(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 527 624**

(51) Int. CI.:

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 10752886 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2459735**

(54) Título: **Nuevos sustratos de peptidasa**

(30) Prioridad:

30.07.2009 FR 0903755

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2015

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

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.

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 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 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-metilcumarina). De este modo, en el medio de reacción heterogéneo (colonias sobre cajas de Pétri, 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. 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 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.

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 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 (λ_{ex}) y emisión a una longitud de onda superior (λ_{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.

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.

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.

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.

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 pipecólico 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.

Por grupo alquilo, se entiende una cadena de grupos hidrocarbonados saturados, tal como en particular un alquilo de C_1-C_6, 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_6-C_{10}, en particular fenilo, bencilo, 1-naftilo o 2-naftilo.

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_a 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.

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.

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.

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).

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.

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 medio que contiene unos microorganismos procedentes de dicha muestra (por ejemplo 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.

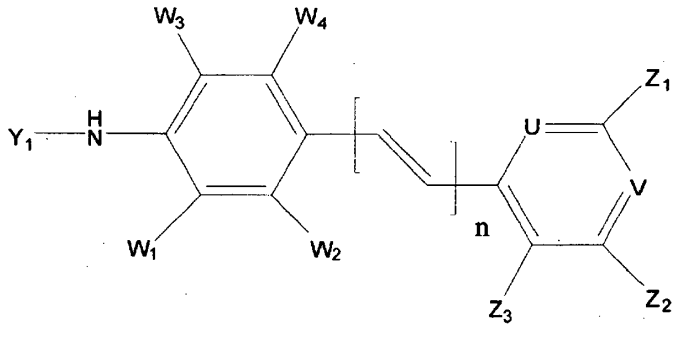
A título de bacterias Gram negativas, se pueden citar las bacterias de los géneros siguientes: *Pseudomonas, Escherichia, Salmonella, Shigella, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Proteus, Campylobacter, Haemophilus, Morganella, Vibrio, Yersinia, Acinetobacter, Branhamella, Neisseria, Burkholderia, Citrobacter, 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, Enterobacter aerogenes, Citrobacter freudii, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, 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:



(I)

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 y V son N, N^+R, CZ_4, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico. Preferiblemente, si U es CZ_4, V es N o N^+R; si V es CZ_4, U es N o N^+R.
- siendo Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4, 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_1 es H o un alquilo.

Cuando dicho compuesto de fórmula (I) se utiliza para la detección de una actividad peptidasa, Y_1 es un péptido.

Cuando dicho compuesto de fórmula (I) se utiliza para la detección de una actividad peptidasa y de una variación de pH, Y_1 es un péptido.

Según un modo preferido de realización de la invención, Y_1 es un péptido preferiblemente seleccionado de glicina, alanina, preferiblemente alanina.

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 CZ4, preferiblemente CH

Según un modo preferido de realización de la invención, V es N^+R, preferiblemente N^+CH3

Según un modo preferido de realización de la invención, Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 son H

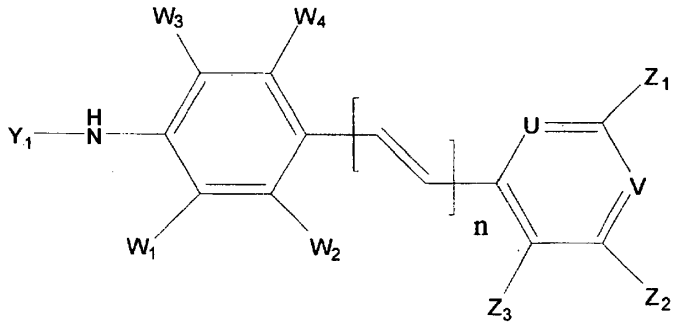
Según un modo preferido de realización de la invención, dicho compuesto se selecciona entre cloruro de glicil-4-(4'amidoestiril)-N-metil-piridinio, L-alanil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio TFA, cloruro de β-alanil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio, perclorato de L-alanil-4-(4'-amidoestiril)-piridina (sin cuaternizar).

Según un modo preferido de realización de la invención,

- dicho péptido es la alanina
- n = 1
- W_1, W_2, W_3 y W_4 son independientemente H
- U es CZ4, preferiblemente CH
- V es N^+R, preferiblemente N^+CH3
- Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 son H

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 un compuesto de la fórmula (I) siguiente:



(I)

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 y V son N, N^+R, CZ_4, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico. Preferiblemente, si U es CZ_4, V es N o N^+R, si V es CZ_4, U es N o N^+R.
- siendo Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 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

La inoculación de los microorganismos se puede realizar mediante cualquier técnica de inoculación conocidas por el experto en la materia. Una etapa de incubación puede ser realizada 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, solo o en combinación, con al menos otra actividad enzimática.

Cuando dicho procedimiento es un procedimiento para detectar únicamente una variación de pH, Y_1 es H o un alquilo.

Cuando dicho procedimiento es un procedimiento para la detección en microorganismos de una actividad peptidasa, Y_1 es un péptido.

Cuando dicho procedimiento es un procedimiento para la detección en microorganismos de una actividad peptidasa y variación de pH, Y_1 es un péptido.

Según un modo preferido de realización de la invención, Y_1 es un péptido, seleccionado preferiblemente entre la glicina, la alanina, preferiblemente la alanina. 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 CZ_4, preferiblemente CH. Según un modo preferido de realización de la invención, V es N^+R, preferiblemente N^+CH3.

Según un modo preferido de realización de la invención, Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 son H.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho compuesto se selecciona entre cloruro de glicil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio, L-alanil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio TFA, cloruro de β-alanil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio, perclorato de L-alanil-4-(4'-amidoestiril)-piridina (sin cuaternizar).

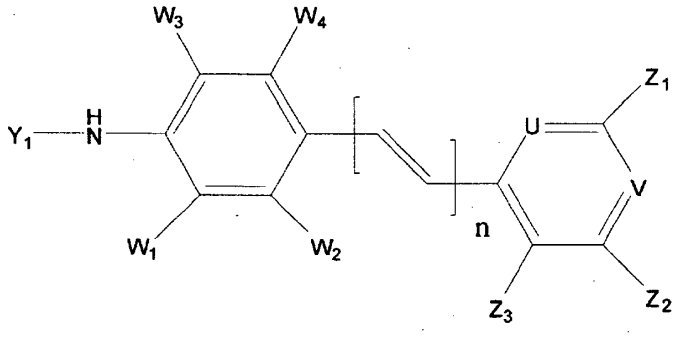
Según un modo preferido de realización de la invención,

- dicho péptido es la alanina
- n = 1
- W_1, W_2, W_3 y W_4 son independientemente H
- U es CZ4, preferiblemente CH
- V es N^+R, preferiblemente N^+CH3
- Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 son H

Preferiblemente, el microorganismo se selecciona entre *Escherichia coli, Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, 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 o que está constituido por las etapas siguientes:

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



(I)

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 y V son N, N^+R, CZ_4, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico. Preferiblemente, si U es CZ_4, V es N o N^+R; si V es CZ_4, U es N o N^+R.
- siendo Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4, 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

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, sola o en combinación con otras actividades enzimáticas. En algunos casos, puede ser ventajoso efectuar la etapa d) en presencia de un ácido, tal como el ácido acético.

Cuando dicho procedimiento es un procedimiento para detectar únicamente una variación de pH, Y_1 es H o un alquilo.

Cuando dicho procedimiento es un procedimiento para la detección en microorganismos de una actividad peptidasa, Y_1 es un péptido.

Cuando dicho procedimiento es un procedimiento para la detección en microorganismos de una actividad peptidasa y de una variación de pH, Y_1 es un péptido.

Según un modo preferido de realización, Y_1 es un péptido, preferiblemente seleccionado entre la glicina, la alanina, preferiblemente la alanina. Según un modo preferido de realización, n = 1.

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

Según un modo preferido de realización, U es CZ4, preferiblemente CH. Según un modo preferido de realización, V es N^+R, preferiblemente N^+CH3.

Según un modo preferido de realización, Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 son H.

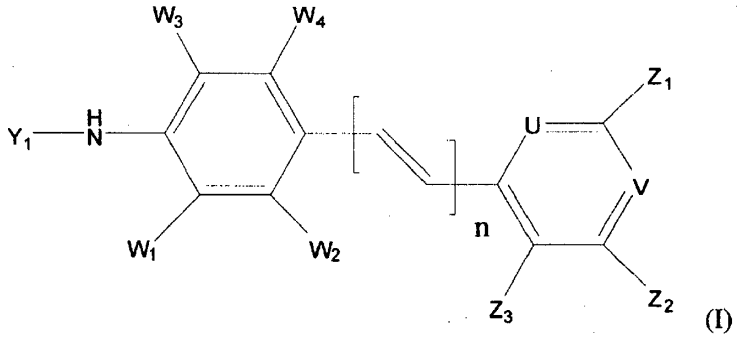
Según un modo preferido de realización de la invención, dicho compuesto se selecciona entre cloruro de glicil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio, L-alanil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio TFA, cloruro de β-alanil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio, perclorato de L-alanil-4-(4'-amidoestiril)-piridina (sin cuaternizar).

Según un modo preferido de realización de la invención,

- dicho péptido es la alanina
- n = 1
- W_1, W_2, W_3 y W_4 son independientemente H
- U es CZ4, preferiblemente CH
- V es N^+R, preferiblemente N^+CH3
- Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 son H

Preferiblemente, el microorganismo se selecciona entre *Escherichia coli, Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis.*

La invención se refiere asimismo a un medio de detección y/o de identificación de microorganismos que comprenden un compuesto de la fórmula (I) siguiente para detectar una actividad peptidasa y/o una variación pH:



(I)

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 y V son N, N^+R, CZ_4, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico. Preferiblemente, si U es CZ_4, V es N o N^+R; si V es CZ_4, U es N o N^+R.
- siendo Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4, 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 medio es un medio para detectar únicamente una sola variación de pH, Y_1 es H o un alquilo.

Cuando dicho medio es un medio para detectar una actividad peptidasa, y Y_1 es un péptido.

Cuando dicho medio es un medio para detectar una actividad peptidasa, y una variación de pH, Y_1 es un péptido.

Según un modo preferido de realización de la invención, Y_1 es un péptido, preferiblemente seleccionado entre la glicina, alanina, preferiblemente la analina.

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 CZ4, preferiblemente CH. Según un modo preferido de realización de la invención, V es N^+R, preferiblemente N^+CH3.

Según un modo preferido de realización de la invención, Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4, son H.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho compuesto se selecciona entre cloruro de glicil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio, L-alanil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio TFA, cloruro de β-alanil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio, perclorato de L-alanil-4-(4'-amidoestiril)-piridina (sin cuaternizar).

Según un modo preferido de realización de la invención,

- dicho péptido es la alanina
- n = 1
- W_1, W_2, W_3 y W_4 son independientemente H
- U es CZ4, preferiblemente CH
- V es N^+R, preferiblemente N^+CH3
- Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 son H

Preferiblemente, el microorganismo se selecciona entre *Escherichia coli, Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis.*

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.

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 β-Alanina con un sustrato de osidasa, tal como el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-glucósido, o el alizarin-β-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 aminopeptidasa 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)-piridina se preparó según el método de Royer (R. Royer, Journal of Chemical Society, 1947, 560-561).

La aminoacilación de estos compuestos a fin de obtener el 4-(4'-aminostiril)-arilo con otro aminoácido protegido se efectuó según el método de las anhidridas mezcladas:

Otro ejemplo de sustrato típico obtenido de manera similar a la mencionada antes:

Glicin-N-metil-4-(4'-aminoestiril)-piridinio diclorado.

RMN ^{1}H: (DMSO) δ 3,83 (2H, s, >C*H*$_2$), 4,25 (3H, s, NC*H*$_3$), 7,43 (1H, d, J=16 Hz, =C*H*-), 7,78 (4H, s, Ar-*H*), 7,99 (1H, d, J=16 Hz, =C*H*-), 8,18 (2H, d, J=5 Hz, Py-*H*), 8,28 (1H, broad s, >N*H*), 8,87 (2H, d, J=5 Hz, Py-*H*).

Ejemplo 2 – Utilización de sustratos de fórmula I según la invención para detectar una variación de pH

a) Indicador de pH

4,4'-aminoestiril-piridina se sintetizó como se describe en el ejemplo 1.

b) Preparación del medio

Composición	en g/l
Peptonas	6,25
NaCl	5
Lactosa	10
Sacarosa	10
4,4'-Aminoestiril-piridina	0,05
5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-ß-D-glucopiranosido	0,05
Agar	13

El medio siguiente se autoclava y después se reparte en caja de Petri de 90 mm de diámetro a razón de 20 ml por caja.

c) Inoculación e incubación

Siete cepas de microorganismos procedentes de la colección NCTC y que pertenecen a diferentes especies de bacterias son inoculadas sobre estos medios mediante aislamiento en cuadrante de 10 µl de una suspensión a 0,5 McFarland diluida al 20º. Los medios son incubados durante 24 horas a 37ºC, después se examinan las colonias formadas visualmente.

d) Lectura de los resultados

Los resultados obtenidos son presentados en la tabla 1.

Tabla 1: Color de las colonias en presencia del indicador de pH según la invención

Especie	**Número NCTC**	**Color de las colonias**
Citrobacter freundii	9750	Amarillo
Klebsiella pneumoniae	10 896	Verde
Enterobacter cloacae	11 936	Verde
Enterobacter aerogenes	10 102	Verde
Escherichia coli	12076	Amarillo
Morganella morganii	235	Incoloro
Shigella boydii	9 327	Incoloro

El medio según la invención permite distinguir potencialmente 4 grupos (3 entre las cepas ensayadas en este experimento) de microorganismos según que acidifican o no el medio por metabolismo de la lactosa y/o de la sacarosa: cambio al amarillo del indicador de pH y que hidrolizan o no el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glucopiranosido: coloración azul de las colonias. Las colonias que pertenecen a las especies *Klebsiella pneumniae, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes* que expresan las 2 actividades aparecen verdes (mezcla de amarillo y de azul), las de *Escherichia coli* y de *Citrobacter freundii* que acidifican el medio por etabolismo de la lactosa y/o de la sacarosa aparecen amarillas y las de *Morganella morganii* y de *Shigella boydii* que no expresan ninguna de las dos actividades aparecen incoloras.

Ejemplo 3 - Utilización de sustratos de fórmula I según la invención para detectar una actividad peptidasa

a) Sustrato de peptidasa

El cloruro de β-alanil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio (β-Ala-ASPM$^+$) se sintetizó como se describe en el ejemplo 1

b) Preparación del medio

Se disolvieron 40mg de cada uno de los sustratos en 4 ml de Dimetilsulfóxido (80mg para el Asn-ASQM$^+$) 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.

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

Los resultados obtenidos son presentados en la tabla 2

Tabla 2: Color de las colonias en presencia de sustratos de peptidasa según la invención

Especie	β-Ala-ASPM*		
Número de colección	Crec.	Col.	Fluo.
Escherichia coli NCTC 10 418	2	Verde	Amarillo pálido
Serratia marcescens NCTC 10 211	2	Naranja	Amarillo pálido
Pseudomonas aeruginosa NCTC 10 662	2	Naranja	Amarillo pálido
Yersinia enterocolitica NCTC 11 176	2	Verde pálido	
Salmonella typhimurium NCTC 74	1	Verde pálido	
Enterobacter cloacae NCTC 11 936	2	Verde	
Providencia rettgeri NCTC 7 475	2	Verde	
Bacillus subtilis NCTC 9 3 72	2	Verde pálido	
Enterococcus faecalis NCTC 775	2	Verde pálido	
Enterococcus faecium NCTC 7 171	2	Verde pálido	
Staphylococcus epidermidis NCTC 11 047	2	Verde	
Staphylococcus aureus NCTC 6 571	2	Verde	
Staphylococcus aureus NCTC 11 939	2	Verde	
Streptococcus pyogenes NCTC 8 306	1	Verde pálido	
histeria monocytogenes NCTC 11 994	2	Verde pálido	
Candida albicans ATCC 90 028	2	Verde pálido	
Candida glabrata NCPF 3 943	1	Verde pálido	

Crec.: crecimiento, Fluo.: fluorescencia de las colonias, Col.: color de las colonias, PdC: sin crecimiento, 0,5: crecimiento bajo, 1: crecimiento moderado, 2: buen crecimiento, -: sin color/fluorescencia

e) Conclusión

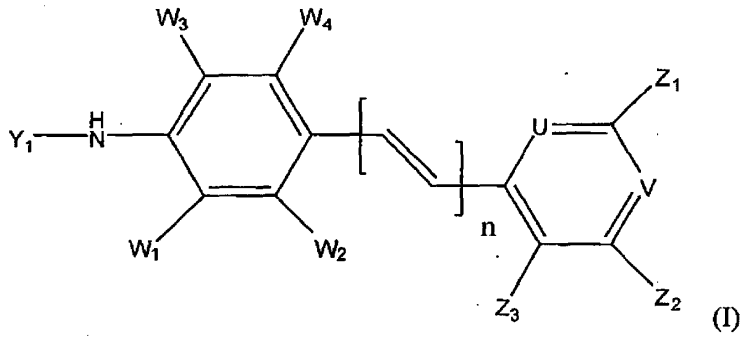
En los medios según la invención, es posible detectar unas actividades peptidasa de microorganismos gracias a la fluorescencia o a la coloración de las colonias.

El sutrato según la invención permite el crecimiento de cualquier tipo de microorganismos: bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, levaduras, etc.

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.

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:



(I)

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 y V son N, N^+R, CZ_4, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico
- siendo Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 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.

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 y la glicina.

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.

5. Utilización de un compuesto de fórmula I según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, según la cual U es CZ_4, preferiblemente CH.

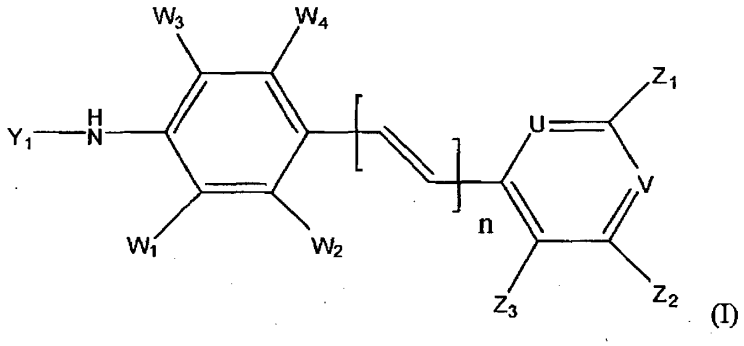
6. Utilización de un compuesto de fórmula I según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, según la cual V es N^+R, preferiblemente N^+CH3.

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

8. Utilización de un compuesto de fórmula I según la reivindicación 1, según la cual dicho compuesto se selecciona entre cloruro de glicil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio, L-alanil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio TFA, cloruro de β-alanil-4-(4'-amidoestiril)-N-metil-piridinio, perclorato de L-alanil-4-(4'-amidoestiril)-piridina (sin cuaternizar).

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:



(I)

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 y V son N, N^+R, CZ_4, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico

• siendo Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

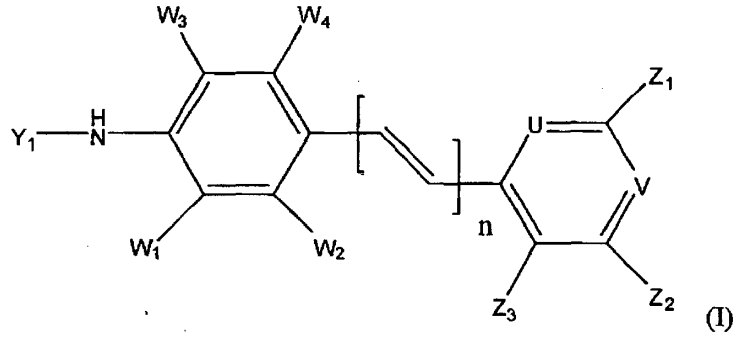
y sus sales.

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:



(I)

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 y V son N, N^+R, CZ_4, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico

• siendo Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 y Z_5 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.