

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 498**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2011** **E 11736084 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015** **EP 2596124**

54 Título: **Nuevos sustratos con fluorescencia reprimida, su preparación y su uso para la identificación, la detección y el análisis de Legionella pneumophila**

30 Prioridad:

21.07.2010 FR 1055970

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

28.10.2015

73 Titular/es:

PHARMALEADS (100.0%)

**11, Rue Watt
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**PORAS, HERVÉ;
OUIMET, TANJA y
FOURNIE-ZALUSKI, MARIE-CLAUDE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 549 498 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 con fluorescencia reprimida, su preparación y su uso para la identificación, la detección y el análisis de *Legionella pneumophila*.

La presente invención tiene por objeto un nuevo procedimiento de detección y de análisis de las legionelas de la especie *Legionella pneumophila* en todos los medios potencialmente contaminados por esta bacteria.

Las legionelas son unas bacterias acuáticas que se encuentran en las aguas naturales (lagos, ríos y pantanos) y que se desarrollan particularmente en las aguas templadas (entre 25 y 45°C). Estas bacterias son responsables en el hombre de infecciones respiratorias agudas, las legionelosis (enfermedad del legionario, fiebre de Pontiac) así como de anomalías biológicas extrapulmonares no específicas. A día de hoy, se han identificado aproximadamente 50 especies de *Legionella*. La especie *L. pneumophila* es la más extendida y la más virulenta para el hombre. Entre los 16 serogrupos de *L. pneumophila* (que representan del 90 al 95% de los casos clínicos), el serogrupo (SG) 1 es responsable del 84% de las infecciones humanas. La infección aparece después de la inhalación de aerosoles cargados en legionelas, que alcanzan los alvéolos pulmonares. Las bacterias se desarrollan entonces en los macrófagos alveolares y después en el tejido pulmonar. Las personas afectadas por esta enfermedad son en general personas mayores y/o que sufren de deficiencias inmunitarias graves.

La enfermedad del legionario se considera como una infección oportunista. En Francia, los datos procedentes de la declaración obligatoria informan de 1527 casos de legionelosis declarados en 2005, lo que representa una incidencia de 2 casos por 100000 habitantes contra una estimación de 8000 a 18000 casos de legionelosis cada año en los Estados Unidos.

Las legionelas colonizan naturalmente las redes de abastecimiento de agua. Están presentes en las aguas recalentadas de los sistemas de aire acondicionado, de las torres aerorrefrigerantes (TAR), en las redes de agua caliente sanitaria (calentadores de agua eléctricos) en las que se multiplican de manera óptima entre 30°C y 40°C. Pueden contaminar instalaciones como las piscinas, los equipamientos de estaciones termales, las fuentes y, en los hospitales, los humidificadores, los respiradores o los nebulizadores. En realidad, las legionelas se encuentran generalmente, en muy alta cantidad, en las biopelículas (Declerck *et al.*, *Curr. Microbiol.*, 2007, 55, 5, 435-440) asociadas a unos protozoarios (amebas), que, ingiriéndolos, permiten su crecimiento intracelular y su replicación. La detección de las legionelas está sometida a una reglamentación en las instalaciones de riesgo. Las normas actuales para la investigación y el recuento de las legionelas están basadas en el uso de técnicas de cultivo (norma internacional ISO 11731 y norma francesa AFNOR NF R90-431). Estas técnicas son muy sensibles, pero largas de realizar (de 10 a 15 días), delicadas ya que las legionelas tienen un porcentaje de crecimiento bajo y necesitan un personal cualificado para el establecimiento del diagnóstico.

Se han desarrollado unos enfoques alternativos durante estos últimos años:

1 - La técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR). Desde 2006, una norma experimental (XP T 90-47) encuadra este método que es rápido, sensible y específico. Sin embargo, no existe ninguna correlación estricta entre UFC y Unidad Genoma (UG) accesible por PCR, lo que plantea un problema. Por otro lado, esta técnica necesita un equipamiento de laboratorio particular, un personal cualificado y presenta un coste elevado.

2 - Las técnicas de detección por inmunocromatografía o inmunofluorescencia. Estos enfoques inmunológicos son metodológicamente más simples, pero necesitan unos anticuerpos de amplia especificidad frente a las especies buscadas y su sensibilidad varía mucho en función del método de detección utilizado. Estos enfoques requieren también un equipamiento y un personal adecuados y el precio de fabricación es elevado. Actualmente, estas técnicas no se utilizan rutinariamente.

3 - El método de hibridación *in situ* con detección fluorimétrica (FISH). Este método reciente (Declerck y Ollevier, *Methods Mol. Biol.*, 2006, 345, 175-183) es sensible y rápido, pero necesita, como los anteriores, un material específico de un coste elevado y un personal cualificado, lo que hace esta técnica marginal.

4 - La ATPmetría. Este método permite detectar la concentración de bacterias metabólicamente activas y representa un medio de alerta eficaz. Unos kits de ATPmetría están disponibles a bajo coste, pero no son específicos de las legionelas.

Ninguno de estos métodos es al mismo tiempo específico, sensible, rápido, utilizable sobre el terreno y de un precio de fabricación razonable.

Existe por lo tanto todavía una necesidad de un nuevo método de detección y de análisis de las legionelas que presenten todas las cualidades anteriormente definidas.

Los presentes inventores proponen tal método basándose en la medición de la actividad de una proteasa específica segregada por la bacteria.

A partir de 1979, se ha puesto en evidencia una proteasa segregada por diferentes cepas de *L. pneumophila* (Baine *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, 1979, 9, 3, 453-456). Presenta una actividad proteolítica sobre diferentes proteínas del suero (Müller, *Infect. Immun.*, 1980, 27, 51-53) así como sobre el colágeno, la caseína y la gelatina (Thompson *et al.*, *Infect. Immun.*, 1981, 34, 299-302). Es la proteína más abundante encontrada en los sobrenadantes de cultivo de *L. pneumophila*, de ahí su nombre *Major Secretory Protein*, Msp.

Finalmente, la Msp forma parte de numerosos factores de virulencia caracterizados en la familia *Legionella*: presenta unas acciones citotóxicas y hemolíticas (Dowling *et al.*, *Microbiological Reviews*, 1992, 56, 1, 32-60), en particular en la cobaya, provocando hemorragias y lesiones necróticas (Conlan *et al.*, *J. Gen. Microbiol.*, 1986, 132, 1565-1574, Rosenfeld *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1986, 37, 51-58). Es interesante señalar que estas propiedades citotóxicas y hemolíticas están directamente relacionadas con la actividad proteásica de la Msp. En efecto, la mutación del residuo Glu³⁷⁸ implicado en el acto catalítico, conduce a una proteasa inactiva y no citotóxica (Moffat *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 1994, 12, 693-705).

Un sustrato cromogénico, MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586), primitivamente desarrollado para la caracterización de la α -quimotripsina (Berdal *et al.*, *European Journal of Clinical Microbiology*, 1982, 1, 1, 7-11), se ha utilizado para detectar la Msp en diferentes cepas de legionelas (McIntyre *et al.*, *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 1991, 99, 4, 316-320), a pesar de la falta de selectividad de dicho sustrato. En 283 cepas ensayadas de *Legionella pneumophila*, 282 han degradado el sustrato. En 6 otras especies de legionelas, sólo 2 han respondido positivamente, así como algunas especies de *Pseudomonas aeruginosa* (22 sobre 40). Estos resultados preliminares muestran por lo tanto una relativa especificidad de la Msp de *L. pneumophila* con respecto a otros patógenos para el sustrato S-2586 que sigue siendo no obstante poco sensible y no suficientemente selectivo.

Teniendo en cuenta las importantes propiedades de la Msp, es decir la abundancia de su liberación en el medio acuoso, su relación con la patogenidad de la bacteria y su especificidad frente a proteínas segregadas por otros patógenos, los presentes inventores han utilizado la Msp como marcador de la presencia de *Legionella pneumophila* en diferentes redes de agua. Con este objetivo, se ha desarrollado un método de detección y de cuantificación específica, sensible y rápida de esta proteasa. Se ha establecido una correlación estadísticamente significativa entre la cantidad de Msp analizada y la cantidad de *Legionella pneumophila* presente en la muestra de agua analizada.

La Msp se purificó primitivamente a partir de sobrenadantes de cultivo de *Legionella pneumophila* (Dreyfus y Iglewski, *Infect. Immun.*, 1986, 51, 736-743): es una metalopeptidasa de zinc de 38 kDa, en su forma madura, de punto isoelectrico 4,20 y cuyo pH óptimo de funcionamiento está comprendido entre 5,5 y 7,5. El número de acceso de la Msp de *Legionella pneumophila* es P21347 en Swissprot/UniProtKB. La secuencia completa de la Msp de *Legionella pneumophila* está compuesta de 543 aminoácidos repartidos de la siguiente manera (residuos 1-24: péptido señal, residuos 25-207: secuencia "propéptido", residuos 208-543: metaloproteasa de zinc).

Presenta importantes homologías de secuencias con la pseudolisina (*Pseudomonas aeruginosa* elastase, Black *et al.*, *J. Bacteriol.*, 1990, 172, 2608-2613) así como con la Termolisina. Estas tres enzimas pertenecen a la familia M4 de las metalopeptidasas de zinc. Una alineación de las secuencias de la pseudolisina y de la Msp muestra una homología del 62,9% y permite verificar que la Msp posee las dos secuencias consenso de esta familia, a saber las secuencias ³⁷⁷HEVSH³⁸¹X₁₉⁴⁰¹ExxD⁴⁰⁵ en las que H³⁷⁷, H³⁹¹ y E⁴⁰¹ son unos ligandos del zinc y E³⁷⁸ está implicado en el acto catalítico.

La presente invención tiene por objeto proponer un nuevo ensayo de análisis que permita solventar los problemas mencionados anteriormente, que están relacionados con los ensayos existentes. En particular, dicho nuevo ensayo de análisis según la invención es específico, sensible, rápido, utilizable sobre el terreno y de un precio de fabricación razonable.

La presente invención se basa más particularmente en la utilización por los inventores de péptidos sustratos selectivos de la Msp que permiten detectar y analizar la actividad de la enzima. Dichos péptidos sustratos comprenden un fluoróforo fluo, es decir un aminoácido sintético que posee una fuerte capacidad de fluorescencia por la presencia de una cadena lateral fluorogénica. Ventajosamente, esta fluorescencia del resto Fluo es nula o sustancialmente reducida cuando un represor Rep está situado en la misma molécula cerca del fluoróforo Fluo. En consecuencia, la fluorescencia natural del fluoróforo Fluo puede manifestarse sólo a partir del momento en el que el resto Fluo no es ya sometido al efecto represor del resto Rep: por ejemplo cuando el péptido sustrato está escindido por la enzima, lo que conlleva la separación física de los restos Fluo y Rep.

La presente invención tiene por lo tanto como primer objeto un péptido sustrato selectivo de la Msp, con fórmula (I):



en la que,

- Fluo es un aminoácido- α de configuración (L), que posee en su cadena lateral un grupo fluorogénico,

- Rep es un aminoácido de configuración (L) seleccionado de entre la (3-NO₂)Tyr y la (4-NO₂)Phe, entendiéndose que cuando Fluo es la pirenilalanina, Rep es la (3-NO₂)Tyr,

- 5
- R es un grupo seleccionado de entre los grupos acetilo, succinilo y metoxisuccinilo,
 - X es un aminoácido- α de configuración (L) seleccionado de entre el grupo constituido por: Gly, Ser, homo-Ser, Lys, homo-Lys, Arg, homo-Arg y Orn,
- 10
- Z es un aminoácido- α cargado positivamente, y
 - n y m son dos números enteros naturales, con n comprendido entre 0 y 3 y m comprendido entre 0 y 2.

Se entiende por "aminoácido- α ", en el sentido de la presente invención, todos los aminoácidos- α naturales en forma L, sí como los aminoácidos- α no naturales. El término "aminoácidos- α naturales" representa, entre otros, los aminoácidos- α siguientes: la glicina (Gly), la alanina (Ala), la valina (Val), la leucina (Leu), la isoleucina (Ile), la serina (Ser), la treonina (Thr), la fenilalanina (Phe), la tirosina (Tyr), el triptofano (Trp), la cisteína (Cys), la metionina (Met), la prolina (Pro), el ácido aspártico (Asp), la asparagina (Asn), la glutamina (Gln), el ácido glutámico (Glu), la histidina (His), la arginina (Arg), y la lisina (Lys). Los aminoácidos- α no naturales, en el sentido de la invención, comprenden unos aminoácidos- α no proteogénicos, tales como la ornitina (Orn), la homolisina (*homo*-Lys), la homoarginina (*homo*-Arg), la alilglicina, la terc-leucina, el ácido 2-amino-adípico, el ácido 1-amino-1-ciclobutanocarboxílico, el ácido 1-amino-1-ciclohexanocarboxílico, el ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico, el ácido 2-aminobutanoico, el ácido 1-aminoindan-1-carboxílico, el ácido azetidin-2-carboxílico, el ácido (2S,4R)-4-bencil-pirrolidin-2-carboxílico, el γ -carboxiglutamato, la 2-ciclohexilalanina, la citrulina, la 5-hidroxisilina, el ácido 2,3-diamino-propiónico, el ácido hipúrico, la homociclohexilalanina, la homofenilalanina, la 3-hidroxiprolina, la 4-hidroxiprolina, la 3-metilhistidina, la 7-metilisina, el ácido indolina-2-carboxílico, la α -metil-alanina, la norleucina, la norvalina, el ácido octahidroindol-2-carboxílico, la fenilglicina, el ácido 4-fenil-pirrolidin-2-carboxílico, el ácido pipecólico, la propargilglicina, la 3-piridinilalanina, la 4-piridinilalanina, la sarcosina, el ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-1-carboxílico, o el ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico.

Los aminoácidos- α no naturales, en el sentido de la invención, comprenden también, por ejemplo, todos los aminoácidos- α naturales tales como se han definido anteriormente, en su forma D. Los aminoácidos- α no naturales según la invención comprenden también los aminoácidos- α naturales, tales como se han definido anteriormente, en los que dichos aminoácidos- α comprenden una cadena lateral modificada para incluir un grupo fluorogénico.

El término "cadena lateral de un aminoácido" representa el fragmento portado por el carbono α de un aminoácido. Por ejemplo, las cadenas laterales de aminoácidos naturales tales como la glicina, la valina, la alanina y el ácido aspártico corresponden al átomo de hidrógeno, a los grupos isopropilo, metilo y CH₂COOH respectivamente.

Por "grupo fluorogénico" se entiende, en el sentido de la presente invención, un grupo químico capaz de emitir una señal de fluorescencia después de una excitación a una longitud de onda que corresponde a su máximo de absorción.

Preferentemente, Fluo se selecciona de entre los siguientes aminoácidos: la (L)-(1-pirenil)-alanina, la (L)-N ϵ (retroAbz)-Lis, la (L)-(7-metoxicumarin-4-il)-alanina, la (L)-((6,7-dimetoxi-cumarin-4-il)-alanina, la (L)-N β (pirenilacetil)-Dap, la (L)-N γ (pirenilacetil)-Dab, la (L)-N δ -(pirenilacetil)-Orn, la (L)-N ϵ -(pirenilacetil)-Lis, la (L)-S-(1-pirenometil)-Cis, la (L)-O-(1-pirenometil)-Ser.

Preferentemente, el resto Rep es la (3-NO₂)Tyr.

En un aspecto preferido de la invención, Z es un aminoácido cargado positivamente de configuración (L). De manera aún más preferida, Z se selecciona de entre (L)-Lys, (L)-*homo*-Lys, (L)-Orn, (L)-Arg, (L)-*homo*-Arg.

Los péptidos están ventajosamente protegidos en las posiciones N-terminal por un grupo R = acetilo, succinilo o metoxisuccinilo, y en la posición C-terminal por una amida para evitar cualquier degradación no específica por unas amino- o carboxi-peptidasas, que podrían estar presentes en el medio.

De manera más preferida, la invención tiene por objeto un péptido sustrato seleccionado de entre el grupo que consiste en:

- Compuesto 1- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
 Compuesto 2- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Lys-NH₂
 Compuesto 3- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Lys-NH₂
 Compuesto 4- Ac-Ser-Arg-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
 Compuesto 5- Ac-Arg-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂

Compuesto 6- Ac-Ser-homo-Arg-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂

Compuesto 7- Ac-Ser-Orn-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂

Compuesto 8- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Orn-NH₂

Compuesto 9- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-homo-Lys-NH₂

5 Compuesto 10- Ac-homo-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Orn-NH₂

Compuesto 11- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Arg-NH₂

Compuesto 12- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-homo-Arg-NH₂, y

Compuesto 13- Ac-Ser-Lys-Gly-**(ε-Abz)Lys-(3-NO₂)Tyr**-Orn-NH₂.

10 De manera aún más preferida, la invención tiene por objeto un péptido sustrato seleccionado de entre el grupo constituido por los compuestos 1, 8 y 12 tales como se definen anteriormente.

La preparación de los péptidos sustratos según la invención concierne a las competencias del experto en la materia.

15 Los péptidos sustratos reivindicados se pueden obtener mediante métodos habituales de síntesis en fase sólida (véase por ejemplo Albericio, F. (2000). *b: A Practical Guide*, 1ª ed., CRC Press). Se puede así utilizar, por ejemplo, la estrategia Boc o la estrategia Fmoc, ambas bien conocidas por el experto en la materia.

20 Los grupos protectores utilizables para estas síntesis son unos grupos conocidos por el experto en la materia. Estos grupos protectores y su utilización están descritos en obras tales como por ejemplo Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, New York, 2007 4ª edición; Harrison *et al.* "Compendium of Synthetic Organic Methods", Vol. 1 a 8 (J. Wiley & sons, 1971 to 1996); Paul Lloyd-Williams, Fernando Albericio, Ernest Giralt, "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins", CRC Press, 1997 o Houben-Weyl, "Methods of Organic Chemistry, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics", Vol E 22a, Vol E 22b, Vol E 22c, Vol E 22d., M. Goodmann Ed., Georg Thieme Verlag, 2002. Según si estos grupos protectores están portados por un átomo de nitrógeno, serán designados como grupos N-protectores. Este es también el caso para los grupos S-protectores, O-protectores, etc. Por ejemplo, un hidroxilo puede estar protegido por un grupo tritilo o un ácido carboxílico puede estar protegido en forma de un éster terc-butílico. Si se realiza una síntesis sobre soporte sólido, es la resina la que sirve de grupo protector a la función carboxílica C-terminal.

30 En un aspecto preferido de la invención, la química utilizada corresponde a la tecnología Fmoc y la protección de las cadenas laterales que permiten su escisión por el ácido trifluoroacético (TFA), tal como se describe en «*Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach* W.C. Chan y P.D. White Eds. Oxford University Press, 2004».

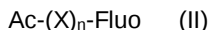
35 La reacción de acilación para conducir a los compuestos de fórmula (I) se puede realizar en las condiciones habituales conocidas por el experto en la materia.

40 Según un aspecto más particularmente preferido de la invención, el experto en la materia utiliza la estrategia Fmoc sobre una resina parametilbenzhidrilamina (pMBHA), con la mezcla O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluoro-fosfato (HBTU)/hidroxibenzotriazol (HOBt)/N,N-diisopropiletilamina (DIEA) como agente de acoplamiento. La desprotección de las cadenas laterales se obtiene por acción de una mezcla ácido trifluoroacético (TFA)/triisopropilsilano (TIPS)/H₂O.

45 Los péptidos son purificados por cromatografía en fase líquida de alto rendimiento (HPLC). La identidad de los péptidos se puede confirmar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia tal como, por ejemplo, la espectrometría de masa electrospray.

La fluorescencia intrínseca de los péptidos sustratos de la fórmula (I) es muy baja, debido a la proximidad espacial entre el fluoróforo y el resto represor Rep.

50 La aparición de una fluorescencia intensa en presencia de Msp está relacionada con la generación, tras una escisión enzimática, de un metabolito con la fórmula general (II)



55 en la que Ac, X y n y Fluo tienen las mismas definiciones que anteriormente.

60 Los péptidos sustratos de la invención, tales como se definen en la fórmula (I), son altamente específicos de la Msp. En efecto, dichos péptidos de la fórmula (I) no están escindidos por otras metaloenzimas tales como la pseudolisina, la neprilisina, la ACE, la ECE, etc. Por el contrario, la presencia de uno o varios aminoácidos entre el resto Fluo y el resto Rep conduce a sustratos que han perdido su selectividad. Son entonces reconocidos por otras peptidasas como la pseudolisina.

65 La naturaleza de los aminoácidos en la posición X o Z de la fórmula (I) influye también fuertemente en la especificidad de la proteasa. En efecto, la presencia en una u otra de estas posiciones de un aminoácido hidrófobo, tal como la norleucina, conduce a un compuesto que no está escindido por la Msp.

Por otra parte, la elección del resto Rep es crucial. Un aminoácido más voluminoso que la (3-NO₂)-Tyr o que la (4-NO₂)Phe, tal como la 3,5-dinitro-tirosina o la DNP-lisina, conduce a compuestos que no son sustratos, pero que pueden ser, eventualmente, inhibidores de la Msp. Además, la exaltación de fluorescencia observada después de la escisión de los sustratos que contienen el par pirenilalanina/(3-NO₂)-Tyr es aproximadamente 2 veces más importante que con los sustratos que contienen el par pirenilalanina/(4-NO₂)Phe.

La especificidad de los péptidos de la fórmula (I) para la Msp permite poder afirmar que cualquier escisión de un péptido de la fórmula (I) se debe únicamente a la acción de la Msp. Esta escisión se traduce por la emisión de fluorescencia, causada por la separación física del resto Fluo y del resto Rep. El análisis por HPLC de la reacción muestra que sólo hay dos metabolitos, por lo tanto un solo sitio de escisión y la aparición de la fluorescencia demuestra que la escisión se sitúa, como se espera, entre el fluoróforo y el represor de fluorescencia.

La invención tiene también por lo tanto como segundo objeto un procedimiento de detección de la actividad proteasa de la Msp en una muestra de una solución.

Se entiende por "solución" según la presente invención cualquier solución en la que se sospecha la presencia de Msp. Como Msp es una proteína segregada, la solución según la invención comprende así cualquier medio susceptible de contener unas *Legionella pneumophila*. Esto incluye por lo tanto también los cultivos líquidos de *Legionella pneumophila* realizados en laboratorio, como las aguas calientes sanitarias o las aguas de torres aerodosisfarrigerantes, o también los lagos, los ríos, las lagunas, los estanques y cualquier otra fuente de agua natural o artificial. Una solución en el sentido de la invención puede también comprender la proteína Msp en forma parcial o totalmente purificada. Tales soluciones se pueden obtener en laboratorio durante etapas de purificación (un ejemplo de purificación que permite obtener tal solución de Msp purificada se indica en los ejemplos experimentales). En este ámbito, la detección de la actividad proteásica de Msp puede, por ejemplo, permitir seguir la purificación de la proteína.

El procedimiento de detección de la actividad proteasa de la Msp en una muestra de una solución según la invención comprende las etapas siguientes:

- a) puesta en contacto de dicha muestra con un compuesto de la fórmula (I) tal como se define anteriormente, y
- b) detección de una emisión de fluorescencia.

La etapa a) del procedimiento de la invención se puede realizar en un amplio intervalo de temperaturas. Ventajosamente, dicha temperatura está comprendida entre 20°C y 55°C; preferentemente, está comprendida entre 25°C y 45°C; más preferentemente, está comprendida entre 30°C y 40°C; aún más preferentemente, está comprendida entre 35°C y 38°C. Según el modo de realización más preferido de la invención, es igual a 37°C.

Una molécula fluorescente posee la propiedad de absorber energía a una longitud de onda de excitación definida y restituirla rápidamente en forma de señal fluorescente, a una longitud de onda de emisión definida. La emisión de fluorescencia de la etapa b) del procedimiento es detectada a una longitud de onda de emisión específica que depende del grupo fluorigénico portado por el resto Fluo. La adaptación de dicha longitud de onda de emisión en función de dicho grupo fluorigénico pertenece a las capacidades del experto en la materia. Este, por ejemplo, sabe que el espectro de emisión de la pirenilalanina presenta dos máximas a 377 nm y 397 nm. Puede así utilizar varias longitudes de ondas alrededor de estos valores para medir la emisión de fluorescencia cuando el resto Fluo comprende una pirenilalanina. Ventajosamente, la longitud de onda de emisión está comprendida entre 365 y 405 nm para la pirenilalanina. Preferentemente, dicha longitud de onda está comprendida entre 370 y 400 nm. Aún más preferentemente, es igual a 377 nm. La longitud de onda de emisión es ventajosamente de 410 nm para el aminobenzoil y 420 nm para los derivados metoxicumarinilos.

Al igual que la longitud de onda de emisión, la longitud de onda de excitación es específica del grupo fluorigénico portado por el resto Fluo. De nuevo, el experto en la materia es perfectamente capaz de adaptar la longitud de onda de excitación a dicho grupo fluorigénico. Ventajosamente, la longitud de onda de excitación es de 340 nm para la pirenilalanina, 310 nm para el aminobenzoil y 335 nm para los derivados metoxicumarinilos.

La emisión de fluorescencia producida por la escisión de un péptido de la invención por la Msp puede ser detectada con la ayuda de cualquier medio conocido por el experto en la materia, como sea conveniente para ese efecto. Se mencionarán en particular entre dichos medios los fluorímetros. Existen numerosos tipos de fluorímetros y el experto en la materia sabrá identificar los modelos que son más convenientes en función de sus necesidades. Se utilizará de manera preferida un espectrofluorímetro, el cual es utilizable sobre toda la gama de longitudes de ondas (200-800 nm) tanto en excitación como en emisión. El fluorímetro posee la ventaja de poder medir la intensidad de la fluorescencia emitida. De manera ventajosa, la medición de la fluorescencia se repite a intervalos regulares o no a lo largo del tiempo, a fin de determinar por ejemplo los parámetros cinéticos de la reacción de escisión. Aún más ventajosamente, la reacción de escisión se continúa de manera continua a lo largo del tiempo.

Los inventores han mostrado así que la respuesta fluorimétrica varía de manera lineal en función de la concentración en proteasa. Por lo tanto, es posible, a partir de un valor de fluorescencia, deducir fácilmente a qué concentración de Msp corresponde dicho valor de fluorescencia. Se puede, por ejemplo, según una técnica bien conocida por el experto en la materia, establecer un intervalo estándar con cantidades conocidas de Msp para determinar la cantidad de Msp presente en la muestra.

La presente invención tiene por lo tanto como tercer objeto un procedimiento de análisis de la Msp en una muestra de una solución que comprende las etapas siguientes:

- a) detectar la actividad proteasa de la Msp según el procedimiento descrito anteriormente,
- b) medir la emisión de fluorescencia, y
- c) deducir del valor de la emisión de fluorescencia la cantidad de Msp presente en la muestra.

Pueden existir casos en los que la cantidad de Msp a detectar es muy baja. En otros casos, la solución que contiene Msp puede también contener unos compuestos que inhiben la actividad proteásica de Msp. En estas condiciones, puede ser ventajoso concentrar la enzima antes de medir la actividad de la enzima para incrementar la sensibilidad del ensayo. Se puede así filtrar y concentrar la muestra, por ejemplo pasando dicha muestra sobre un filtro Centricon. Preferentemente, esta etapa de concentración permitirá eliminar todas las moléculas cuyo peso molecular es inferior o igual a 25 kDa. Se puede proceder asimismo a un enriquecimiento selectivo de proteína Msp, por ejemplo utilizando un anticuerpo anti-Msp que no afecta a la actividad catalítica de esta proteasa (en una columna de afinidad o en una reacción de inmunoprecipitación) o una columna de inhibidor. El enriquecimiento puede también ser no selectivo, por ejemplo por concentración sobre bolas magnéticas. El procedimiento de análisis de la Msp según la invención puede comprender por lo tanto una etapa suplementaria de concentración de la enzima. Ventajosamente, esta etapa se realiza antes de la etapa a).

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de análisis de *Legionella pneumophila* en una muestra de una solución. En efecto, los inventores han demostrado que existía una relación lineal entre la cantidad de Msp detectada y la cantidad de *Legionella pneumophila* presente en esta misma muestra.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de análisis de las *Legionella pneumophila* en una muestra de una solución, que comprende las etapas siguientes:

- a) analizar la Msp en dicha muestra según el procedimiento descrito anteriormente, y
- b) deducir la cantidad de *Legionella pneumophila*.

Los compuestos de la fórmula (I) son especialmente útiles para identificar, detectar y analizar la presencia de *Legionella pneumophila* en redes de agua caliente sanitaria o de TAR.

Se ensayaron diferentes aguas de TAR más o menos contaminadas por *L. pneumophila* con el objetivo de determinar la presencia de Msp mediante el análisis fluorimétrico desarrollado en la reivindicación anterior. Entre todos los ensayos efectuados, no se observó ningún falso positivo y la presencia de Msp se detectó en aguas cuya contaminación era baja (inferior a 1000 UG/I).

La presente invención propone también unos kits para la detección y el análisis de *Legionella pneumophila*, conteniendo dicho kit por lo menos un péptido de fórmula (I) tal como se describe anteriormente. Además, dicho kit comprende ventajosamente los reactivos necesarios para la medición de la actividad enzimática. Los kits según la invención son utilizables en laboratorio o sobre el terreno.

Las figuras y ejemplos siguientes se presentan a título ilustrativo y no limitativo de la presente invención

Leyenda de las figuras

Figura 1

Especificidad del sustrato fluorogénico frente a Msp: Escisión comparativa del compuesto 8 (10 μ M) por 10 ng/ml de Msp y de pseudolisina, pepsina, papaína, neprilisina (NEP), enzima de conversión de la endotelina-1 (ECE-1) y 2 (ECE-2), la proteasa de VIH (VIH P.) así como por la tripsina. Los deltas de fluorescencia (U.A.) se representan después de 300 minutos de incubación a 37°C en 50 mM HEPES pH 7.

Figura 2

Comparación de la degradación del compuesto 1 y de 2 compuestos EF y EL de fórmula respectiva $\text{Ac-(X)}_n\text{-Pya-EF-(3-NO}_2\text{)Tyr-(Gly)}_m\text{-Z-NH}_2$ y $\text{Ac-(X)}_n\text{-Pya-EL-(3-NO}_2\text{)Tyr-(Gly)}_m\text{-Z-NH}_2$ por la Msp y la pseudolisina. Los sustratos (10

μM) son incubados durante 120 minutos a 37°C con 10 ng/ml de Msp purificada o de pseudolisina en 50 mM HEPES pH 7.

Figura 3

Comparación de la degradación del compuesto 1 y de los compuestos Nop de fórmula $Ac-(X)_n-Pya-(NO_2)Phe-(Gly)_m-Z-NH_2$ y 3,5- NO_2 Tyr de la fórmula $Ac-(X)_n-Pya-(3, 5-(NO_2)_2)Tyr-(Gly)_m-Z-NH_2$ por la Msp. Los sustratos (10 μM) son incubados durante 300 minutos a 37°C con 2 ng/ml de Msp purificada en 50 mM HEPES pH 7.

Figura 4

Comparación de la degradación (evolución de la fluorescencia) en función del tiempo del compuesto 1 y del compuesto Nle de la fórmula $Ac-S-Nle-G-Pya-(3-NO_2)Tyr-(Gly)_m-Z-NH_2$ por la Msp. Los sustratos (10 μM) son incubados durante 240 minutos a 37°C con 10 ng/ml de Msp purificada en 50 mM HEPES pH 7. Las lecturas se efectúan con Berthold LS970B a $\lambda_{ex} = 340nm$, $\lambda_{em} = 405 nm$ y la energía de la lámpara a 10000.

Figura 5

Espectro de emisión de fluorescencia del compuesto 1 (c: 100 μM) (en triángulo) y de su metabolito fluorescente (c: 1 μM) (en cuadrado).

Los péptidos están en solución en el tampón HEPES 50 mM pH 7.

En las abscisas: las longitudes de onda expresadas en nm. En las ordenadas: la intensidad de fluorescencia expresada en unidad arbitraria de fluorescencia (AU).

El espectro se registra en un aparato Perkin Elmer LS50B. ($\lambda_{ex} = 343 nm$, ranura de excitación: 15, ranura de emisión: 2,5).

Relación de las intensidades de fluorescencia a 377 nm: $I(\text{metabolito})/I(\text{sustrato}) = 20000$.

Figura 6

Detección de la Msp en el tampón HEPES 50 mM pH 7.

6a) Evolución de la fluorescencia (expresada en Δ de fluorescencia) en función del tiempo (min.). El ensayo se realiza en microplaca de 96 pocillos a 37°C, en un volumen final de 100 μl, en presencia de una concentración en compuesto 1 de 10 μM y de concentraciones en Msp que varían de 0,1 a 30 ng/ml.

6b) Linealización de la variación de fluorescencia en función de la concentración en Msp (pg en 100 μl) que varía de 0,1 a 10 ng/ml después de una incubación de 90 minutos. Unos resultados análogos son obtenidos a 30, 60 y 120 minutos.

Figura 7

7a) relación entre la cantidad de Msp presente en un sobrenadante de cultivo (reflejada por la variación de fluorescencia del compuesto 1) y la cantidad de *Legionella pneumophila* enumerada en un medio de cultivo. El ensayo se realiza en microplaca a 37°C, en un volumen final de 100 μl, en presencia de una concentración en compuesto 1 de 10 μM y de diluciones seriadas de un sobrenadante de cultivo de 1/1000 a 1/20000.

7b) Linealización de la variación de fluorescencia en función del recuento (UFC/ml) en *Legionella pneumophila* después de una incubación de 90 minutos. El recuento se efectuó según el protocolo de la norma AFNOR BF R90-431.

Figura 8

8a) Variación de fluorescencia inducida por escisión de los compuestos 1, 8 y 12 por la Msp purificada en función del tiempo.

El ensayo se realiza en el tampón HEPES 50 mM pH 7 con una concentración en sustrato de 10 μM y una concentración en Msp de 10 ng/ml. Las lecturas se efectúan con Berthold LS970B a $\lambda_{ex} = 340 nm$, $\lambda_{em} = 405 nm$ y la energía de la lámpara a 10000.

8b) Determinación de los parámetros cinéticos del compuesto 1.

Variación de la velocidad de degradación por la Msp (2 ng/ml) después de una incubación de 30 minutos a 37°C en función de la concentración del compuesto 1 (μM).

- 5 El ensayo se realiza en el tampón HEPES 50 mM pH 7 con una concentración en sustrato de 10 μM y una concentración en Msp de 10 ng/ml. Las lecturas se efectúan con Berthold LS970B a $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$ y la energía de la lámpara a 10000.

Ejemplo 1: Preparación de los sustratos

- 10 Los péptidos sustratos (I) y sus metabolitos fluorescentes (II) se preparan en fase sólida en un sintetizador automático utilizando la estrategia Fmoc y el protocolo clásico de acoplamiento HBTU/HOBt/DIEA sobre una resina MBHA para los sustratos y sobre una resina HMP para los metabolitos fluorescentes. Las cadenas laterales funcionalizadas están protegidas en forma de éteres de t-butilo (Ser o homo-Ser), de Pmc (Arg, homo-Arg) o de Boc (Lys, homo-Lys, Orn) como se describe en "*Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach*. W.C.Chan y P.D. White Eds. Oxford University Press, 2004".

- 15 Los acoplamientos se efectúan en N-metil-pirrolidona (NMP) con 10 equivalentes de aminoácidos. El fluoróforo se introduce por acoplamiento en una jeringa en presencia de BOP/DIEA. El aminoácido N-terminal se introduce directamente en forma de derivado N-acetilado. La desprotección de las cadenas laterales se obtiene en 2h por acción de una mezcla TFA/TIPS/H₂O: (95/2,5/2,5) a temperatura ambiente.

- 20 Los péptidos son purificados por HPLC semipreparativa en un aparato Water 600 equipado de un detector UV 2487, en una columna ACE C18 100Å, 5 μm, 250 x 20 mm o Atlantis T3, 3,5 μm, 100 x 20 mm con, como sistema de elución, una mezcla CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) en proporción variable. Su pureza se verifica en HPLC analítica, sobre una columna ACE 100Å, 5 μm, o Atlantis T3, 3,5 μm, 100 x 4,6 mm sobre una HPLC Shimadzu Prominence con un espectrómetro UV para la detección.

- 25 Los péptidos son analizados por espectrometría de masa por Electrospray en modo positivo en una LCMS Agilent 1200 detección simple Quad.

Los ejemplos siguientes ilustran la presente solicitud, sin limitarla:

- 35 **Compuesto 1-** Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
HPLC ACE 100Å, 5 μm, C18 250 x 4,6mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 10 a 90 en 30 min; Rt: 13,69 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 527,4

- 40 **Compuesto 2-** Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Lys-NH₂
HPLC ACE 100Å, 5 μm, C18 250 x 4,6mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 10 a 90 en 30 min; Rt: 13,09 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 498,9

- 45 **Compuesto 3-** Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Lys-NH₂
HPLC ACE 100Å, 5 μm, C18 250 x 4,6mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 30/70; Rt: 12,87 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 470,3

- 50 **Compuesto 4-** Ac-Ser-Arg-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
HPLC ACE 100Å, 5 μm, C18 250 x 4,6mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 0 a 30% en 20 min puis 30% 10 min; Rt: 29,83 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 541,4

- 55 **Compuesto 5-** Ac-Arg-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
HPLC Atlantis T3, 3,5 μm, 100 x 4,6mm CH₃CN (0,1% TFA)/H₂O (0,1% TFA) 28/72; Rt: 15,40 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 497,8

- 60 **Compuesto 6-** Ac-Ser-homo-Arg-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
HPLC Atlantis T3, 3,5 μm, 100 x 4,6mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 30/70; Rt: 13,21 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 548,5

- 65 **Compuesto 7-** Ac-Ser-Orn-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂

HPLC ACE 100Å, 5 µm, C18 250 x 4,6mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 25/75%; Rt: 41,62 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 520,5

Compuesto **8**- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Orn-NH₂

HPLC Atlantis T3, 3,5 µm, 100 x 4,6 mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 10 a 90% en 15 min; Rt: 9,02 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 477,8

Compuesto **9**-Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-homo-Lys-NH₂

HPLC Atlantis T3, 3,5 µm, 100 x 4,6 mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 10 a 90% en 15 min; Rt: 8,97 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 463,5

Compuesto **10** -Ac-homo-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Orn-NH₂

HPLC ACE 100Å, 5 µm, C18 250 x 4,6 mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 30/70; Rt: 13,70 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 470,5

Compuesto **11** -Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Arg-NH₂

HPLC ACE 100Å, 5 µm, C18 250 x 4,6 mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 30/70; Rt: 10,28 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 484,0

Compuesto **12** -Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-homo-Arg-NH₂

HPLC ACE 100Å, 5 µm, C18 250 x 4,6 mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 30/70; Rt: 11,25 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 491,5

Compuesto **13** -Ac-Ser-Lys-Gly-(**ε-Abz**)**Lys-(3-NO₂)Tyr**-Orn-NH₂

Atlantis T3, 3,5 µm, 100 x 4,6 mm CH₃CN (0,1% TFA)/ H₂O (0,1% TFA) 15/85; Rt: 7,24 min. Masa ESI(+): [(M+2H)/2]⁺ = 451,6

Ejemplo 2 Comparación de la fluorescencia emitida por los sustratos y sus metabolitos fluorescentes.

Las longitudes de onda de excitación de los sustratos anteriores son:

λ_{ex} = 340 nm cuando el fluoróforo es una pirenilalanina, λ_{ex} = 310 nm para un grupo aminobenzoil y λ_{ex} = 335 nm para los derivados metoxicumarinilos.

Los diferentes sustratos y sus metabolitos fluorescentes se ponen en solución en el tampón HEPES 50 mM, pH 7,0 a las concentraciones respectivas de 10⁻⁴ M y 10⁻⁶ M. Los espectros de fluorescencia se registran con un fluorímetro Perkin Elmer LS50B. Para los compuestos de 1 a 12, que contienen Pya como fluoróforo, los espectros de emisión obtenidos, después de la excitación a 343 nm, muestran dos máximas a 377 y 397 nm (figura 5), que permiten lecturas a varias longitudes de ondas alrededor de estos valores y λ_{em} = 410 nm para el aminobenzoil (compuesto 13); λ_{em} = 420 para Mca.

Ejemplo 3 Purificación de la Msp

La Msp se purifica a partir de sobrenadantes de caldos de cultivo de 3 litros de *Legionella pneumophila* que proviene de la cepa Paris según un protocolo basado en los datos iniciales de Dreyfus y Iglewski, Infect. Immun., 1986, 51, 736-743.

El sobrenadante de cultivo se precipita en primer lugar con sulfato de amonio al 65% durante la noche a 4°C. Después de la centrifugación (10000 rpm, 60 minutos a 4°C), el residuo se recoge en aproximadamente 200 ml de tampón de equilibración (25 mM Tris pH 7,8, 25 mM NaCl, 0,01% triton X 100) y se dializa a 4°C durante una noche. El precipitado dializado se carga después en una columna DEAE FF 16/10 (HiPrep, GE Healthcare) con la ayuda de un purificador Akta (GE Healthcare). Las proteínas retenidas en la columna se eluyen sobre tres niveles de concentración del tampón de elución, el primero al 15% de tampón B (25 mM Tris pH 7,8, 1 M NaCl, 0,01% triton X 100), el segundo al 60% y el último al 100%. La actividad enzimática correspondiente a la Msp se ensaya en cada fracción del segundo nivel con la ayuda de un sustrato fluorescente. Las fracciones que contienen la actividad enzimática son asimismo analizadas en SDS PAGE 10% (BioRad) en condiciones no desnaturizantes, y los geles coloreados con nitratos de plata (Sigma). Las fracciones que contienen la actividad enzimática Msp se reúnen, se lavan con el tampón de equilibración de la segunda etapa de purificación, 50 mM Tris pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,01% triton X 100 y se concentran en Centricon YM10 (Amicon). El "pool" concentrado así obtenido se carga después en una columna HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE Healthcare) y las proteínas se eluyen con el tampón de equilibración a

un caudal de 0,25 ml/min. Las fracciones que contienen la Msp se reúnen y concentran después de la medición de la actividad enzimática y la electroforesis de las fracciones. La pureza de la preparación obtenida se verifica sobre gel de electroforesis. Si es necesario, esta preparación puede ser sometida a una tercera etapa de purificación sobre una columna de gel de filtración Superdex 10/300.

Ejemplo 4 Análisis de la Msp por el sustrato fluorigénico

El análisis se efectúa en una preparación de proteasa purificada.

El ensayo se efectúa en microplaca de 96 pocillos bajo un volumen fino de 100 µl en el tampón HEPES 50 mM pH 7,0 a 37°C. La Msp se utiliza a 10 ng/ml y el sustrato está a una concentración final de 10 µM. La variación de fluorescencia se sigue en continuo en función del tiempo en un lector de microplacas Twinkle LB 970 (Berthold) que posee unos filtros con bandas pasantes de ± 15 nm. Para los sustratos de 1 a 12, que poseen la pirenalanina como fluoróforo, las longitudes de onda de excitación y de emisión son respectivamente $\lambda_{ex} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 405$ nm.

A título de ejemplo, la variación de fluorescencia obtenida en las condiciones indicadas anteriormente con los sustratos 1, 8 y 12 se presenta en la figura 8a.

Los parámetros cinéticos del sustrato 1 frente a Msp son (figura 8b):

$$K_m = 6,8 \pm 0,6 \mu M \quad k_{cat} = 23,9 \pm 0,7 s^{-1}$$

La sensibilidad del sustrato 1 se estableció midiendo la fluorescencia emitida, en función del tiempo, por hidrólisis de una concentración dada del sustrato (10 µM) por unas cantidades cada vez más bajas de Msp.

Ejemplo 5 Relación entre la cantidad de Msp detectada en los sobrenadantes de cultivo y la cantidad de *Legionella pneumophila* calculada en estos mismos cultivos.

El ensayo se efectuó en microplacas de 96 pocillos bajo un volumen final de 100 µl en el tampón HEPES 50 mM pH 7,0 a 37°C. La Msp se utiliza a 10 ng/ml y el sustrato está a una concentración final de 10 µM.

Una primera correlación se establece entre la cantidad de Msp presente en una muestra y la intensidad de la fluorescencia emitida para una cantidad determinada de sustrato a diferentes tiempos (Figura 7).

Era después importante verificar que existía una correlación entre la cantidad de Msp liberada en un medio de cultivo y la cantidad de *Legionella pneumophila* en este mismo medio.

Estas cuantificaciones se establecieron a partir de diferentes medios de cultivo cuya enumeración se ha efectuado según el protocolo de la norma AFNOR NF R90-431 y la Msp cuantificada a partir del análisis fluorimétrico descrito en la reivindicación anterior. Se observa en fase estacionaria de crecimiento una correlación lineal entre la cantidad de legionelas presentes y la cantidad de Msp liberada en el medio (figuras 7a y 7b).

Listado de secuencias

<110> PHARMALEADS

<120> NUEVOS SUSTRATOS A FLUORESCENCIA REPRIMIDA, SU PREPARACIÓN Y SU UTILIZACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN, LA DETECCIÓN Y LA DETERMINACIÓN DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

<130> 358686D28772

<150> FR 1055970

<151> 2010-07-21

<160> 13

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> sustrato péptido

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 5 <223> ACETILACIÓN

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 10 <223> X sustituye la Pirenilalanina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 15 <223> (3 NO2) Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 20 <223> AMIDACIÓN

<400> 1
 Ser Lys Gly Xaa Tyr Gly Gly Lys
 1 5

25 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> sustrato péptido

<220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

<220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (4)..(4)
 <223> X sustituye la Pirenilalanina

<220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (5)..(5)
 <223> (3 NO2) Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (7)..(7)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 2
 Ser Lys Gly Xaa Tyr Gly Lys
 1 5

55 <210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

60 <220>
 <223> sustrato péptido

<220>

	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> ACETILACIÓN
5	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (4)..(4)
	<223> X sustituye la Pirenilalanina
10	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (5)..(5)
	<223> (3 NO2) Tyr
15	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (6)..(6)
	<223> AMIDACIÓN
20	<400> 3
	Ser Lys Gly Xaa Tyr Lys
	1 5
	<210> 4
	<211> 8
25	<212> PRT
	<213> artificial
	<220>
	<223> sustrato péptido
30	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> ACETILACIÓN
35	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (4)..(4)
	<223> X sustituye la Pirenilalanina
40	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (5)..(5)
	<223> (3 NO2) Tyr
45	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (8)..(8)
	<223> AMIDACIÓN
50	<400> 4
	Ser Arg Gly Xaa Tyr Gly Gly Lys
	1 5
	<210> 5
	<211> 7
55	<212> PRT
	<213> artificial
	<220>
60	<223> sustrato péptido
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (3)..(3)
 <223> X sustituye la Pirenilalanina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (4)..(4)
 <223> (3 NO2) Tyr
 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (7)..(7)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 5
 Arg Gly Xaa Tyr Gly Gly Lys
 1 5
 20 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> sustrato péptido
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> homo Arg
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X sustituye la Pirenilalanina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> (3 NO2) Tyr
 <220>
 50 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 6
 Ser Arg Gly Xaa Tyr Gly Gly Lys
 55 1 5
 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 60 <213> artificial
 <220>
 <223> sustrato péptido

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> X sustituye la Ornitina
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X sustituye la Pirenilalanina
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> (3 NO2) Tyr
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> AMIDACIÓN
 25
 <400> 7
 Ser Xaa Gly Xaa Tyr Gly Gly Lys
 1 5
 30
 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial
 35
 <220>
 <223> sustrato péptido
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X sustituye la Pirenilalanina
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> (3 NO2) Tyr
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> X sustituye la Ornitina
 60
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 8
 Ser Lys Gly Xaa Tyr Xaa
 1 5

<210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> sustrato péptido
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X sustituye la Pirenilalanina
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> (3 NO2) Tyr
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> homo Lisina
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 9
 Ser Lys Gly Xaa Tyr Lys
 35 1 5
 <210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> sustrato péptido
 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> homo Serina
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X sustituye la Pirenilalanina
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> (3 NO2) Tyr
 <220>
 65

	<221> misc_feature
	<222> (6)..(6)
	<223> X sustituye la Ornitina
5	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (6)..(6)
	<223> AMIDACIÓN
10	<400> 10
	Ser Lys Gly Xaa Tyr Xaa
	1 5
	<210> 11
	<211> 6
15	<212> PRT
	<213> artificial
	<220>
	<223> sustrato péptido
20	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> ACETILACIÓN
25	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (4)..(4)
	<223> X sustituye la Pirenilalanina
30	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (5)..(5)
	<223> (3 NO2) Tyr
35	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (6)..(6)
	<223> X sustituye la Ornitina
40	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (6)..(6)
	<223> AMIDACIÓN
45	<400> 11
	Ser Lys Gly Xaa Tyr Arg
	1 5
	<210> 12
	<211> 6
50	<212> PRT
	<213> artificial
	<220>
55	<223> sustrato péptido
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
60	<223> ACETILACIÓN
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (4)..(4)

<223> X sustituye la Pirenilalanina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (5)..(5)
 <223> (3 NO2) Tyr
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (6)..(6)
 <223> homo Arginina
 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 12
 Ser Lys Gly Xaa Tyr Arg
 1 5
 20 <210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> sustrato péptido
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> retro Abz Lys
 <220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> (3 NO2) Tyr
 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> X sustituye la Ornitina
 <220>
 50 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 13
 Ser Lys Gly Lys Tyr Xaa
 55 1 5

REIVINDICACIONES

1. Péptido sustrato selectivo de la *Major Secreted Protein* (Msp) de *Legionella pneumophila*, con fórmula (I):

5 (I) $R-(X)_n\text{-Fluo-Rep-(Gly)}_m\text{-Z-NH}_2$

en la que,

- 10 • Fluo es un aminoácido- α de configuración (L), que posee en su cadena lateral un grupo fluorogénico seleccionado de entre el grupo constituido por la (L)-(1-pirenil)-alanina, la (L)-N ϵ (retroAbz)-Lis, la (L)-(7-metoxicumarin-4-il)-alanina, la (L)-((6,7-dimetoxi-cumarin-4-il)-alanina, la (L)-N β (pirenilacetil)-Dap, la (L)-N γ (pirenilacetil)-Dab, la (L)-N δ (pirenilacetil)-Orn, la (L)-N ϵ (pirenilacetil)-Lis, la (L)-S-(1-pirenometil)-Cis y la (L)-O-(1-pirenometil)-Ser,
- 15 • Rep es un aminoácido de configuración (L) seleccionado de entre la (3-NO₂)Tyr y la (4-NO₂)Phe, entendiéndose que cuando Fluo es la pirenilalanina, Rep es la (3-NO₂)Tyr,
- R es un grupo seleccionado de entre los grupos acetilo, succinilo y metoxisuccinilo,
- 20 • X es un aminoácido- α de configuración (L) seleccionado de entre el grupo constituido por: Gly, Ser, homo-Ser, Lys, homo-Lys, Arg, homo-Arg y Orn,
- Z es un aminoácido- α cargado positivamente, y
- 25 • n y m son dos números enteros naturales, estando n comprendido entre 0 y 3 y estando m comprendido entre 0 y 2.

2. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado por que el resto Fluo es la (L)-(1-pirenil)-alanina.

30 3. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el resto Rep es la (3-NO₂)Tyr.

4. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que Z se selecciona de entre el grupo constituido por (L)-Lys, (L)-homo-Lys, (L)-Orn, (L)-Arg y (L)-homo-Arg.

35 5. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho péptido se selecciona de entre el grupo constituido por:

- Compuesto 1- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
- Compuesto 2- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Lys-NH₂
- 40 Compuesto 3- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Lys-NH₂
- Compuesto 4- Ac-Ser-Arg-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
- Compuesto 5- Ac-Arg-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
- Compuesto 6- Ac-Ser-homo-Arg-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
- Compuesto 7- Ac-Ser-Orn-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
- 45 Compuesto 8- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Orn-NH₂
- Compuesto 9- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-homo-Lys-NH₂
- Compuesto 10- Ac-homo-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Orn-NH₂
- Compuesto 11- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Arg-NH₂
- Compuesto 12- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-homo-Arg-NH₂, y
- 50 Compuesto 13- Ac-Ser-Lys-Gly-**(ϵ -Abz)Lys-(3-NO₂)Tyr**-Orn-NH₂.

6. Péptido según la reivindicación 5, caracterizado por que dicho péptido se selecciona de entre el grupo constituido por:

- 55 Compuesto 1- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Gly-Gly-Lys-NH₂
- Compuesto 8- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-Orn-NH₂, y
- Compuesto 12- Ac-Ser-Lys-Gly-**Pya-(3-NO₂)Tyr**-homoArg-NH₂.

60 7. Procedimiento de detección de la actividad proteasa de la *Major Secreted Protein* (Msp) de *Legionella pneumophila* en una muestra de una solución, que comprende las etapas siguientes:

- a) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de la fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 a 6, y
- 65 b) detectar una emisión de fluorescencia.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que la etapa a) se realiza a una temperatura comprendida entre 20°C y 55°C, preferentemente entre 25°C y 45°C, más preferentemente entre 30°C y 40°C, todavía más preferentemente entre 35°C y 38°C.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que la temperatura es igual a 37°C.
10. Procedimiento de análisis de la *Major Secreted Protein* (MSP) de *Legionella pneumophila* en una muestra de una solución, que comprende las etapas siguientes:
 - a) detectar la actividad proteasa de la Msp según el procedimiento de las reivindicaciones 7 a 9,
 - b) medir la emisión de fluorescencia, y
 - c) deducir del valor de la emisión de fluorescencia la cantidad de Msp presente en la muestra.
11. Procedimiento de análisis de la Msp según la reivindicación 10, caracterizado por que comprende una etapa suplementaria de concentración de la enzima antes de la etapa a).
12. Procedimiento de análisis de la Msp según la reivindicación 11, caracterizado por que la concentración de la muestra se realiza antes de la etapa a).
13. Procedimiento de análisis de *Legionella pneumophila* en una muestra de una solución, que comprende las etapas siguientes:
 - a) analizar la Msp en dicha muestra según el procedimiento de las reivindicaciones 10 a 12, y
 - b) deducir de la misma la cantidad de *Legionella pneumophila*.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, caracterizado por que la solución es un medio susceptible de contener unas bacterias de tipo *Legionella pneumophila*.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que dicha solución es un agua caliente sanitaria o un agua de torre aerorrefrigerante.
16. Kit para la detección y el análisis de *Legionella pneumophila*, conteniendo dicho kit por lo menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

Figura 1

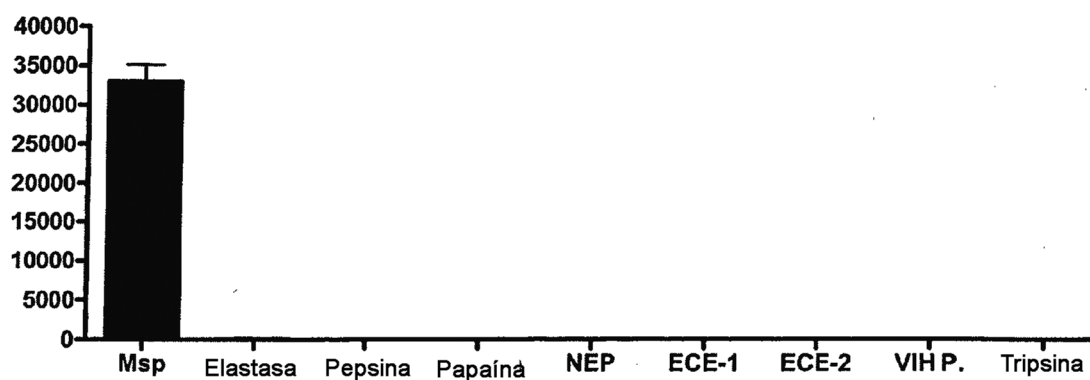


Figura 2

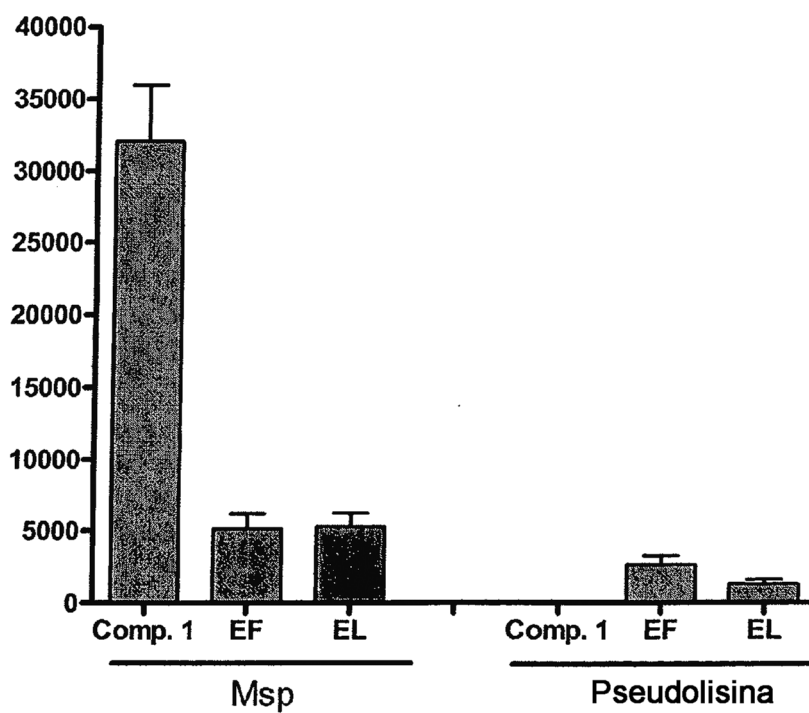


Figura 3

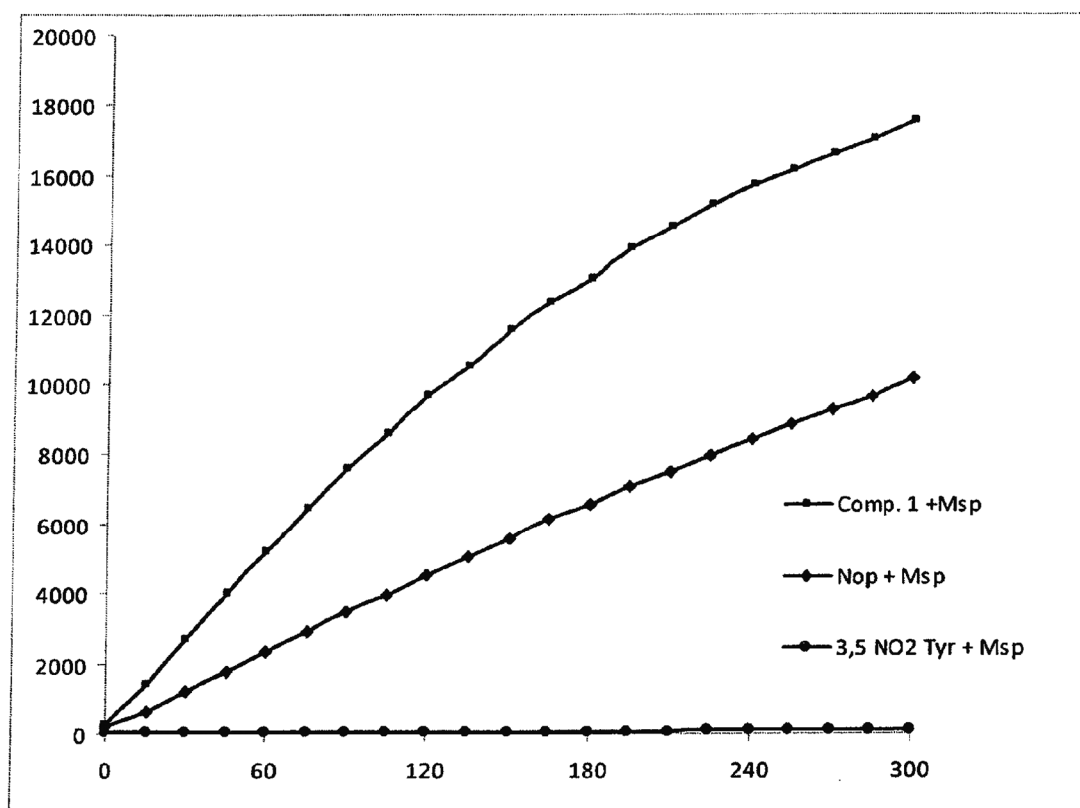


Figura 4

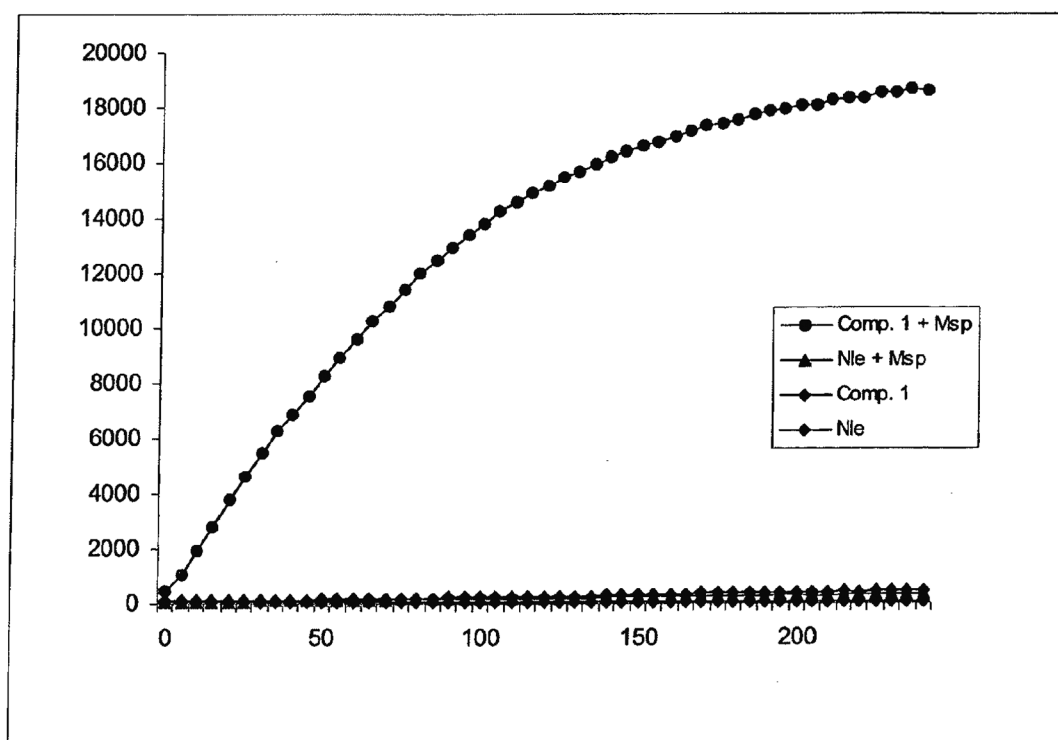


Figura 5

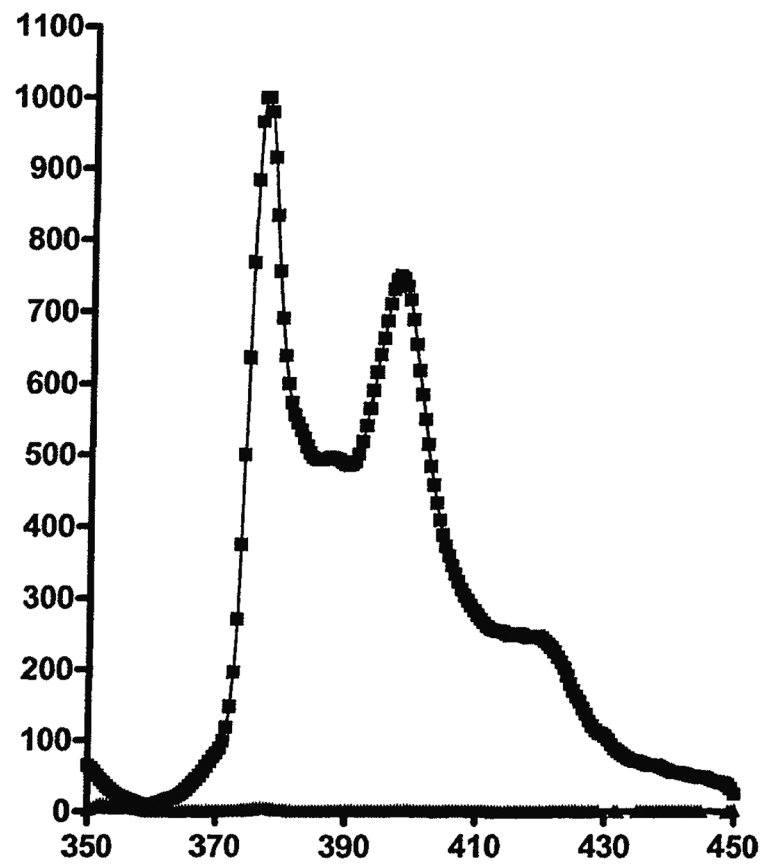


Figura 6a

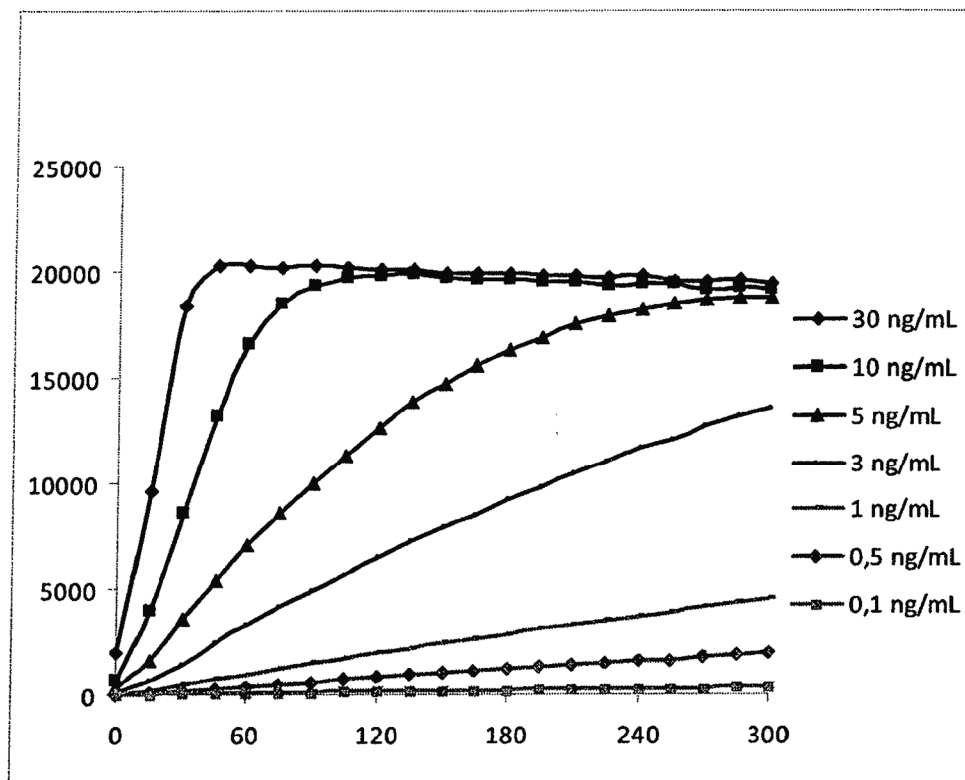


Figura 6b

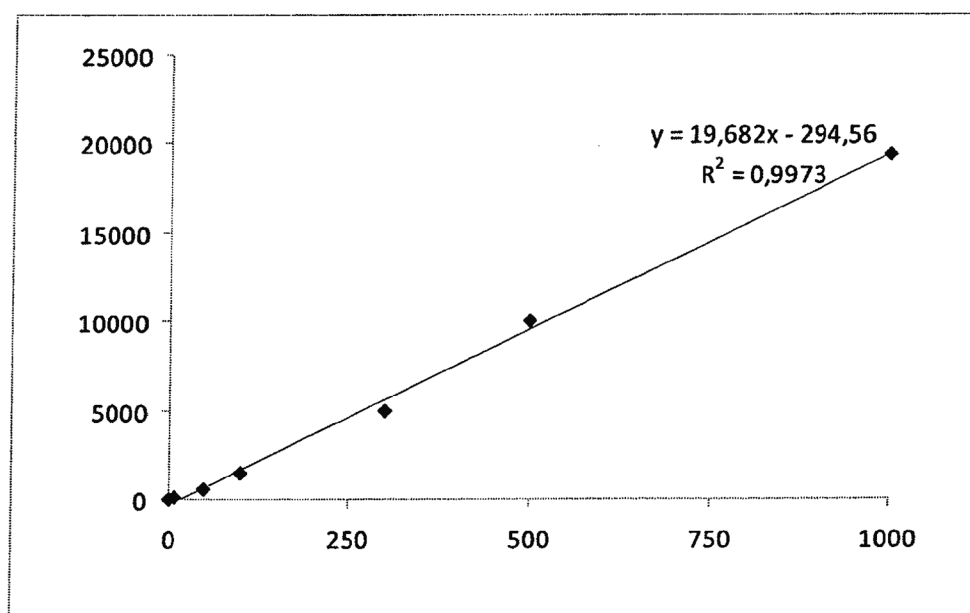


Figura 7a

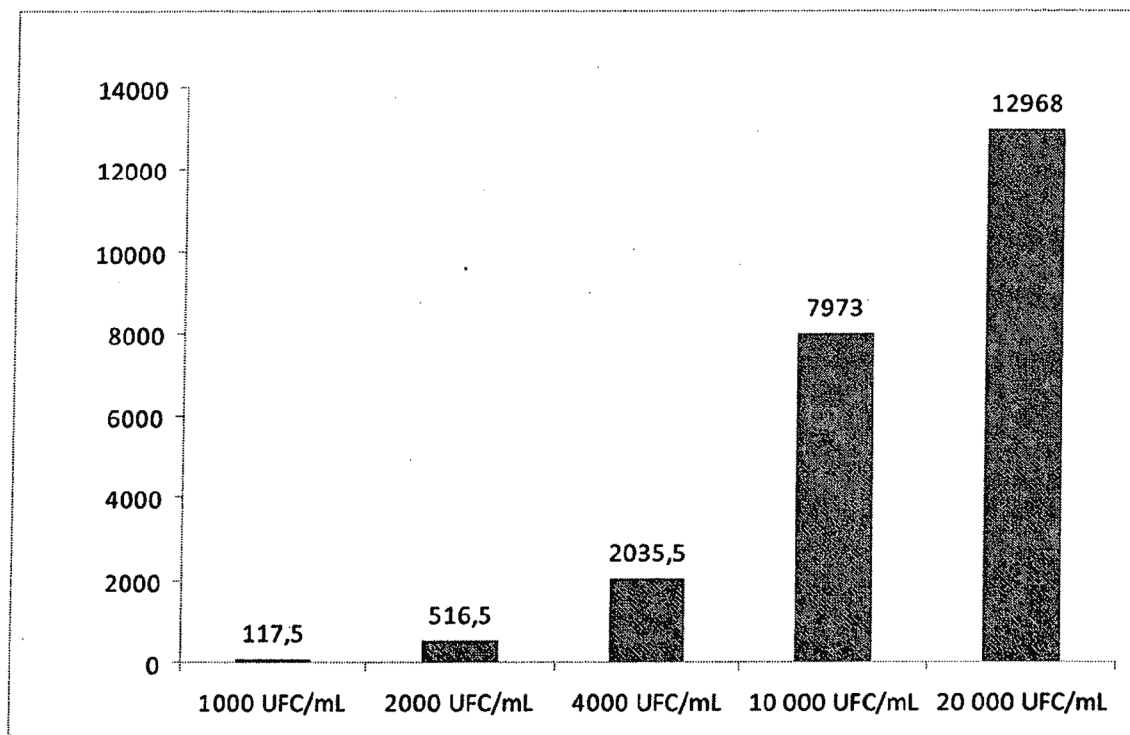


Figura 7b

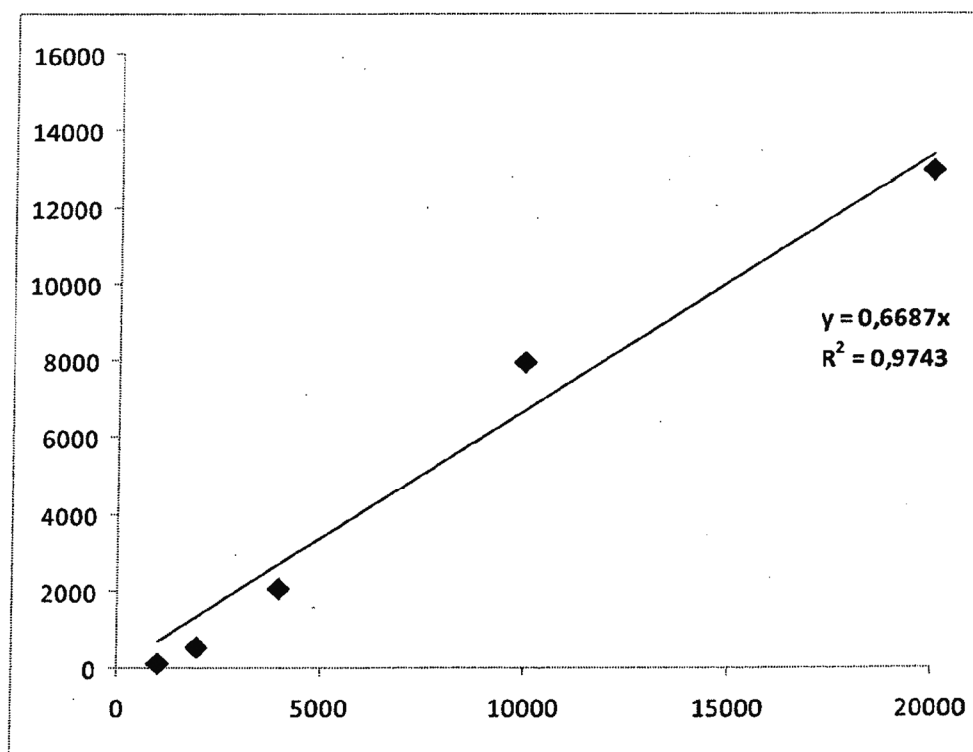


Figura 8a

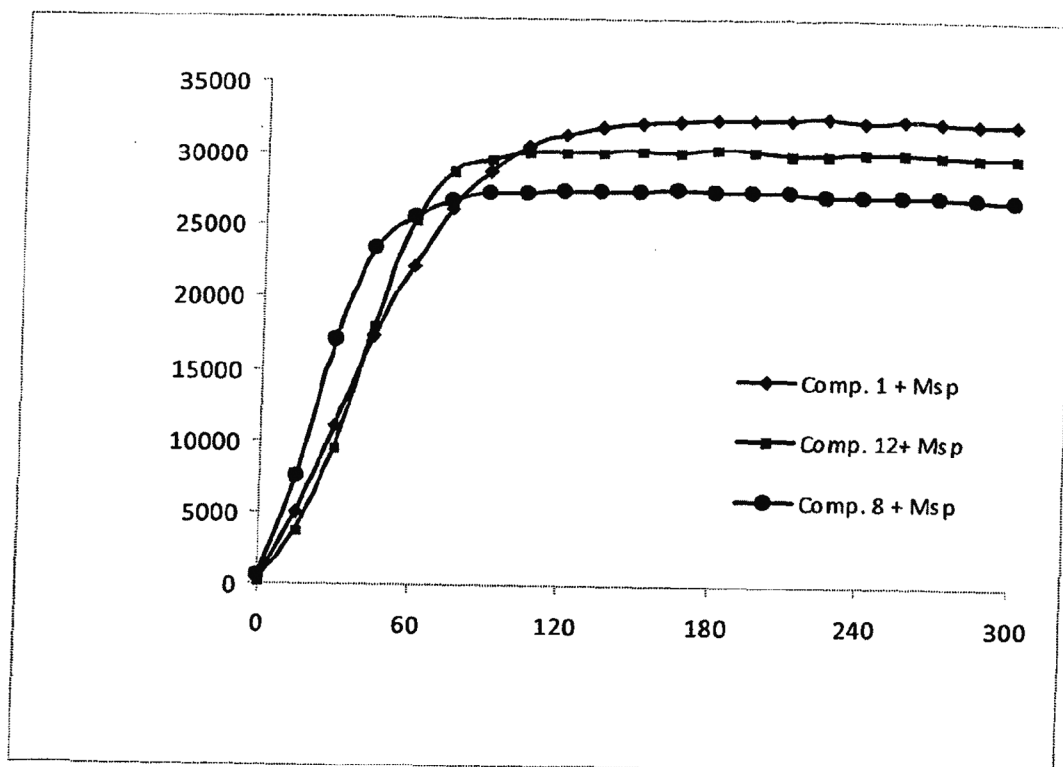


Figura 8b

