este medio de reacción puede ser utilizado en citometría de flujo, histoenzimología, cultivo celular, etc. o como medio de detección y/o de identificación de microorganismos.

El medio de reacción puede comprender uno o varios elementos en combinación, tales como unos aminoácidos, unas peptonas, unos hidratos de carbono, unos nucleótidos, unos minerales, unas vitaminas, unos antibióticos, unos tensioactivos, unos tampones, unas sales de fosfato, de amonio, de sodio, de metales.

40 El medio puede comprender también un colorante. A título indicativo, se puede citar como colorante el azul de Evans, rojo neutro, sangre de carnero, sangre de caballo, un opacificante tal como el óxido de titanio, nitroanalina, verde malaquita, verde brillante, etc.

45 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 agente gelificante tradicional en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar gelatina o agarosa. Están disponibles en el comercio un cierto número de preparaciones, como por ejemplo el agar Columbia, la gelosa tripcasa-soja, la gelosa Mac Conkey, la gelosa Sabouraud o más generalmente las descritas en el Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

50 El medio de reacción puede ser un medio de detección y/o de identificación, es decir un medio de revelación o un medio de cultivo y de revelación. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos se efectúa antes de la inoculación y, en el segundo caso, el medio de detección y/o de identificación constituye también el medio de cultivo.

55 Por muestra biológica, se entiende una muestra clínica, procedente de una extracción de líquido biológico o una muestra alimenticia, procedente de cualquier tipo de alimento o una muestra cosmética o farmacéutica procedente de cualquier preparación cosmética o farmacéutica. Esta muestra puede ser así líquida o sólida y se puede citar de manera no limitativa una muestra clínica de sangre, de plasma, de orina, de heces, de biopsias de la nariz, de la garganta, de pieles, de heridas, de líquido cefalorraquídeo, una muestra alimenticia de agua, de bebidas tales como

la leche, un zumo de frutas; de yogur, de carne, de huevos, de verduras, de mayonesa, de queso; de pescado, etc., una muestra alimenticia procedente de una alimentación destinada a los animales, tal como en particular una muestra procedente de harinas animales. La muestra puede también proceder de una extracción del entorno clínico, de la cría o de la producción alimenticia, cosmética o farmacéutica. Por extracción de entorno, se entiende en particular una extracción de la superficie, del líquido, de la materia prima o del producto. Por muestra, se entiende por lo tanto la extracción en sí misma (legra, heces, alimentos, etc.) tanto como colonias de microorganismos procedentes de dicha extracción (por ejemplo después del aislamiento sobre un medio de cultivo gelificado, o en un caldo de enriquecimiento inoculado con dicha extracción).

En el sentido de la presente invención, el término microorganismo cubre las bacterias, las levaduras, los mohos y más generalmente los organismos generalmente unicelulares, invisibles a simple vista, que pueden ser multiplicados y manipulados en laboratorio.

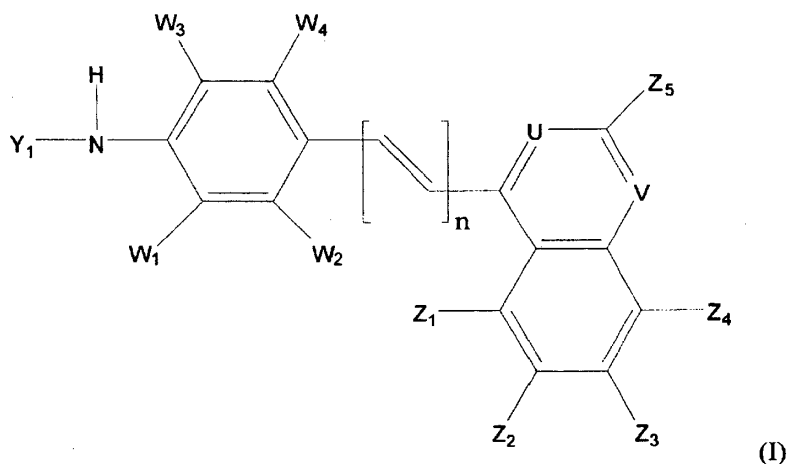
A título de bacterias Gram negativas, se pueden citar las bacterias de los géneros siguientes: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Morganella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Branhamella*, *Neisseria*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Providencia*, *Actinobacillus*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Cedecea*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* y *Legionella*.

A título de bacterias Gram positivas, se pueden citar las bacterias de los géneros siguientes: *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Gardnerella*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Falkamia*, *Gemella*, *Pediococcus*, *Mycobacterium* y *Corynebacterium*.

A título de levaduras, se pueden citar las levaduras de los géneros siguientes: *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*.

Preferiblemente, el microorganismo se selecciona entre *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Providencia rettgeri*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*.

Para ello, la invención se refiere a la utilización de un compuesto de la fórmula (I) siguiente, como sustrato enzimático para la detección de una actividad peptidasa y/o una variación de pH:



según la cual:

- Y<sub>1</sub> es un péptido, H o un alquilo
- W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> y W<sub>4</sub> son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos,
- n = 0, 1 o 2
- U es N o N<sup>+</sup>R y V es CZ<sub>6</sub> N o N<sup>+</sup>R o bien V es N o N<sup>+</sup>R y U es CZ<sub>6</sub>,
- R es H, alquilo, aralquilo, arilo, alcánico o alquilsulfónico
- Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub>, Z<sub>4</sub>, Z<sub>5</sub> y Z<sub>6</sub>, son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

y sus sales.

Cuando dicho compuesto de fórmula (I) se utiliza para detectar únicamente una variación de pH, Y<sub>1</sub> es H o un alquilo.

Cuando dicho compuesto de fórmula (I) se utiliza para la detección de una actividad peptidasa, Y<sub>1</sub> es un péptido. Preferiblemente U o V es N.

- 5 Cuando dicho compuesto de fórmula (I) se utiliza para la detección de una actividad peptidasa y de una variación de pH, Y<sub>1</sub> es un péptido. Preferiblemente U o V es N. Según un modo preferido de realización de la invención, Y<sub>1</sub> es un péptido, preferiblemente seleccionado entre la alanina, la asparagina, la glutamina, la tirosina y Tri-alanila.

Según un modo preferido de realización de la invención, n = 1

Según un modo preferido de realización de la invención, W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> y W<sub>4</sub> son independientemente H

- 10 Según un modo preferido de realización de la invención, U es CH y V es N o N<sup>+</sup>R, preferiblemente N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>

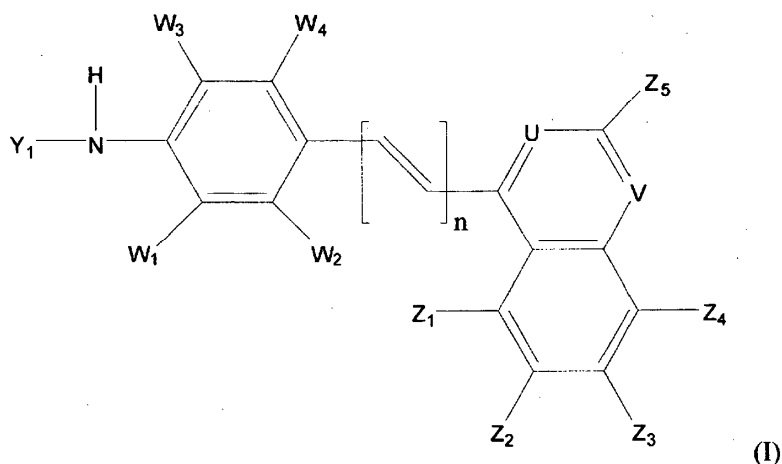
Según un modo preferido de realización de la invención, V es CH y U es N o N<sup>+</sup>R, preferiblemente N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>

Según un modo preferido de realización de la invención, Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub>, Z<sub>4</sub>, Z<sub>5</sub>, y Z<sub>6</sub> son independientemente H

- 15 Según un modo preferido de realización de la invención, L-Alanil-4-(4'-amidofenil)-2-metil-quinolina, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, L-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, beta-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio TFA, D-Alanin-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, Z-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), gamma-Aminobutil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio di-Cl, L-Asparaginil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio-bis-TFA, dicloruro de alpha-Aspartil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio, dicloruro de beta-Aspartil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio, Glicil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-gamma-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), Glicil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio cloruro, dihidrocloruro de L-Leucil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Metionil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio di-Cl, yoduro de Piroglutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, dicloruro de Sarcosinil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, dihidrocloruro de L-Triptofanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, dihidrocloruro de L-Tirosil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, beta-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio TFA, L-Prolil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (HBr), Z-Arginil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Piroglutamil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA, beta-Alanil-4-(4'-amidostiril)-quinolina, L-Glutamil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA, Glicil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA, Piroglutamil-4-(4'-amidostiril) quinolina, L-Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina, beta-Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina, Glicil-2-(4'-amidostiril)quinolina TFA, L-Alanil-2-(2'-piridil)-4-(4'-amidostiril)-quinolina. Según un modo preferido de realización de la invención, dicho compuesto se selecciona entre: beta-Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina (beta-Ala-ASQ), dihidrocloruro de L-Tirosil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (Tyr-ASQM<sup>+</sup>), L-Asparaginil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio-bis-TFA (Asn-ASQM<sup>+</sup>), L-gamma-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro) (gamma-Glu-ASQM<sup>+</sup>), L-Alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro) (Tri-Ala-ASQM<sup>+</sup>).

- 25 La invención se refiere asimismo a un procedimiento para la detección en unos microorganismos de una actividad peptidasa y/o de una variación de pH, caracterizado por que comprende, o está constituido por las etapas siguientes:

a) disponer de un medio de detección y/o de identificación que comprende el compuesto de la fórmula (I) siguiente:



- 40 según la cual:

- Y<sub>1</sub> es un péptido, H o un alquilo
  - W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> y W<sub>4</sub> son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos
  - n = 0, 1 o 2
- 5
- U es N o N<sup>+</sup>R y V es CZ<sub>6</sub> N o N<sup>+</sup>R o bien V es N o N<sup>+</sup>R y U es CZ<sub>6</sub>,
  - R es H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanico o alquilsulfónico
  - Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub>, Z<sub>4</sub> y Z<sub>5</sub>, son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

y sus sales.

- 10
- b) inocular el medio con una muestra biológica a ensayar,
- c) dejar incubar, y
- d) revelar la presencia de al menos una actividad peptidasa o una variación de pH

Cuando dicho procedimiento es un procedimiento para detectar únicamente una variación de pH, Y<sub>1</sub> es H o un alquilo.

- 15
- Cuando dicho procedimiento es un procedimiento para la detección en microorganismos de una actividad peptidasa, Y<sub>1</sub> es un péptido. Preferiblemente U o V es N.

Cuando dicho procedimiento es un procedimiento para la detección en microorganismos de una actividad peptidasa y variación de pH, Y<sub>1</sub> es un péptido. Preferiblemente U o V es N.

- 20
- Según un modo preferido de realización de la invención, Y<sub>1</sub> es un péptido, seleccionado preferiblemente entre la alanina, la asparagina, la glutamina, la tirosina. Según un modo preferido de realización de la invención, n = 1

Según un modo preferido de realización de la invención, W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> y W<sub>4</sub> son independientemente H.

Según un modo preferido de realización de la invención, U es CH y V es N o N<sup>+</sup>R, preferiblemente N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>.

Según un modo preferido de realización de la invención, V es CH y U es N o N<sup>+</sup>R, preferiblemente N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>.

Según un modo preferido de realización de la invención, Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> y Z<sub>4</sub>, Z<sub>5</sub>, y Z<sub>6</sub> son independientemente H.

- 25
- Según un modo preferido de realización de la invención, L-Alanil-4-(4'-amidofenil)-2-metil-quinolina, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, L-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, beta-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio TFA, D-Alanil-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, Z-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), γ-Aminobutil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio di-Cl, L-Asparaginil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio-bis-TFA, dicloruro de α-Aspartil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio, dicloruro de β-Aspartil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio, Glicil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-gamma-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), cloruro de Glicil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, dihidrocloruro de L-Leucil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Metionil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio di-Cl, yoduro de Piroglutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, dicloruro de Sarcosinil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, dihidrocloruro de L-Triptofanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, dihidrocloruro de L-Tirosil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, beta-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio TFA, L-Prolil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (HBr), Z-Arginil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Piroglutamil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA, β-Alanil-4-(4'-amidostiril)-quinolina, L-Glutamil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA, Glicil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA, Piroglutamil-4-(4'-amidostiril) quinolina, L-Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina, β-Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina, Glicil-2-(4'-amidostiril)quinolina TFA, L-Alanil-2-(2'-piridil)-4-(4"-amidostiril)-quinolina Según un modo preferido de realización de la invención, dicho compuesto se selecciona entre: β-Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina (β-Ala-ASQ), dihidrocloruro de L-Tirosil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (Tyr-ASQM<sup>+</sup>), L-Asparaginil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio-bis-TFA (Asn-ASQM<sup>+</sup>), L-gamma-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro) (γ-Glu-ASQM<sup>+</sup>), L-Alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro) (Tri-Ala-ASQM<sup>+</sup>).
- 30
- 35
- 40
- 45

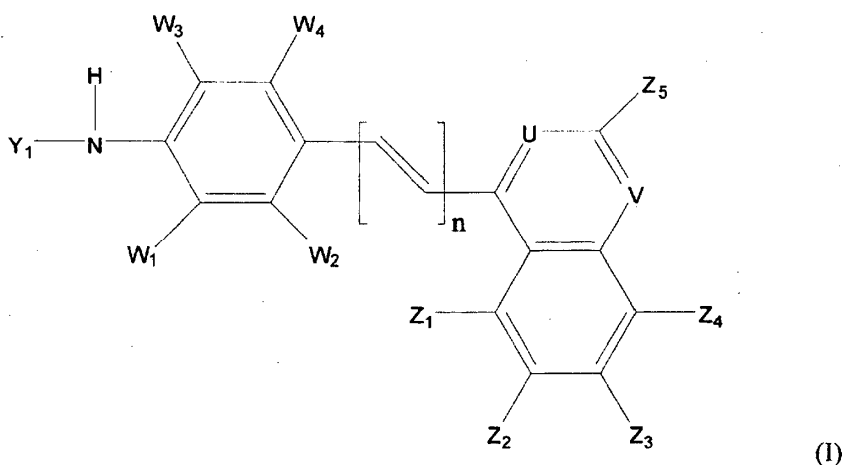
La inoculación de los microorganismos se puede realizar mediante todas las técnicas de inoculación conocidas por el experto en la materia. Una etapa de incubación se puede realizar a una temperatura para la cual la actividad enzimática que se desea detectar es óptima, que el experto en la materia puede seleccionar fácilmente según la actividad enzimática a detectar. La etapa d) puede efectuarse mediante un examen visual, por colorimetría o

fluorimetría. Durante la etapa d), se puede revelar la presencia de la actividad peptidasa o la variación de pH, sola o en combinación con al menos otra actividad enzimática.

Preferiblemente, El microorganismos se selecciona entre *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Providencia rettgeri*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*.

La descripción se refiere también a un procedimiento para la diferenciación en unas bacterias de su pertenencia a las bacterias Gram positivas o a las bacterias Gram negativas, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

a) disponer de un medio de detección y/o de identificación que comprende el compuesto de la fórmula (I) siguiente, como sustrato enzimático para la detección de una actividad peptidasa y/o de una variación de pH:



según la cual:

- Y<sub>1</sub> es un péptido, H o un alquilo
- W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> y W<sub>4</sub> son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos
- n = 0, 1 o 2
- U es N o N<sup>+</sup>R y V es CZ<sub>6</sub> N o N<sup>+</sup>R o bien V es N o N<sup>+</sup>R y U es CZ<sub>6</sub>,
- R es H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanico o alquilsulfónico
- Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub>, Z<sub>4</sub> y Z<sub>5</sub>, son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

y sus sales.

b) inocular el medio con una muestra biológica a ensayar,

c) dejar incubar, y

d) revelar la presencia de al menos una actividad peptidasa

Cuando dicho medio es un medio para detectar únicamente una sola variación de pH, Y<sub>1</sub> es H o un alquilo.

Cuando dicho medio es un medio para detectar una actividad peptidasa, Y<sub>1</sub> es un péptido. Preferiblemente U o V es N.

Cuando dicho medio es un medio para detectar una actividad peptidasa, y una variación de pH, Y<sub>1</sub> es un péptido. Preferiblemente U o V es N.

Como se ha indicado anteriormente, la inoculación de los microorganismos se puede realizar mediante todas las técnicas de inoculación conocidas por el experto en la materia. Una etapa de incubación se puede realizar a una temperatura para la cual la actividad enzimática que se desea detectar es óptima, que el experto en la materia puede seleccionar fácilmente según la actividad enzimática a detectar. La etapa d) puede efectuarse por un examen visual, por colorimetría o fluorimetría. Durante la etapa d), se puede revelar la presencia de la actividad peptidasa,





- $n = 0, 1$  o  $2$ ,
- U es N o  $N^+R$  y V es  $CZ_6$  N o  $N^+R$  o bien V es N o  $N^+R$  y U es  $CZ_6$ ,
- R es H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanico o alquilsulfónico,
- $Z_1, Z_2, Z_3, Z_4$  y  $Z_5$ , son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo,

5

y sus sales.

Cuando dicho medio es un medio para detectar una sola variación de pH,  $Y_1$  es H o un alquilo.

Cuando dicho medio es un medio para detectar una actividad peptidasa, y facultativamente una variación de pH,  $Y_1$  es un péptido. Preferiblemente U o V es N.

- 10 Según un modo preferido de realización de la invención,  $Y_1$  es un péptido, preferiblemente seleccionado entre la alanina, asparagina, la glutamina, la tirosina. Según un modo preferido de realización de la invención,  $n = 1$

Según un modo preferido de realización de la invención,  $W_1, W_2, W_3$  y  $W_4$  son independientemente H.

Según un modo preferido de realización de la invención, U es CH y V es N o  $N^+R$ , preferiblemente  $N^+CH_3$ .

Según un modo preferido de realización de la invención, V es CH y U es N o  $N^+R$ , preferiblemente  $N^+CH_3$ .

- 15 Según un modo preferido de realización de la invención,  $Z_1, Z_2, Z_3$  y  $Z_4, Z_5$ , y  $Z_6$  son independientemente H.

Según un modo preferido de realización de la invención, L-Alanil-4-(4'-amidofenil)-2-metil-quinolina, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, L-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, beta-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio TFA, D-Alanina-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, Z-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro),  $\gamma$ -Aminobutil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio di-Cl, L-Asparaginil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio-bis-TFA, dicloruro de  $\alpha$ -Aspartil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio, dicloruro de  $\beta$ -Aspartil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio, Glicil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-gamma-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), Cloruro de Glicil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, dihidrocloruro de L-Leucil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Metionil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio di-Cl, yoduro de Piroglutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, dicloruro de Sarcosinil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, dihidrocloruro de L-Triptofanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, dihidrocloruro de L-Tirosil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, beta-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio TFA, L-Prolil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (HBr), Z-Arginil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Piroglutamil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA,  $\beta$ -Alanil-4-(4'-amidostiril)-quinolina, L-Glutamil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA, Glicil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA, Piroglutamil-4-(4'-amidostiril) quinolina, L-Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina,  $\beta$ -Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina, Glicil-2-(4'-amidostiril)quinolina TFA, L-Alanil-2-(2'-piridil)-4-(4'-amidostiril)-quinolina. Según un modo preferido de realización de la invención, dicho compuesto se selecciona entre:  $\beta$ -Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina ( $\beta$ -Ala-ASQ), dihidrocloruro de L-Tirosil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio ( $Tyr$ -ASQM<sup>+</sup>), L-Asparaginil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio-bis-TFA ( $Asn$ -ASQM<sup>+</sup>), L-gamma-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (bicloruro) ( $\gamma$ -Glu-ASQM<sup>+</sup>), L-Alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro) ( $Tri$ -Ala-ASQM<sup>+</sup>).

- 40 Preferiblemente, el microorganismo se selecciona entre *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Providencia rettgeri*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*.

- 45 Preferiblemente, dicho medio de reacción es un medio de detección y/o de identificación de microorganismos, comprendiendo dicho medio al menos una molécula utilizada a título de sustrato enzimático o de indicador de pH tal como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, dicho compuesto, sustrato enzimático o indicador de pH, está a una concentración comprendida entre 1 y 1000 mg/l, preferiblemente entre 10 y 500 mg/l. Según un modo particular de realización de la invención, dicho medio de detección y/o de identificación según la invención comprende además al menos otro sustrato enzimático, específico de una actividad enzimática diferente de la actividad peptidasa detectada por la molécula según la invención.

- 50 Según otro modo particular de realización de la invención, dicho medio de detección y/o de identificación según la invención comprende además al menos un sustrato específico de una actividad enzimática diferente de la demostrada por la variación de pH.

El metabolismo enzimático del o de los otros sustratos genera una señal detectable, diferente de la señal generada por el compuesto según la invención utilizado a título de sustrato enzimático o de indicador de pH, como por ejemplo unos 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. A título de otro sustrato específico, se puede utilizar cualquier otro sustrato clásicamente utilizado en la detección de los microorganismos. La concentración del otro sustrato enzimático específico está generalmente comprendida entre 0,01 y 1 g/l. El experto en la materia podrá determinar fácilmente tal concentración en función del sustrato utilizado. A título indicativo, es posible combinar los compuestos según la invención con unos sustratos enzimáticos de peptidasa, de osidasa, de esterasa o de reductasa. En particular, es posible asociar un sustrato según la invención para el cual el péptido es una  $\beta$ -Alanina con un sustrato de osidasa, tal como el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -glucósido, o el alizarin- $\beta$ -galactósido. Es asimismo posible asociar un sustrato según la invención para el cual el péptido es la L-Alanina con un sustrato de esterasa, tal como el 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-octanoato o el 5-bromo-3-indoxil-fosfato.
- Según un modo particular de realización de la invención, dicho medio de detección y/o de identificación según la invención comprende además al menos otro sustrato enzimático específico de la actividad peptidasa o específico de la actividad enzimática detectada por un compuesto según la invención utilizado a título de indicador de pH. Mediante la selección particular de sustratos, es entonces posible identificar unos grupos de microorganismos que expresan una misma actividad enzimática. La concentración del otro sustrato enzimático específico está generalmente comprendida entre 0,01 y 1 g/l. El experto en la materia podrá determinar fácilmente tal concentración en función del sustrato utilizado. En particular, es posible asociar un sustrato según la invención para el cual el péptido es una L-alanina con un sustrato de L-alanina amino-peptidasa descrito en la solicitud WO 2006030119, tal como la L-alanina-pentil-resorufamina.
- Según un modo particular de realización de la invención, dicho medio de detección y/o de identificación según la invención comprende además al menos un indicador metabólico, específico de una actividad metabólica diferente de la detectada por el compuesto según la invención utilizado a título de sustrato o de indicador de pH.

Este indicador metabólico puede ser en particular una fuente de carbono o de nitrógeno asociada o no a un reactivo que revela su metabolismo. Según un modo particular, la fuente de carbono o de nitrógeno está asociada a un indicador de pH diferente del compuesto según la invención utilizado para ello. Según otro modo particular, la fuente de carbono o de nitrógeno está asociada a un catión. Según otro modo particular el indicador metabólico permite detectar una actividad triptofanasa y asocia un triptófano y un reactivo que permite detectar la producción de indol.

Los ejemplos siguientes se dan a título ilustrativo.

#### **Ejemplo 1 – síntesis de sustratos**

La 4-(4'-Aminostiril)-quinoleína se preparó según el método de Bahner *et al* (C. T. Bahner, C. Cook, J. Dale, J. Fain, F. Hannan, P. Smith y J. Wilson, Journal of Organic Chemistry, 1958, 23, 1060-1062).

La aminoacilación de la 4-(4'-aminostiril)-quinoleína con la t-BOC- $\beta$ -alanina se da a título de ejemplo y las otras aminoacilaciones se efectuaron de la misma manera con otro aminoácido protegido.

Síntesis de la t-BOC- $\beta$ -Alanina-4-(4'-aminostiril)-quinoleína a partir de la 4-(4'-aminostiril)-quinoleína y de la t-BOC- $\beta$ -alanina según el método de las anhidridas mezcladas:

- Antes de nada, se aseguró que toda la cristalería utilizada estaba bien seca, ya que la presencia de humedad podría impedir a la reacción desarrollarse correctamente. Se han disuelto 0,50g (0,00266 mol) de t-Boc-L-alanina en 10 ml de tetrahidrofurano (THF) seco y se añadió una trampa de  $\text{CaCl}_2$  en el cuello del matraz a fin de asegurar su estanqueidad. Se ha agitado magnéticamente y se ha hecho disminuir la temperatura del medio de reacción a  $-15^\circ\text{C}$  utilizando un baño de hielo congelado mezclado con sus sales de  $\text{NaCl}$ . Una vez alcanzada esta temperatura, se dejó agitar durante 5 minutos más. Después, se han añadido 0,34g (0,0033 moles) de N-Metil morfolina teniendo al mismo tiempo la precaución de que la temperatura vuelva a bajar a  $-15^\circ\text{C}$  antes de proceder con la próxima etapa. Después, se han añadido gota a gota, con la mayor precaución, 0,36g (0,00266 moles) de isoclorobutilformato, el medio de reacción se enturbia como se esperaba con cada gota añadida. Algunos minutos más tarde, se disolvieron 0,49g (0,002 moles) de 4-(4'-aminostiril)-quinoleína en el mínimo de THF seco y se añadieron al medio de reacción. Se retiró el baño de hielo después de 2 horas, y se dejó agitar durante la noche. Se filtró la solución, se aclaró el matraz con THF normal y se conservó el filtrado. Un ligero precipitado estaba presente y se dejó por lo tanto pasar a la siguiente etapa, de lo contrario habría que volver a poner la solución en un matraz limpio y evaporar la cantidad adecuada de disolvente. Se ha transferido la solución con la ayuda de una pipeta pasteur en un vaso de precipitados de 400 ml que contiene hielo, agua así como carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Se ha dejado todo agitar durante un par de horas, hasta obtener una solución límpida. Se ha filtrado la solución en un pequeño embudo de Buchner y después se ha disuelto el precipitado en etanol a fin de recristalizarlo. Se obtuvieron así 0,76g de t-BOC- $\beta$ -Alanina-4-(4'-aminostiril)-quinoleína, sólido amarillo con un rendimiento del 90%, p.f.  $160-162^\circ\text{C}$ . HRMS (EI) para  $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ . Masa teórica del ión molecular  $418,2125 (\text{M}+\text{H})^+$ . Masa encontrada: 418,2123. RMN  $^1\text{H}$ : (DMSO)  $\delta$  1,34 (9H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 3,19 (2H, q,  $\text{J}=5,94 \text{ Hz}$ ,  $>\text{CH}_2$ ), 3,38 (2H, m,  $>\text{CH}_2$ ), 6,88 (1H, t,  $\text{J}=5,69 \text{ Hz}$ , NH), 7,50 (1H, d,  $\text{J}=16,08 \text{ Hz}$ , =CH), 7,61 (1H, m, Ph-H), 7,64 (2H, d,  $\text{J}=8,66 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}6'-\text{H}$  y  $\text{C}2'-\text{H}$ ), 7,73 (1H, m, Ph-H), 7,74 (2H, d,  $\text{J}=8,91 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}5'-\text{H}$  y  $\text{C}3'-\text{H}$ ), 7,79 (1H, d,  $\text{J}=4,70 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}3-\text{H}$ ), 7,96 (1H, d,  $\text{J}=6,33 \text{ Hz}$ , =CH), 7,99 (1H, d,  $\text{J}=8,16 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}5-\text{H}$ ), 8,48 (1H, d,  $\text{J}=8,41 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}8-\text{H}$ ), 8,82 (1H, d,  $\text{J}=4,70 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}2-\text{H}$ ), 10,09 (1H, s, NH), IR:  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  3380 (CO), 3307 (CONH), 1693 (CONH), 1673 (CONH), 1365 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 754 ( $\text{CH}_2$ ).

La desprotección de los compuestos t-BOC-aminoácido se llevó a cabo bien por reacción con HCl (que da una sal de ácido clorhídrico) o bien por reacción con el ácido TFA (que da una sal de ácido trifluoroacético). La desprotección de la t-BOC-β-Alanina-4-(4'-aminostiril)-quinoleína con HCl se da a título de ejemplo y las otras desprotecciones se efectuaron de la misma manera. Para la desprotección con TFA, se ha colocado un compuesto a desproteger en un matraz equipado de una trampa con CaCl<sub>2</sub>. Después, se ha añadido ácido trifluoroacético y se dejó la mezcla bajo agitación magnética toda la noche. Se ha evaporado el TFA a fin de obtener el producto en forma de sal de ácido trifluoroacético.

Síntesis de la β-Alanina-4-(4'-aminostiril)-quinoleína a partir de la t-BOC-β-Alanina-4-(4'-aminostiril)-quinoleína:

Se disolvió t-BOC-β-Alanina-4-(4'-aminostiril)-quinoleína en el mínimo de acetato de etilo en un matraz equipado con una trampa con CaCl<sub>2</sub>. Después, se añadió una solución saturada de HCl en el acetato de etilo. Se dejó agitar la mezcla durante la noche y después se evaporó el disolvente. Se obtuvo así el dicloruro de β-Alanina-4-(4'-aminostiril)-quinoleína, un sólido marrón con un rendimiento del 77%, p.f. 176-178°C. HRMS (EI) para C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O. Masa teórica del ión molecular 318,1601 (M+H)<sup>+</sup>. Masa encontrada: 318,1601. RMN <sup>1</sup>H: (DMSO) δ 2,50 (2H, t, J=6,19 Hz, >CH<sub>2</sub>), 3,15 (2H, m, >CH<sub>2</sub>), 7,27 (1H, d, J=2,72 Hz, Ph-H), 7,30 (1H, d, J=16,08 Hz, =CH), 7,57 (2H, d, J=8,41 Hz, Ph-H), 7,63 (1H, d, J=16,08 Hz, -CH), 7,64 (2H, d, J=8,91 Hz, Ph-H), 7,74 (2H, m, Ph-H), 8,12 (1H, d, J=8,66 Hz, Ph-H), 8,23 (1H, d, J=7,42 Hz, C8-H), 8,88 (1H, d, J=4,45 Hz, C2-H), 10,43 (1H, s, NH), IR:  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 2852 (NH sal), 1674 (C=O), 1584 (NH), 1379 (NH).

La alquilación de los compuestos t-BOC-aminoácido se efectuó por reacción con un alquilo halogenado. Las sales así obtenidas se desprotegeron o bien con HCl, o bien con el ácido TFA, como se ha mencionado anteriormente. La metilación y la desprotección de la t-BOC-β-Alanina-4-(4'-aminostiril)-quinoleína con el yoduro de metilo se da a título de ejemplo.

Síntesis de la β-Alanina-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinoleinico diclorado a partir de la t-BOC-β-Alanina-4-(4'-aminostiril)-quinoleína:

Se agitó una mezcla de 0,42g (0,001 moles) de la t-Boc-β-alanil-4-(4'-aminostiril)-quinoleína y de 2,21g (0,0155 mols) de yoduro de metilo en 10 ml de acetonitrilo durante la noche. Se filtró la mezcla, dando 0,38g de un sólido naranja de t-Boc-β-alanil-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinoleinico yodado con un rendimiento del 70%, 180-182°C, HRMS (EI) para C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>. Masa teórica del ión molecular 432,2282 (M+H)<sup>+</sup>. Masa encontrada: 432,2280. RMN <sup>1</sup>H: (DMSO) δ 1,39 (9H, s, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3,24 (2H, quartet, J=6,19 Hz, >CH<sub>2</sub>), 3,37 (2H, m, >CH<sub>2</sub>), 4,54 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 6,95 (1H, t, J=6,19 Hz, NH), 7,75 (2H, d, J=8,66 Hz, C6'-H y C2'-H), 7,96 (2H, d, J=8,66 Hz, C5'-H y C3'-H), 8,05 (1H, t, J=7,42 Hz, C7-H), 8,08 (1H, d, J=16,08 Hz, =CH), 8,24 (1H, d, J=16,08 Hz, =CH), 8,27 (1H, t, J=6,93 Hz, C6-H), 8,44 (1H, d, J=8,91 Hz, C5-H), 8,48 (1H, d, J=6,68 Hz, C3-H), 9,05 (1H, d, J=8,66 Hz, C8-H), 9,32 (1H, d, J=6,68 Hz, C2-H), 10,26 (1H, s, NH), IR:  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3368 (NH), 3276 (NH), 1674 (CO), 1617 (CO), 1592 (CONH), 1571 (CONH), 1365 (CCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1395 (CH<sub>3</sub>).

Se desprotegeron 0,54g (0,0013 mols) de este compuesto con HCl, dando 0,39g de un sólido marrón de β-Alanina-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinoleinico diclorado con un rendimiento del 77%, p.f. 176-178°C. HRMS (EI) para C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O. Masa teórica del ión molecular 318,1601 (M+H)<sup>+</sup>. Masa encontrada: 318,1601. RMN <sup>1</sup>H: (DMSO) δ 2,50 (2H, t, J=6,19 Hz, >CH<sub>2</sub>), 3,15 (2H, m, >CH<sub>2</sub>), 7,27 (1H, d, J=2,72 Hz, Ph-H), 7,30 (1H, d, J=16,08 Hz, =CH), 7,57 (2H, d, J=8,41 Hz, Ph-H), 7,63 (1H, d, J=16,08 Hz, -CH), 7,64 (2H, d, J=8,91 Hz, Ph-H), 7,74 (2H, m, Ph-H), 8,12 (1H, d, J=8,66 Hz, Ph-H), 8,23 (1H, d, J=7,42 Hz, C8-H), 8,88 (1H, d, J=4,45 Hz, C2-H), 10,43 (1H, s, NH), IR:  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 2852 (NH sal), 1674 (C=O), 1584 (NH), 1379 (NH).

Otros ejemplos de sustratos típicos obtenidos de manera similar a la mencionada antes:

L-Alanina-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinoleinico diclorado, un sólido rojo, p.f. 244-246°C. HRMS (EI) para C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O. Masa teórica del ión molecular 332,1757 (M-2HCl+H)<sup>+</sup>. Masa encontrada: 332,1756. RMN <sup>1</sup>H: (DMSO) δ 1,51 (3H, d, J=6,93 Hz, -CH<sub>3</sub>), 4,19 (1H, q, J=6,93 Hz, ala-H), 4,55 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 7,86 (2H, d, J=8,66 Hz, C6'-H y C2'-H), 8,01 (2H, d, J=8,66 Hz, C5'-H y C3'-H), 8,05 (1H, m, Ph-H), 8,28 (1H, m, Ph-H), 8,16 (1H, d, J=16,08 Hz, =CH), 8,29 (1H, d, J=16,08 Hz, =CH), 8,44 (1H, d, J=8,91 Hz, C5-H), 8,51 (1H, d, J=6,68 Hz, C3-H), 9,06 (1H, d, J=8,41 Hz, C8-H), 9,40 (1H, d, J=6,68 Hz, C2-H), 11,49 (1H, s, NH). IR:  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 1693 (C=O), 1597 (NH), 1533 (NH), 1324 (NH), 1369 (CH<sub>3</sub>).

L-gamma-Glutamil-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinoleinico diclorado.

RMN <sup>1</sup>H: (DMSO) δ 2,05 (2H, m, >CH<sub>2</sub>), 2,55 (2H, m, >CH<sub>2</sub>), 3,87 (1H, m, >CH-), 4,49 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 7,70 (2H, d, J=7 Hz, Ar-H), 7,90 (2H, d, J=7 Hz, Ar-H), 7,90-8,50 (6H, m, Ar-H, -CH=), 8,60 (1H, broad s, >NH), 8,97 (1H, d, J=8 Hz, Ar-H), 9,29 (1H, d, J=5 Hz, Ar-H).

L-Tirosil-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinoleinico diclorado.

RMN <sup>1</sup>H: (DMSO) δ 3,10 (2H, m, >CH<sub>2</sub>), 4,30 (1H, m, >CH-), 4,52 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 6,70 (2H, d, J=7 Hz, Ar-H), 7,12 (2H, d, J=7 Hz, Ar-H), 7,79 (2H, d, J=7 Hz, Ar-H), 7,98 (2H, d, J=7 Hz, Ar-H), 8,00-8,60 (6H, m, Ar-H y -CH=), 9,04 (1H, d, J=7 Hz, Ar-H), 9,38 (1H, d, J=5 Hz, Ar-H), 9,46 (1H, ancho s, >OH).

L-Alanina-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinoleinio diclorado y D-Alanina-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinoleinio diclorado.

5 RMN <sup>1</sup>H: (DMSO) δ 1,51 (3H, d, J=6,93 Hz, -CH<sub>3</sub>), 4,19 (1H, q, J=6,93 Hz, ala-H), 4,55 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 7,86 (2H, d, J=8,66 Hz, C6'-H y C2'-H), 8,01 (2H, d, J=8,66 Hz, C5'-H y C3'-H), 8,05 (1H, m, Ph-H), 8,28 (1H, m, Ph-H), 8,16 (1H, d, J=16,08 Hz, =CH), 8,29 (1H, d, J=16,08 Hz, =CH), 8,44 (1H, d, J=8,91 Hz, C5-H), 8,51 (1H, d, J=6,68 Hz, C3-H), 9,06 (1H, d, J=8,41 Hz, C8-H), 9,40 (1H, d, J=6,68 Hz, C2-H), 11,49 (1H, s, NH).

## **Ejemplo 2 – Utilización de sustratos de fórmula 1 según la invención para detectar una actividad peptidasa**

### **a) Sustratos de peptidasa**

10 Los compuestos β-Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina (β-Ala-ASQ), Dihidrocloruro de L-Tirosil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (Tyr-ASQM<sup>+</sup>), L-Asparaginil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio-bis-TFA (Asn-ASQM<sup>+</sup>), L-gamma-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro) (γ-Glu-ASQM<sup>+</sup>), L-Alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro) (Tri-Ala-ASQM<sup>+</sup>), se sintetizaron como se describe en el ejemplo 1.

### **b) Preparación del medio**

15 Se disolvieron 40mg de cada uno de los sustratos en 4 ml de Dimetilsulfóxido (80mg para el Asn-ASQM<sup>+</sup>) y se añadieron a 400ml de medio Columbia previamente autoclavado. Los 6 medios se repartieron en cajas de Petri de 90mm de diámetro a razón de 20 ml por caja.

### **c) Inoculación e incubación**

Diecisiete cepas de microorganismos procedentes de colecciones y que pertenecen a diferentes especies de bacterias y levaduras se inocularon en focos de aproximadamente 10 000 unidades, que forman colonias.

20 Se inoculan diez microlitros de una mezcla a partes iguales de suspensiones a 0,5 McFarland diluidas a la 20<sup>a</sup> parte de las cepas de *Escherichia coli* NCTC 10 418 y *Yersinia enterocolitica* NCTC 11 176 sobre el medio mediante aislamiento en cuadrantes.

Los medios son incubados durante 24 horas a 37°C, después las colonias formadas son examinadas visualmente, con o sin adición de ácido, y bajo una lámpara UV de 365 nm.

### **d) Lectura de los resultados**

25 Los resultados obtenidos son presentados en la tabla 1 siguiente

Especie Número de colección	Tyr-ASQM <sup>+</sup>		Tri-Ala-ASQM <sup>+</sup>		γ-Glu-ASQM <sup>+</sup>		Asn-ASQM <sup>+</sup>		β-Ala-ASQ			
	Crois.	Coul.	Crois.	Coul.	Crois.	Coul.	Crois.	Coul.	Crois.	Fluo.	Coul.	Coul. post acid.
<i>Escherichia coli</i> NCTC 10 418	2	Naranja	2	Naranja	2	Naranja	2	Naranja pálida	2	Azul pálido	-	Amarillo pálido
<i>Serratia marcescens</i> NCTC 10 211	2	Naranja	2	Naranja	2	Naranja	2	Naranja pálida	2	Verde	-	Naranja
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10 662	2	-	2	Naranja	2	Naranja	2	Naranja pálida	2	Verde	-	Naranja
<i>Yersinia enterocolitica</i> NCTC 11 176	2	Naranja pálida	2	Naranja pálida	2	-	2	-	2	Azul pálido	-	Amarillo pálido
<i>Salmonella typhimurium</i> NCTC 74	2	Naranja pálida	2	Naranja	2	Naranja	2	-	2	Azul pálido	-	Amarillo pálido
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 11 936	2	Naranja	2	Naranja	2	Naranja	2	Naranja pálida	2	Azul pálido	-	Amarillo pálido
<i>Providencia rettgeri</i> NCTC 7 475	2	Naranja pálida	2	Naranja pálida	2	Naranja	2	-	2	Azul pálido	-	Amarillo pálido
<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 9 372	1	-	2	-	1	-	2	Naranja	PdC	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	1	Naranja pálida	2	Naranja pálida	1	-	2	-	PdC	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> NCTC 7 171	1	-	2	-	1	-	2	-	PdC	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NCTC 11 047	0,5	-	2	-	1	-	-	-	PdC	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 6 571	PdC	-	2	-	1	-	0,5	-	PdC	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	PdC	-	2	-	1	-	2	Naranja	PdC	-	-	-

NCTC 11 939									
<i>Streptococcus pyogenes</i> NCTC 8 306	PdC	-	2	Naranja pálida	1	-	-	PdC	-
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11 994	1	-	2	-	1	-	2	PdC	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 90 028	0,5	-	2	-	1	-	2	PdC	-
<i>Candida glabrata</i> NCPF 3 943	PdC	-	2	-	1	-	0,5	PdC	-

PdC: ningún crecimiento, 0,5: crecimiento bajo, 1: crecimiento moderado, 2: buen crecimiento, -: ningún color

En la caja inoculada con la mezcla de 2 cepas (*E. coli* y *Y. enterocolitica*), se desarrollan dos tipos de colonias: unas colonias naranjas de la cepa de *E. coli* y colonias incoloras de la cepa de *Y. enterocolitica*.

**e) Conclusiones**

5 En los medios según la invención, es posible detectar unas actividades peptidasa de microorganismos gracias a la fluorescencia o a la coloración de las colonias. Con algunos sustratos según la invención, la coloración de las colonias aparece en condición ácida, como es el caso con  $\beta$ -Ala-ASQ en este ejemplo. Con los otros sustratos de este ejemplo, no se requiere la etapa de acidificación.

10 Generalmente, los sustratos según la invención permiten el crecimiento de cualquier tipo de microorganismos: bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, levaduras, etc., pero algunas pueden ser tóxicas frente a ciertos grupos, como es el caso de  $\beta$ -Ala-ASQ en este ejemplo.

Mediante las diferentes variaciones de estructura de los sustratos de peptidasa según la invención, es posible distinguir diferentes grupos de microorganismos. Además, al no difundirse la coloración en el medio de reacción, es posible distinguir y contar las células o colonias que expresan la actividad peptidasa de las que no lo expresan.

15 **Ejemplo 3 – Utilización de sustratos de fórmula I según la invención para detectar una actividad peptidasa**

**a) Sustratos de peptidasa**

El compuesto yoduro de piroglutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinaldino se sintetizó como se describe en el ejemplo 1.

**b) Preparación del medio**

20 Se preparó una solución madre con 50g/l de yoduro de piroglutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinaldino en un disolvente de tipo DMSO y se añadió en un medio Columbia previamente autoclavado, y se mantuvo en sobrefusión, a razón de 75mg/l. Después de la homogeneización, este medio se repartió en cajas cuadradas de 120 mm. Se vertió asimismo un medio que sirve de control de crecimiento (Columbia) y marcado como T.

**c) Inoculación e incubación**

25 Se inocularon veintidós cepas de microorganismos en puntos de ensayo: depósito de 1  $\mu$ l a partir de suspensiones bacterianas a 0,5 McFarland ( $15 \cdot 10^4$  CFU/spot)

Los medios se incubaron durante 48 horas a 37°C, después, los puntos formados se examinaron visualmente.

**d) Lectura de los resultados**

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla siguiente.

	T	Yoduro de Piroglutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinaldino		
Nombre de las cepas <i>Ref. interna</i>	Crecimiento	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color
<i>Escherichia coli</i> 0002005	+++	+++	-	
<i>Serratia marcescens</i> 7303004	+++	+++	++	Pigmento natural
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 0001001	+++	+++	+++	Naranja-rojo
<i>Burkholderia cepacia</i> 7507032	++	++	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i> 7605019	++	+	-	
<i>Salmonella ser. Typhimurium</i> 0801029	+++	+++	-	
<i>Citrobacter freundii</i> 0006197	+++	+++	-	

Nombre de las cepas <i>Ref. interna</i>	T	Yoduro de Piroglutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinaldino		
	Crecimiento	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color
<i>Morganella morganii</i> 9207053	+++	+++	-	
<i>Enterobacter cloacae</i> 0604040	+++	+++	-	
<i>Providencia rettgeri</i> 0706064	+++	+++	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 0008009	+++	+++	-	
<i>Acinetobacter baumannii</i> 0604029	+++	+++	-	
<i>Bacillus subtilis</i> 0204038	+++	-	-	
<i>Enterococcus faecalis</i> 0008192	++	++	-	
<i>Enterococcus faecium</i> 0610021	++	++	-	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 0203050	++	-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> 7811049	++	++	-	
MRSA	+++	++	-	
0303033				
<i>Streptococcus pyogenes</i> 9806380	-	-	-	
<i>Listeria monocytogenes</i> 8812049	++	++	-	
<i>Candida albicans</i> 0801025	++	+	-	
<i>Candida glabrata</i> 0408083	+	-	-	

Leyenda:

+++ : buen crecimiento/intensidad de coloración elevada

++ : crecimiento medio/intensidad de coloración media

+ : bajocrecimiento/intensidad de coloración baja

5 - : sin crecimiento/sin coloración

**Ejemplo 4 – Utilización de sustratos de fórmula I según la invención para detectar una actividad peptidasa**

**a. Sustratos de peptidasa**



Los compuestos L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro), L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro), L-alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro) se sintetizaron como se describe en el ejemplo 1

**b. Preparación del medio**

- 5 Se preparó una solución madre con 50g/l para cada uno de los tres sustratos en un disolvente tipo DMSO y se añadió en un medio Columbia previamente autoclavado y mantenido en sobrefusión, a razón de 75mg/l. Después de la homogeneización, los medios se repartieron en cajas cuadradas de 120 mm. Se vertió también un medio que sirve de control de crecimiento (Columbia) y marcado como T.

**c. Inoculación e incubación**

- 10 Se inocularon veintidós cepas de microorganismos en puntos de ensayo: depósito de 1 µl a partir de suspensiones bacterianas al 0,5 McFarland ( $15,10^4$  CFU/spot).

Se incubaron los medios durante 48 horas a 37°C, y después se examinaron los puntos formados visualmente.

**d. Resultados**

Los resultados obtenidos se consignan en la tabla siguiente.

Nombre de las cepas	T	L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N metilquinolinio (dicloruro)			L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N metilquinolinio (dicloruro)			L-alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro)		
		Crecimiento	Intensidad de coloración	Color	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color
<i>Escherichia coli</i>	++	++	++	naranja	++	-	-	++	++	naranja
<i>Serratia marcescens</i>	++	++	++	naranja	++	+	Naranja	++	++	naranja
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	++	++	naranja	++	-	-	++	++	naranja
<i>Burkholderia cepacia</i>	++	++	+	naranja	++	-	-	++	+	naranja
<i>Yersinia enterocolitica</i>	++	++	++	naranja	++	-	-	++	++	naranja
<i>Salmonella typhimurium</i>	++	++	+	naranja	++	-	-	++	+	naranja
<i>Citrobacter freundii</i>	++	++	+	naranja	++	-	-	++	+	naranja
<i>Morganella morganii</i>	++	++	++	naranja	++	-	-	++	++	naranja
<i>Enterobacter cloacae</i>	++	++	++	naranja	++	+	naranja	++	++	naranja
<i>Providencia rettgeri</i>	++	++	+	naranja	++	-	-	++	+	naranja
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	++	++	naranja	++	+	naranja	++	++	naranja
<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	++	++	naranja	++	+	naranja	++	++	naranja
<i>Bacillus subtilis</i>	++	++	-	-	++	-	-	++	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	++	++	+	naranja	++	-	-	++	+	naranja
<i>Enterococcus faecium</i>	++	++	-	-	++	-	-	++	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	++	++	naranja	++	-	-	++	++	naranja

Nombre de las cepas	T	L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N metilquinolinio (dicloruro)				L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N metilquinolinio (dicloruro)				L-alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro)				
		Crecimiento	Intensidad de coloración	Color	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color	
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+	amarillo naranja	++	-	-	++	-	-	+	++	+	amarillo naranja
<i>MRSA</i>	++	++	+	naranja	++	-	-	++	-	-	+	++	+	naranja
<i>Streptococcus pyogenes</i>	++	++	+	naranja	++	+	naranja	++	+	naranja	++	+	+	naranja
<i>Listeria monocytogenes</i>	++	++	++	naranja	++	++	naranja	++	+	naranja	++	++	++	naranja
<i>Candida albicans</i>	++	++	-		+	-		+	-		+			
<i>Candida glabrata</i>	+	+	-		-	-		-	-		-			

Nota: las referencias internas de las cepas son las mismas que en el ejemplo 3

Leyenda:

++: crecimiento medio/intensidad de coloración media

+: crecimiento bajo/intensidad de coloración baja

-: sin crecimiento/sin coloración

**e. Conclusión**

Los tres sustratos L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro), L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro) y L-alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro) permiten detectar una actividad peptidasa. El número de aminoácidos permite jugar sobre la especificidad de detección.

**5 Ejemplo 5 – Utilización de sustratos de fórmula I según la invención para detectar una actividad peptidasa****a) Sustratos de peptidasa**

Los compuestos L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro) y L-alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro) se sintetizaron como se describe en el ejemplo 1.

**b) Preparación del medio**

10 Se preparó una solución madre con 50g/l para cada uno de los dos sustratos en un disolvente tipo DMSO y se añadió en un medio Columbia previamente autoclavado y mantenido en sobrefusión, a razón de 75 mg/l. Después de la homogeneización, los medios se repartieron en cajas de Petri de 55mm de diámetro. Se vertió asimismo un medio que sirve de control de crecimiento (Columbia) y marcado como T.

**c) Inoculación e incubación**

15 Se inocularon veintidós cepas de microorganismos con una pequeña pinza calibrada de 10 µl según el método de los tres cuadrantes a partir de suspensiones bacterianas al 0,5 McFarland. Se incubaron los medios durante 48 horas a 37°C, y después se examinaron las colonias formadas visualmente.

**d) Resultados**

Los resultados obtenidos se consignan en la tabla siguiente.

Nombre de las cepas	T	L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro)			L-alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro)		
	Crecimiento	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color
<i>Escherichia coli</i>	++	++	++	naranja	++	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	++	++	++	naranja	++	+	naranja
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	++	++	naranja	++	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	++	++	-	-	++	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	+	++	naranja	+	-	-
<i>Salmonella ser. typhimurium</i>	++	++	-	-	++	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	++	++	++	naranja	++	-	-
<i>Morganella morganii</i>	++	++	++	naranja	++	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	++	++	+	naranja	++	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	++	++	++	naranja	++	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	++	++	naranja	++	-	-

Nombre de las cepas	T	L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro)			L-alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro)		
	Crecimiento	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color
<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	++	++	naranja	++	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	++	++	+	naranja	++	+	naranja
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	naranja	+	+	naranja
<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	-	-	+	+	naranja
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	++	+	naranja	++	+	naranja
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+	naranja	++	-	-
MRSA	++	++	++	naranja	++	+	naranja
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	+	naranja	+	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	++	naranja	+	+	naranja
<i>Candida albicans</i>	++	++	-	-	++	-	-
<i>Candida glabrata</i>	+	+	-	-	+	-	-

Nota: las referencias internas de las cepas son las mismas que en el ejemplo 3.

Leyenda:

++: crecimiento medio/intensidad de coloración media

+: crecimiento bajo/intensidad de coloración baja

5 -: sin crecimiento/sin coloración

### e) Conclusión

Los compuestos L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro) y L-alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio (dicloruro) permiten detectar una actividad Alanina-aminopeptidasa.

### Ejemplo 6 – Utilización de sustratos de fórmula I según la invención para detectar una variación de pH

#### 10 a) Indicadores de pH

El compuesto 4-(4'-aminostiril)-quinolina se sintetizó como se describe en el ejemplo 1

#### b) Preparación del medio

15 Se preparó una solución madre con 50 g/l de 4-(4'-aminostiril)-quinolina en un disolvente de tipo DMSO y se añadió en un medio chromID coli® modificado previamente autoclavado y mantenido en sobrefusión, a razón de 50 mg/l. Después de la homogeneización, este medio se repartió en cajas de Petri cuadradas de 120 mm. Se vertió también un medio que sirve de control de crecimiento (chromID coli® modificado) y marcado como T.

\*Composición del medio chromID coli® modificado (en g/l):

Peptonas: 5,5

Extracto de levadura: 8

Cloruro de sodio: 5

5 Sales biliares: 0,7

Glucosa: 10

Agar: 12,5

**c) Inoculación e incubación**

10 Se inocularon cuarenta cepas de microorganismos (detalladas en la tabla siguiente) en puntos de ensayo: depósito de 1 µl a partir de suspensiones bacterianas con 0,5 McFarland ( $15,10^4$  CFU/spot)

Se incubaron los medios durante 24 horas a 37°C, y después se examinaron los puntos formados visualmente.

	<b>Especie</b>	<b>n°API</b>
1	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	73 08 012
2	<i>Edwarsiella tarda</i>	75 07 053
3	<i>Citrobacter koseri</i>	75 08 021
4	<i>Shigella spp</i>	76 02 055
5	<i>E. coli</i>	77 05 035
6	<i>E. coli</i>	78 12 004
7	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	80 12 075
8	<i>Salmonella ser. Typhimurium</i>	81 12 010
9	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	84 06 059
10	<i>Kluyvera ascorbata</i>	84 08 084
11	<i>Escherichia vulneris</i>	85 06 777
12	<i>Providencia rettgeri</i>	88 05 064
13	<i>Shigella flexneri</i>	92 11 059
14	<i>Shigella sonnei</i>	92 11 060
15	<i>Yersinia enterocolitica ssp enterocolitica</i>	92 11 061
16	<i>Providencia stuartii</i>	92 12 101
17	<i>Salmonella spp</i>	93 03 001
18	<i>Salmonella ser Enteritidis</i>	94 06 001
19	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	97 04 041
20	<i>Morganella morganii ssp morganii</i>	97 08 046
21	<i>Shigella boydii</i>	00 04 212
22	<i>Escherichia hermanni</i>	04 03 161
23	<i>Proteus mirabilis</i>	04 05 048
24	<i>Pantoea agglomerans</i>	04 05 057

	<b>Especie</b>	<b>n°API</b>
25	<i>Proteus vulgaris</i>	04 05 062
26	<i>Enterobacter sakazakii</i>	05 01 020
27	<i>Rahnella aquatilis</i>	05 04 103
28	<i>Serratia liquefaciens</i>	05 04 117
29	<i>Cedecea lapagei</i>	05 04 130
30	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	05 04 140
31	<i>Yersinia enterocolitica</i>	05 04 143
32	<i>E. coli</i>	05 04 163
33	<i>Citrobacter freundii</i>	05 04 165
34	<i>Buttiauxella agrestis</i>	05 04 166
35	<i>Klebsiella oxytoca</i>	05 04 175
36	<i>Hafnia alvei</i>	05 04 201
37	<i>Enterobacter intermedius</i>	05 04 110
38	<i>E. coli</i>	05 06 043
39	<i>Ewingella americana</i>	05 06 045
40	<i>Enterobacter amnigenus</i>	05 06 046
41	<i>E. coli</i>	05 06 052
42	<i>Citrobacter braakii</i>	05 06 109
43	<i>Enterobacter cloacae</i>	05 09 064
44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89 09 041

**d) Lectura de los resultados**

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla siguiente:

N° de cepas	4-(4'-aminostiril)-quinolina			
	T	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color
1		++	++	Naranja
2		++	++	Naranja
3		++	++	Naranja
4		++	++	Naranja
5		++	++	Naranja
6		++	++	Naranja
7		-	-	-
8		++	++	Naranja
9		++	+	Naranja

ES 2 527 221 T3

N° de cepas	T		4-(4'-aminostiril)-quinolina	
	Crecimiento	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color
10	++	++	++	Naranja
11	++	++	++	Naranja
12	++	++	++	Naranja
13	++	++	++	Naranja
14	++	++	++	Naranja
15	++	++	++	Naranja
16	++	++	++	Naranja
17	++	++	++	Naranja
18	++	++	++	Naranja
19	++	++	++	Naranja
20	++	++	++	Naranja
21	++	++	++	Naranja
22	++	++	++	Naranja
23	++	++	++	Naranja
24	++	++	++	Naranja
25	++	++	++	Naranja
26	++	++	-	-
27	++	++	++	Naranja
28	++	++	++	Naranja
29	++	++	++	Naranja
30	++	++	++	Naranja
31	++	+	++	Naranja
32	++	++	++	Naranja
33	++	++	++	Naranja
34	++	++	++	Naranja
35	++	++	++	Naranja
36	++	++	++	Naranja
37	++	+	++	Naranja
38	++	++	++	Naranja
39	++	++	++	Naranja
40	++	++	++	Naranja
41	++	++	++	Naranja
42	++	++	++	Naranja



N° de cepas	T	4-(4'-aminostiril)-quinolina		
	Crecimiento	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color
43	++	++	++	Naranja
44	++	+	-	-

### e) **Conclusión**

La 4-(4'-aminostiril)-quinolina no presenta ninguna toxicidad particular.

5 Su utilización permite revelar una acidificación a través de la aparición de una coloración naranja intenso que se difunde sólo poco después de 24h de incubación.

En las condiciones ensayadas, la utilización de la 4-(4'-aminostiril)-quinolina permite detectar las cepas capaces de fermentar la glucosa.

### **Ejemplo 7 – Utilización de sustratos de fórmula 1 según la invención para detectar una variación de pH**

#### a) **Indicadores de pH**

10 El compuesto 4-(4'-aminostiril)-quinolina se sintetizó como se describe en el ejemplo 1

#### b) **Preparación del medio**

15 Se prepararon una solución madre con 50g/l en 4-(4'-aminostiril)-quinolina y una solución madre con 40g/l en Blue-b-D-GUR (es decir el ácido 5-bromo-3-indoxil-b-D-glucurónico) en un disolvente de tipo DMSO y se añadieron en un medio chromID coli® modificado previamente autoclavado y mantenido en sobrefusión, a razón de, respectivamente, 50 mg/l y 200 mg/l. Después de la homogeneización, este medio se repartió en cajas de Petri cuadradas de 120 mm. Se vertió también un medio que sirve de control de crecimiento (chromID coli® modifié) y marcado como T.

\*Composición del medio chromID coli® modificado (en g/l):

Peptonas: 5,5

Extracto de levadura: 8

20 Cloruro de sodio: 5

Sales biliares: 0,7

Glucosa: 10

Activador: 0,2

Agar: 12,5

#### 25 c) **Inoculación e incubación**

Se inocularon cuarenta y tres cepas de microorganismos (detalladas en la tabla siguiente) en puntos de ensayo: depósito de 1 µl a partir de suspensiones bacterianas con 0,5 McFarland ( $15 \cdot 10^4$  CFU/spot)

Se incubaron los medios durante 48 horas a 37°C, y después se examinaron los puntos formados visualmente.

	<b>Especie</b>	<b>n°API</b>
1	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	73 08 012
2	<i>Edwarsiella tarda</i>	75 07 053
3	<i>Citrobacter koseri</i>	75 08 021
4	<i>Shigella spp</i>	76 02 055
5	<i>E. coli</i>	77 05 035

ES 2 527 221 T3

	<b>Especie</b>	<b>n°API</b>
6	<i>E. coli</i>	78 12 004
7	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	80 12 075
8	<i>Salmonella ser. Typhimurium</i>	81 12 010
9	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	84 06 059
10	<i>Kluyvera ascorbata</i>	84 08 084
11	<i>Escherichia vulneris</i>	85 06 777
12	<i>Providencia rettgeri</i>	88 05 064
13	<i>Shigella flexneri</i>	92 11 059
14	<i>Shigella sonnei</i>	92 11 060
15	<i>Yersinia enterocolitica ssp enterocolitica</i>	92 11 061
16	<i>Providencia stuartii</i>	92 12 101
17	<i>Salmonella spp</i>	93 03 001
18	<i>Salmonella ser. Enteritidis</i>	94 06 001
19	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	97 04 041
20	<i>Morganella morganii ssp morganii</i>	97 08 046
21	<i>Shigella boydii</i>	00 04 212
22	<i>Escherichia hermannii</i>	04 03 161
23	<i>Pantoea agglomerans</i>	04 05 057
24	<i>Proteus vulgaris</i>	04 05 062
25	<i>Enterobacter sakazakii</i>	05 01 020
26	<i>Rahnella aquatilis</i>	05 04 103
27	<i>Serratia liquefaciens</i>	05 04 117
28	<i>Cedecea lapagei</i>	05 04 130
29	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	05 04 140
30	<i>Yersinia enterocolitica</i>	05 04 143
31	<i>E. coli</i>	05 04 163
32	<i>Citrobacter freundii</i>	05 04 165
33	<i>Buttiauxella agrestis</i>	05 04 166
34	<i>Klebsiella oxytoca</i>	05 04 175
35	<i>Hafnia alvei</i>	05 04 201
36	<i>Enterobacter intermedius</i>	05 04 110
37	<i>E. coli</i>	05 06 043
38	<i>Ewingella americana</i>	05 06 045
39	<i>Enterobacter amnigenus</i>	05 06 046

ES 2 527 221 T3

	Especie	n°API
40	<i>E. coli</i>	05 06 052
41	<i>Citrobacter braakii</i>	05 06 109
42	<i>Enterobacter cloacae</i>	05 09 064
43	<i>A cinetobacter lwoffii</i>	05 04 082

**d) Lectura de los resultados**

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla siguiente.

N° de cepas	T		4-(4'-aminostiril)-quinolina + Blue-b-GUR	
	Crecimiento	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color
1	++	++	++	naranja
2	++	++	++	naranja
3	++	++	++	naranja
4	++	++	++	naranja marrón
5	++	++	++	marrón
6	++	++	++	marrón
7	-	-	-	-
8	++	++	++	naranja
9	++	+	++	naranja
10	++	++	++	naranja
11	++	++	++	naranja
12	++	++	++	naranja
13	++	++	++	naranja
14	++	++	++	naranja marrón
15	++	+	++	naranja
16	++	++	++	naranja
17	++	++	++	naranja
18	++	++	++	naranja
19	++	++	++	naranja
20	++	++	++	naranja
21	++	++	++	marrón
22	++	++	++	naranja
23	++	++	++	naranja
24	++	++	++	naranja
25	++	++	-	-

N° de cepas	T	4-(4'-aminostiril)-quinolina + Blue-b-GUR		
	Crecimiento	Crecimiento	Intensidad de coloración	Color
26	++	++	++	naranja
27	++	++	+	naranja
28	++	++	++	naranja
29	++	++	++	naranja
30	++	++	++	naranja
31	++	++	++	marrón
32	++	++	++	naranja
33	++	++	++	naranja
34	++	++	++	naranja
35	++	++	++	naranja
36	++	++	++	naranja
37	++	+	++	marrón
38	++	++	++	naranja
39	++	++	++	naranja
40	++	++	++	marrón
41	++	++	++	naranja
42	++	++	++	naranja
43	++	++	++	naranja
44	++	+	-	-

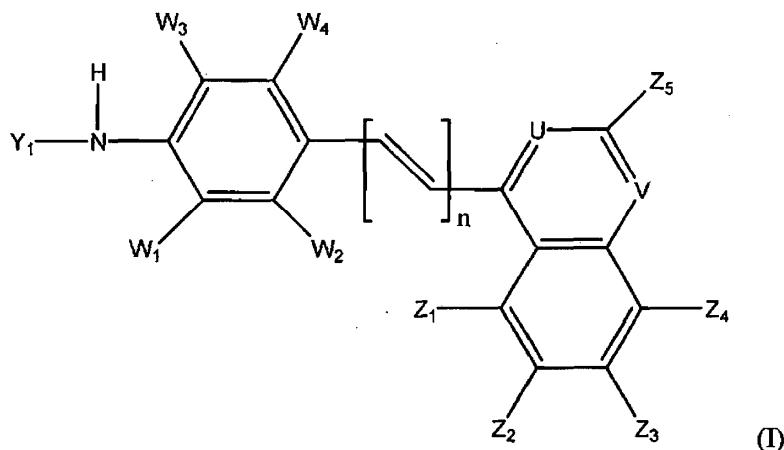
**e) Conclusión**

La 4-(4'-aminostiril)-quinolina asociada a Blue-b-GUR permite detectar simultáneamente las enterobacterias (acidificación de la glucosa revelada por la coloración naranja del 4-(4'-aminostiril)-quinolinio) y las cepas de *E. coli* beta-glucuronidasa positiva (así como *Shigella* – desde un punto de vista genómico, las cepas de *Shigella* pertenecen a la especie *E. coli*.) por la coloración marrón de las colonias, mezcla de naranja y de azul (tras la hidrólisis del Blue-b-GUR).

5

## REIVINDICACIONES

1. Utilización de un compuesto de la fórmula (I) siguiente, como sustrato enzimático para la detección de una actividad peptidasa y/o una variación de pH:



5 según la cual:

- $Y_1$  es un péptido, H o un alquilo
- $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  y  $W_4$  son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos
- $n = 0, 1$  o  $2$
- U es N o  $N^+R$  y V es  $CZ_6 N$  o  $N^+R$  o bien V es N o  $N^+R$  y U es  $CZ_6$ ,
- R es H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico
- $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$ ,  $Z_4$  y  $Z_5$ , son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

y sus sales

15 2. Utilización de un compuesto de fórmula I según la reivindicación 1 según la cual  $Y_1$  es un péptido, preferiblemente seleccionado entre la alanina, la asparagina, la glutamina, la tirosina.

3. Utilización de un compuesto de fórmula I según la reivindicación 1 o 2, según la cual  $n = 1$

4. Utilización de un compuesto de fórmula I según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, según la cual  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  y  $W_4$  son independientemente H.

20 5. Utilización de un compuesto de fórmula I según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, según la cual U es CH y V es N o  $N^+R$ , preferiblemente  $N^+CH_3$ .

6. Utilización de un compuesto de fórmula I según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, según la cual V es CH y U es N o  $N^+R$ , preferiblemente  $N^+CH_3$ .

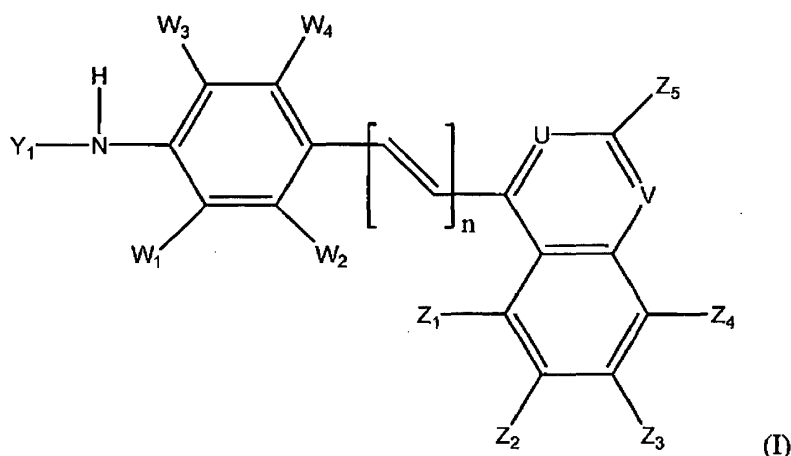
25 7. Utilización de un compuesto de fórmula 1 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, según la cual  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$  son independientemente H.

8. Utilización de un compuesto de fórmula I según la reivindicación 1, según la cual dicho compuesto se selecciona entre: L-Alanil-4-(4'-amidofenil)-2-metil-quinolina, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, L-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, beta-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-bencil-quinolinio TFA, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio TFA, D-Alanina-N-metil-4-(4'-aminostiril)-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, Z-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-Alanil-L-alanil-L-alanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro),  $\gamma$ -Aminobutiril-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio di-Cl, L-Asparaginil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio-bis-TFA, dicloruro de  $\alpha$ -Aspartil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio, dicloruro de  $\beta$ -Aspartil-4-(4'-amidostiril)-N-metilquinolinio, Glicil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), L-gamma-Glutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (dicloruro), Cloruro de Glicil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, Dihidrocloruro de L-Leucil-4-(4'-

amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Metionil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio di-Cl, yoduro de Piroglutamil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, Dihidrocloruro de L-Triptofanil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, Dihidrocloruro de L-Tirosil-4-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, beta-Alanil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio TFA, L-Proilil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio (HBr), Z-Arginil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Piroglutamil-2-(4'-amidostiril)-N-metil-quinolinio, L-Alanil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA,  $\beta$ -Alanil-4-(4'-amidostiril)-quinolina, L-Glutamil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA, Glicil-4-(4'-amidostiril)quinolina TFA, Piroglutamil-4-(4'-amidostiril) quinolina, L-Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina,  $\beta$ -Alanil-2-(4'-amidostiril)-quinolina, Glicil-2-(4'-amidostiril)quinolina TFA, L-Alanil-2-(2'-piridil)-4-(4''-amidostiril)-quinolina.

9. Procedimiento para la detección en microorganismos de una actividad peptidasa y/o de una variación de pH, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

a) Disponer en un medio de detección y/o de identificación que comprende un compuesto de la fórmula (I) siguiente:



según la cual:

- Y<sub>1</sub> es un péptido, H o un alquilo
- W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> y W<sub>4</sub> son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos
- n = 0, 1 o 2
- U es N o N<sup>+</sup>R y V es CZ<sub>6</sub> N o N<sup>+</sup>R o bien V es N o N<sup>+</sup>R y U es CZ<sub>6</sub>,
- R es H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico
- Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub>, Z<sub>4</sub> y Z<sub>5</sub>, son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

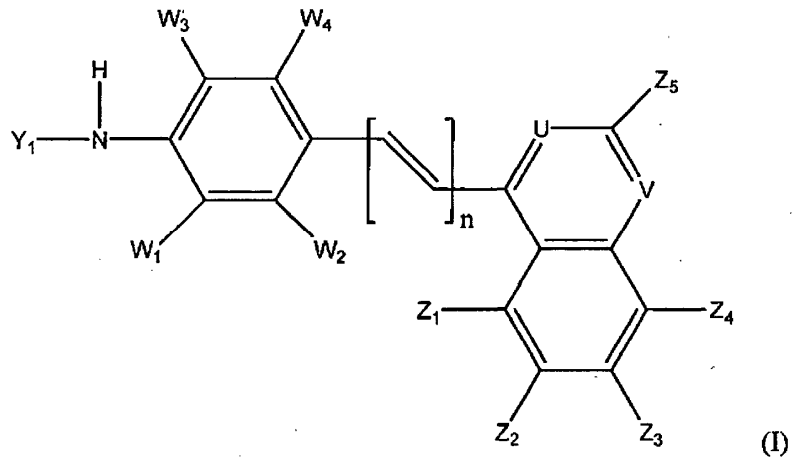
y sus sales.

b) inocular el medio con una muestra biológica a ensayar,

c) dejar incubar, y

d) revelar la presencia de al menos una actividad peptidasa o una variación de pH

10. Medio de detección y/o de identificación de microorganismos que comprende un compuesto de la fórmula (I) siguiente para detectar una actividad peptidasa y/o una variación de pH:



según la cual:

- Y<sub>1</sub> es un péptido, H o un alquilo
- W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> y W<sub>4</sub> son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos
- n = 0, 1 o 2
- U es N o N<sup>+</sup>R y V es CZ<sub>6</sub> N o N<sup>+</sup>R o bien V es N o N<sup>+</sup>R y U es CZ<sub>6</sub>,
- R es H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico
- Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub>, Z<sub>4</sub> y Z<sub>5</sub>, son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

y sus sales.