

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 212**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

C07K 5/083 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

C09B 11/24 (2006.01)

C07D 493/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2013 PCT/GB2013/051947**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14013272**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2013 E 13740356 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2875040**

54 Título: **Sonda fluorescente a base de rodamina para determinar la actividad coagulasa y detección de cepas bacterianas productoras de coagulasa**

30 Prioridad:

19.07.2012 GB 201212853

27.03.2013 GB 201305634

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

19.02.2018

73 Titular/es:

**KINGSTON UNIVERSITY HIGHER EDUCATION CORPORATION (100.0%)
River House 53-57 High Street
Kingston Upon Thames, Surrey KT1 1LQ, GB**

72 Inventor/es:

**SINCLAIR, ALEX;
FIELDER, MARK y
LE GRESLEY, ADAM**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 655 212 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

Sonda fluorescente a base de rodamina para determinar la actividad coagulasa y detección de cepas bacterianas productoras de coagulasa

5

El campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a compuestos que tienen utilidad en la detección de cepas bacterianas productoras de coagulasa. En particular, en la que la cepa bacteriana es MRSA o MSSA.

10

Antecedentes de la invención

En la actualidad, el tratamiento de cada caso de infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) costa al servicio nacional de salud del Reino Unido £9.000 (Wendin R: The economics of patient safety: can you afford not to be safe, Marsh Europe S.A. Report commissioned by The Royal College of Physicians, Londres; 2008), que totaliza más de £45m al año.

15

Aunque se han invertido 50 millones de libras para limpiar profundamente los hospitales, se ha notificado de que ha habido un pequeño aumento en el número de casos de infección. Esto puede deberse al hecho de que existen áreas objetivo específicas en un entorno hospitalario en las que la recurrencia de infecciones MRSA y MSSA (*Staphylococcus aureus* sensible a meticilina) es más probable.

20

Además, las muertes relacionadas con MRSA llegaron a 1200 en 2008 (Oficina Nacional de Estadística. Indicadores de salud. Health Stat Q. 2008; 37:7.) y si bien esto representa una disminución en comparación con años anteriores, un número desproporcionado es nosocomial y exige el uso de costosos antibióticos para combatirlos. A pesar de esta aparente nivelación en términos de tasa de infección, es de vital importancia mantener la vigilancia y desarrollar una tecnología de vigilancia "en uso" o en el punto de atención que permita un control continuo, una disminución de la carga para los proveedores del Servicio de Salud, pero también mejoras en los cuidados al paciente.

25

La técnica existente de uso de hisopos y cultivo es costosa, requiere mucho tiempo y es lenta en lo que respecta a los resultados. Esta demora entre el uso de hisopos y la obtención de un resultado positivo o negativo tiene, sin duda, un coste humano y financiero que, por el momento, es difícil de cuantificar.

30

La magnitud de la amenaza para la salud que plantea *Staphylococcus aureus* (MRSA y MSSA) no ha pasado desapercibida para las agencias de salud pública y los gobiernos (Mackenzie, F. M, Struelens, M. J. Towner, K. J, Gould, I. M; Clin. Microbiol. Infect., 2005, 11.937-954). Un aumento del número de casos de MRSA y MSSA adquiridos en la comunidad (Panton Valentine Leukocidin positive) y adquiridos en el hospital ha llevado a muchas agencias a considerar que las estrategias de control actuales son ineficaces. El cribado, la vigilancia y el tipado molecular del portador forman todas las herramientas para las estrategias integradas de control de MRSA / MSSA. Sin embargo, el eslabón más débil en esta estrategia es el cribado y la detección. Si bien las técnicas actuales son fiables, son costosas y requieren mucho tiempo.

35

40

La velocidad del diagnóstico, la detección y la identificación son cruciales en el manejo de un paciente infectado. Tradicionalmente, el diagnóstico y la detección utilizan dos enfoques principales; el primero intenta identificar el patógeno en el sitio de la infección, mientras que el segundo tiene como objetivo determinar el tratamiento más apropiado con el objetivo de reducir la morbilidad y la mortalidad (Caroline Atardo Genco y Lee Wetzler; Neisseria - Molecular Mechanisms of Pathogenesis. Caister Academic Press. 2010). Actualmente, las técnicas de identificación más frecuentes se basan en el perfil bioquímico, tal como se ve en las pruebas de estilo del API o, como alternativa, utilizando técnicas moleculares, tales como PCR o DGGE, entre otras. Con mayor frecuencia se usa una combinación de técnicas (Sintchenko, V. Magrabi, F. Tipper, S; Medical Informatics and the Internet en Medicine, 2007, 32, 3, 225-240).

45

50

Estas pruebas varían en términos de tiempos de finalización y en los niveles de precisión. El tiempo empleado puede variar desde unas pocas horas hasta 18 horas después del cultivo puro inicial e incluso más en algunos casos. También se entiende que ciertos marcadores fenotípicos podrían alterarse bajo la influencia de diferentes condiciones ambientales. En ocasiones, los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana también se usan para ayudar en el diagnóstico que requiere un cultivo puro. En tales situaciones, es más probable que la identificación bacteriana se logre alrededor de 48 horas después de la recepción inicial de la muestra, lo que puede dificultar el tratamiento del paciente y tener implicaciones potenciales en términos de control de la infección.

55

60

Habitualmente, los métodos de detección para estos patógenos implican cultivo en medios líquidos o sólidos. Estas técnicas, incluido un medio de agar basado en cefatoxina cromogénico más reciente, normalmente detectan MRSA y MSSA en de 20 a 48 horas, especialmente cuando el diagnóstico inicial es provisional, como se ve con las metodologías de detección no cromogénicas. La detección rápida de MRSA / MSSA es posible mediante PCR y ensayos de hibridación. Sin embargo, aunque la microbiología se puede realizar en de 1,5 a 6 horas, la obtención de muestras y su transporte a un laboratorio adecuadamente equipado significa en realidad que el mejor tiempo de

65

respuesta es de 24 horas después del ingreso de un paciente. Esto supone que la prueba se puede realizar 7 días a la semana las 24 horas del día. Ensayos recientes de métodos de cultivo convencionales y técnicas de PCR han demostrado que hay una falta de beneficio demostrable en el caso de la evaluación basada en PCR (Harbarth, S. Fankhauser, C. Schrenzel, J; JAMA, 2008, 299, 1149-1157; Jeyaratnam, D. Whitty, C. J. Phillips, K; British Medical Journal, 2008, 336, 927-930).

Otra técnica es una variante de la prueba de coagulasa en tubo y se basa en un tripéptido acoplado a un fluoróforo de cumarina, sintetizado por primera vez en 1977 (Ford, M. Perry, J. D. Robson, I. Morgan, S. Holliday, M. G. Orr, K. E. Gould, F. K; Journal of Hospital Infection, 1999, 41, 2, 133-135; Morita, T. Katcy, H Sadaaki, I. Takada, K. Kimura, T. Sakakibara, S; J. Biochem. 1977, 82, 1495-1498).

Este tripéptido imita al fibrógeno y se escinde por acción de la coagulasa expresada por *S. aureus* (MRSA y MSSA). La pérdida del tripéptido produce un cambio en la absorción UV de la cumarina. La sensibilidad de este colorante es limitada y requiere cultivo celular antes del análisis. Esto se basa, en gran parte, en el bajo coeficiente de extinción del fluoróforo de cumarina.

Hay tres amplios grupos de enfoques para las pruebas de MRSA; cultivo convencional, inmunocaptura y detección molecular. El procedimiento para el cultivo convencional requiere mucho tiempo, implica obtener un hisopo de muestra del paciente / superficie, el transporte estéril a un laboratorio de microbiología donde se puede utilizar para inocular una placa de agar cromogénico, seguido de incubación. Los resultados generalmente no están disponibles hasta 24 a 48 horas después de la obtención del hisopo inicial. Con respecto a los métodos de inmunocaptura, se pueden usar métodos tales como ELISA, esto implica el cultivo de muestras o la replicación en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del hisopo de muestra antes de que puedan obtenerse los resultados. Los hisopos simples se pueden procesar en aproximadamente 6 horas, sin embargo, este tiempo disminuye drásticamente cuando se procesan varias muestras. Este enfoque también puede ser muy caro, ya que requiere un laboratorio de microbiología especializado en PCR.

También hay una serie de kits comerciales que permiten la detección de toxinas estafilocócicas preformadas, sin embargo, en muchos casos, se requiere cultivo y purificación de la muestra antes de la prueba, haciendo uso de estos kits, como mínimo, limitados. Un ejemplo de estos kits, que a menudo se lleva a cabo en pequeños laboratorios, es el kit de la aglutinación de látex, que permite obtener un resultado en aproximadamente 20 a 24 horas, sin embargo, se conocen varios problemas relacionados con la aplicabilidad general de estas pruebas.

La rodamina presenta un alto coeficiente de extinción y un pronunciado cambio en las características de absorción / emisión en formas de lactona o zwitteriónica. Un ejemplo existente para la detección de serina proteasas genéricas es el sustrato fluorogénico Ala-Pro-Pro-Violeta de cresilo, que se escinde específicamente mediante la dipeptidil peptidasa IV, lo que permite la formación de imágenes confocales de las células Jurkat transfectadas con DPPiV. (Boonacker, E. Elferink, S. Bardai, S. Fleischer, B, Van Noorden, C; The Journal of Histochemistry y Cytochemistry, 2003, 51,7, 959-968).

El documento EP2036897 desvela fosforoamiditas marcadas con rodamina estables y soportes de síntesis que pueden usarse como reactivo de marcado para marcar oligonucleótidos durante la síntesis de oligonucleótidos.

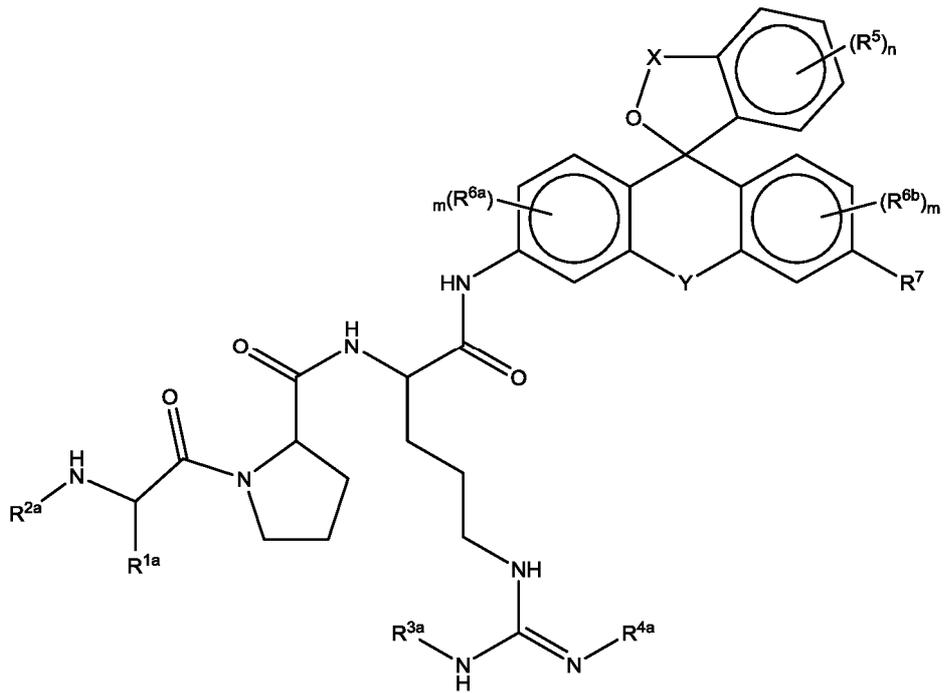
El documento WO 03/099780 desvela ensayos enzimáticos y, más particularmente, ensayos de proteasas que usan sustratos de proteasas luminógenas que incluyen un luminóforo basado en rodamina.

Existe la necesidad de un diagnóstico rápido de agentes infecciosos, tales como MRSA y MSSA, especialmente en términos de las tecnologías en el punto de atención. De hecho, muchos organismos de salud exigen una vigilancia activa de MRSA y MSSA.

La indicación o discusión de un documento aparentemente publicado previamente en esta memoria descriptiva no debe considerarse necesariamente una aceptación de que el documento forma parte del estado de la técnica o es del conocimiento común general.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula I:



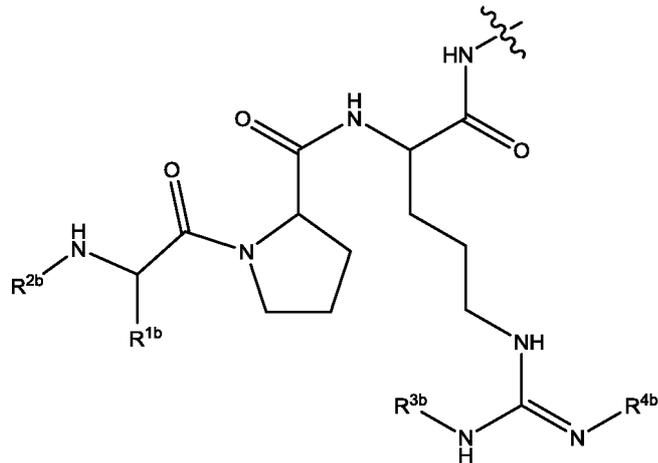
en los que

5 X representa C(O) o S(O)_t;

t representa 1 o 2;

Y representa O, S, NH o CH₂;

10 R⁷ representa



15 R^{1a} y R^{1b} son isopropilo;

R^{2a} y R^{2b} representan cada uno independientemente -H, -OR^a, -C(O)R^a, -C(O)OR^b, un grupo G, -L-arilo o alquilo -C₁₋₆, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

20 R^{3a}, R^{3b}, R^{4a} y R^{4b} representan cada uno independientemente -H, -NO₂, -OH, -C(O)R^c o alquilo C₁₋₆, en el que el último grupo pueden estar opcionalmente sustituido con uno o más halo;

25 cada R⁵ representa independientemente -NO₂, -OR^d, -NR^d₂, -SR^d, -C(O)R^e, -C(O)OR^e, -C(O)N(H)R^e, -C(O)NR^e₂, -S(O)₃R^e, -S(O)₂N(H)R^e, -S(O)₂NR^e₂, halo, arilo o alquilo C₁₋₆, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

y/o dos grupos R^5 cualesquiera pueden unirse entre sí para formar, junto con los átomos de carbono a los que están necesariamente unidos, un grupo cicloalquilo o arilo de 5 o 6 miembros, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

5 n representa de 0 a 4;

R^{6a} y R^{6b} representan independientemente $-NO_2$, $-N(H)R^f$, $-N(Rg)R^h$, $-OR^i$, $-SR^i$, $C(O)R^h$, $C(O)OR^h$, $-C(O)N(H)R^h$, $-C(O)NR_2^h$, $S(O)_3R^h$, $-S(O)_2N(H)R^h$, $-S(O)_2NR_2^h$, arilo o alquilo C_{1-6} , en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

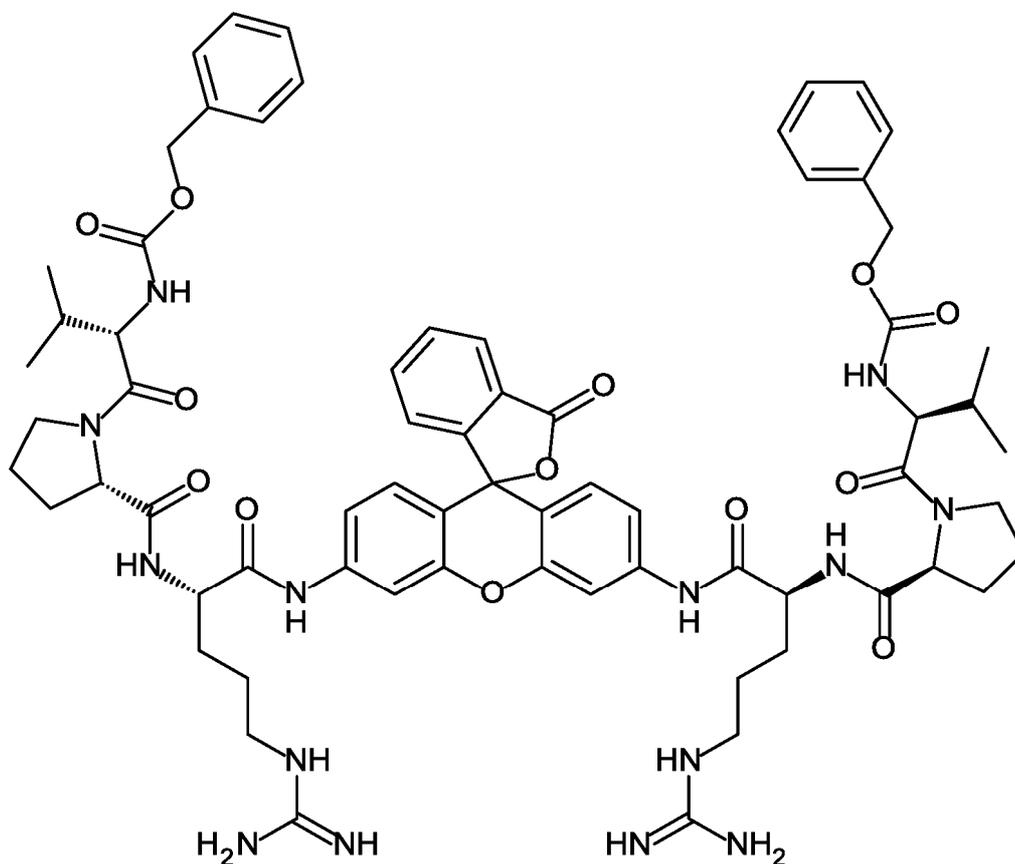
10 cada m representa independientemente de 0 a 3;

cada R^a to R^l representa independientemente $-H$, arilo, alquilo C_{1-6} , en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

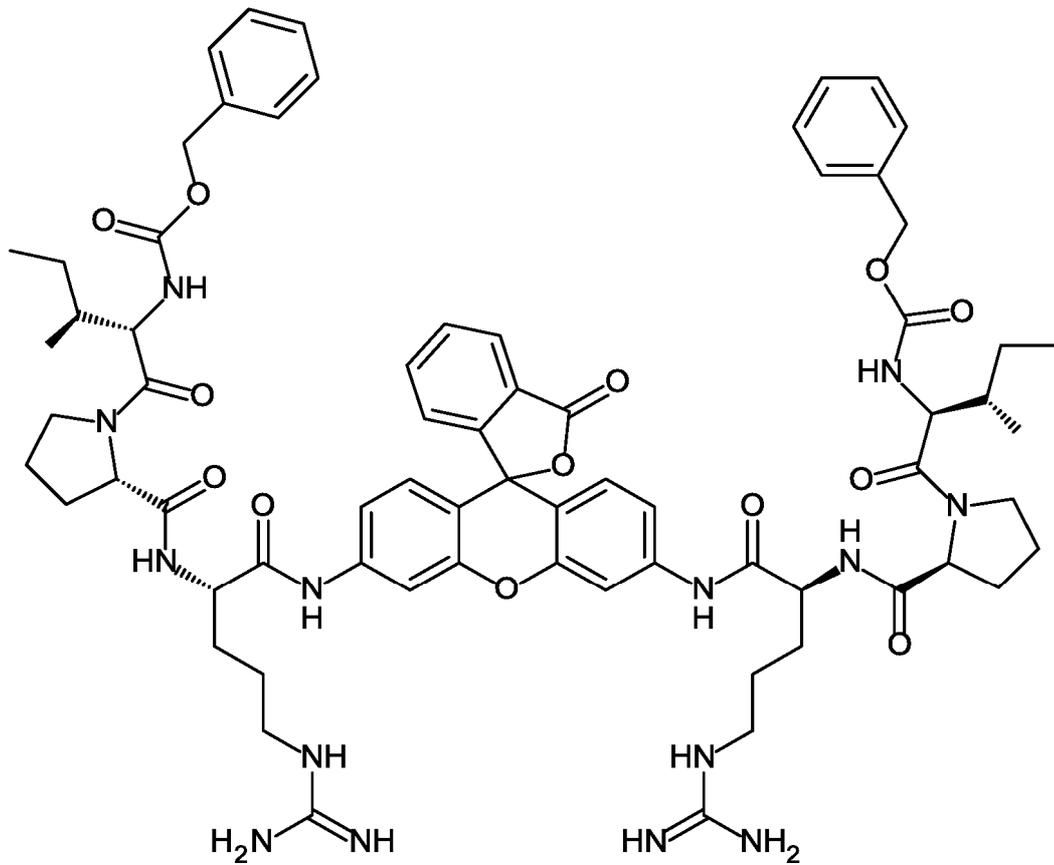
15 L representa un enlace directo o CH_2 ;

G representa cualquier aminoácido que puede estar sustituido adicionalmente.

20 En una realización de la presente invención el compuesto no tiene la estructura según la fórmula A o la fórmula B:

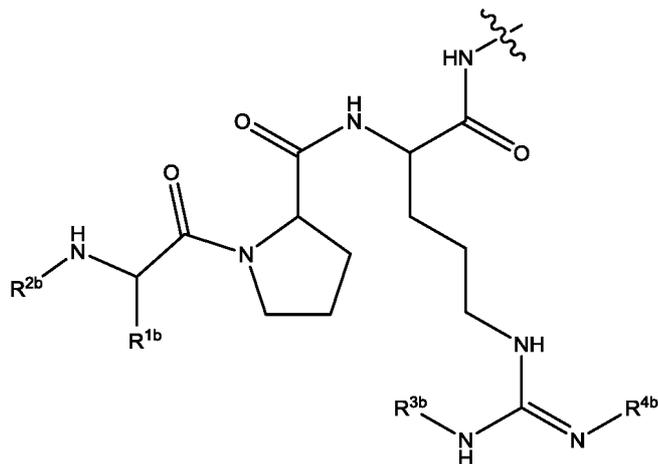


Fórmula A



Fórmula B

5 Preferentemente, en la que R⁷ está representado por



y en la que

10

X representa C(O) o S(O)_t;

t representa 1 o 2;

15

Y representa O, S, NH o CH₂;

R^{1a} y R^{1b} son isopropilo;

R^{2a} y R^{2b} representan cada uno independientemente H, -C(O)R^a, -C(O)OR^b, -L-arilo o un grupo G;

R^{3a} , R^{3b} , R^{4a} y R^{4b} representan cada uno independientemente H, $-NO_2$, $-OH$, $-C(O)R^c$ o alquilo C_{1-6} , en el que el último grupo pueden estar opcionalmente sustituido con uno o más halo;

5 cada R^5 representa independientemente halo, $-OR^d$, $-C(O)R^e$, arilo o alquilo C_{1-6} , en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

10 y/o dos grupos R^5 cualesquiera pueden unirse entre sí para formar, junto con los átomos de carbono a los que están necesariamente unidos, un grupo cicloalquilo o arilo de 5 o 6 miembros, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

10 n representa de 0 a 4;

15 R^{6a} y R^{6b} representa cada uno independientemente $-N(H)R^f$, $-N(R^g)R^h$, $C(O)R^h$, $-OR^i$, arilo o alquilo C_{1-6} , en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

15 cada m representa independientemente de 0 a 3;

20 cada R^a a R^i representa independientemente alquilo C_{1-6} , opcionalmente sustituido con uno o más halógeno;

20 L representa un enlace directo o CH_2 ;

G representa cualquier aminoácido que puede estar sustituido adicionalmente.

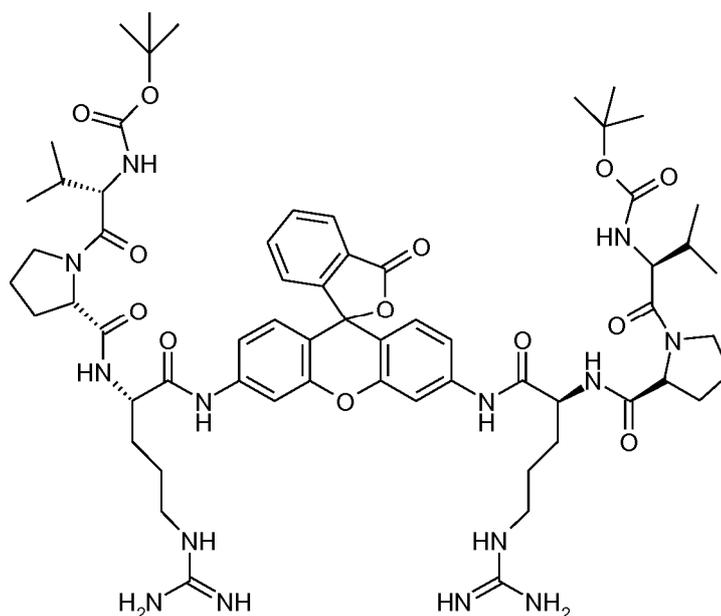
25 En otra realización cuando:

- 25 X = C(O);
 Y=O;
 R^{1a} y R^{1b} son cada uno isopropilo;
 R^{3a} , R^{3b} , R^{4a} y R^{4b} son cada uno H;
 30 n es 0 para R^5 ; y
 m es 0 para R^{6a} y R^{6b} ;
 R^{2a} y R^{2b} no pueden estar representados cada uno por Cbz; y

35 En la presente invención, R^{1a} y R^{1b} son cada uno isopropilo.

35 Preferentemente, en la que R^{2a} y R^{2b} están representados independientemente por tBoc , Cbz, Bn, Bz o cualquier aminoácido sin embargo sustituido adicionalmente. Más preferentemente, en la que R^{2a} y R^{2b} están representados independientemente por tBoc , Bn, Bz o cualquier aminoácido sin embargo sustituido adicionalmente. Incluso más preferentemente, en la que R^{2a} y R^{2b} están representados cada uno por tBoc .

40 Preferentemente, en la que la estructura está de acuerdo con la fórmula II:



45 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona el compuesto de la presente invención para su uso en la

detección de una cepa bacteriana productora de coagulasa.

Preferentemente, en la que la cepa bacteriana es *Staphylococcus aureus*. Opcionalmente, en la que la cepa bacteriana es MRSA o MSSA.

5 Un tercer aspecto de la presente invención proporciona el uso del compuesto de la presente invención para detectar cepas bacterianas productoras de coagulasa. Preferentemente, en la que la cepa bacteriana es *Staphylococcus aureus*. Opcionalmente, en la que la cepa bacteriana es MRSA o MSSA.

10 Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona el uso de rodamina acoplada al tripéptido Val-Pro-Arg para detectar cepas bacterianas productoras de coagulasa. Opcionalmente, la rodamina se acopla a un tripéptido Val-Pro-Arg para detectar cepas bacterianas productoras de coagulasa. Como alternativa, la rodamina se acopla a dos tripéptidos Val-Pro-Arg para detectar cepas bacterianas productoras de coagulasa. Preferentemente, en la que la cepa bacteriana es *Staphylococcus aureus*. Opcionalmente, en la que la cepa bacteriana es MRSA o MSSA.

15 Un quinto aspecto de la presente invención proporciona un método para detectar una cepa bacteriana productora de coagulasa, que comprende: añadir un compuesto de la presente invención a una muestra que contiene la cepa bacteriana; y detectar una respuesta óptica.

20 Ventajosamente, el método comprende adicionalmente añadir a la muestra una o ambas de las proteínas protrombina y pretrombina. Preferentemente, el método comprende adicionalmente la adición de pretrombina a la muestra.

25 Preferentemente, la respuesta óptica es un cambio de color dentro de la región visible del espectro electromagnético. Opcionalmente, en el que la respuesta óptica es fluorescencia.

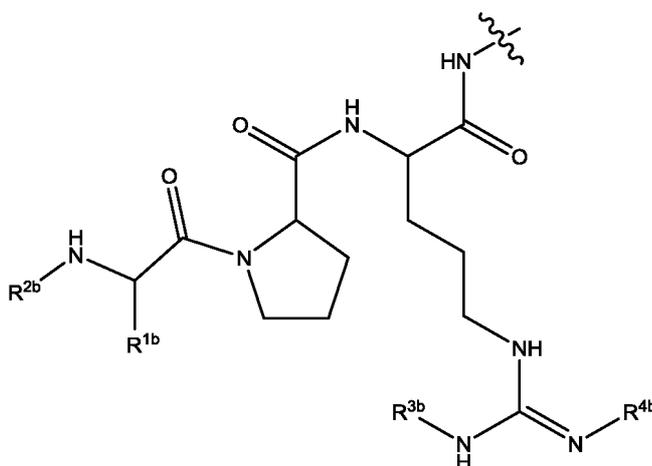
Preferentemente, la muestra incluye un fluido biológico, una muestra de tejido, una sección de tejido, una muestra de células o un fluido o sustrato no biológico.

30 Preferentemente, la muestra es una muestra humana o una muestra de un animal.

De manera práctica, la muestra es una muestra de comida.

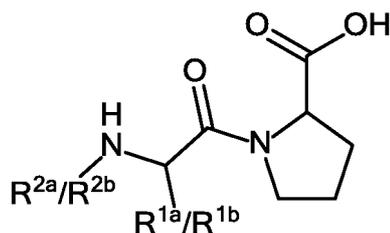
35 De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención se proporciona un kit para detectar cepas bacterianas productoras de coagulasa, que comprende: el compuesto de la invención; y una cualquiera o ambas de las proteínas protrombina y pretrombina. Preferentemente, el método comprende adicionalmente la adición de pretrombina a la muestra.

40 De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar los compuestos de la presente invención, en los que R⁷ está representado por:



que comprende las etapas de:

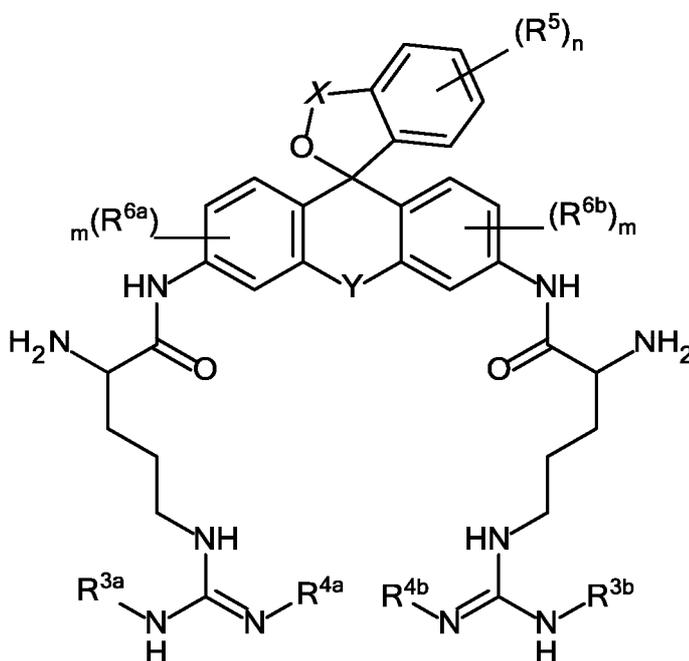
45 mezclar un ácido carboxílico y una diamina en presencia de un agente de acoplamiento peptídico; en las que el ácido carboxílico está representado por la estructura:



en la que R^{1a}/R^{1b} representa isopropilo;

- 5 R^{2a}/R^{2b} representa -H, -OR^a, -C(O)R^a, -C(O)OR^b, un grupo G, -L-arilo o alquilo -C₁₋₆, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo; y

la diamina está representada por la estructura:



10

X representa C(O) o S(O)_t;

t representa 1 o 2;

15

Y representa O, S, NH o CH₂;

R^{3a}, R^{3b}, R^{4a} y R^{4b} representan cada uno independientemente -H, -NO₂, -OH, -C(O)R^c o alquilo C₁₋₆, en el que el último grupo pueden estar opcionalmente sustituido con uno o más halo;

20

cada R⁵ representa independientemente -NO₂, -OR^d, -NR₂^d, -SR^d, -C(O)R^e, -C(O)OR^e, -C(O)N(H)R^e, -C(O)NR₂^e, -S(O)₃R^e, -S(O)₂N(H)R^e, -S(O)₂NR₂^e, halo, arilo o alquilo C₁₋₆, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

25 y/o dos grupos R⁵ cualesquiera pueden unirse entre sí para formar, junto con los átomos de carbono a los que están necesariamente unidos, un grupo cicloalquilo o arilo de 5 o 6 miembros, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

n representa de 0 a 4;

30

R^{6a} y R^{6b} representan independientemente -NO₂, -N(H)R^f, -N(Rg)R^h, -ORⁱ, -SRⁱ, C(O)R^h, C(O)OR^h, C(O)N(H)R^h, -C(O)NR₂^h, S(O)₃R^h, -S(O)₂N(H)R^h, -S(O)₂NR₂^h, arilo o alquilo C₁₋₆, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

35

cada m representa independientemente de 0 a 3;

cada R^a to Rⁱ representa independientemente -H, arilo, alquilo C₁₋₆, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo.

Preferentemente, en el que el agente de acoplamiento peptídico es un agente de acoplamiento peptídico de uronio tal como HATU ((dimetilamino)-*N,N*-dimetil(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)metaniminio hexafluorofosfato), HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato), HCTU (O-(1H-6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato) o COMU (1-[(1-(ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenoamino)oxi)dimetilaminomorfolino]) uronio hexafluorofosfato). Más preferentemente, en el que el agente de acoplamiento peptídico es COMU.

La presente invención proporciona una plataforma robusta, rentable y flexible desde el punto de vista tecnológico que puede llevarse al lado del lecho y usarse para proporcionar un diagnóstico preciso y rápido del tipo de organismo dañino presente en el paciente y puede lograrse con la propuesta actual descrita.

La presente invención proporciona una detección rápida de uno o más patógenos a través de un frotis directo de la piel, saliva, membrana mucosa, heridas, orina y heces, expuestos a una muestra de indicador de cambio de color. Un cambio en el color después de un período de tiempo determinado indica un resultado positivo para el patógeno y permitiría que el paciente sea rápidamente aislado y tratado usando protocolos de tratamiento actuales / futuros. Esta forma de obtención e identificación de muestras directa facilitaría una metodología rápida que se puede utilizar al pie de la cama o como un cribado preadmisión representa un avance significativo en el diagnóstico / detección precoz. Cuando antes se identifique una infección o un portador, antes se podrá implementar un método eficaz de tratamiento o contención.

Los compuestos de fórmula I y II (todos los compuestos de fórmula I y fórmula II cuando están limitados por las condiciones) se denominan en lo sucesivo "los compuestos de la invención". El compuesto de acuerdo con fórmula II se denomina en lo sucesivo en el presente documento "LGX". Los comentarios siguientes en relación con los compuestos de la invención y sus usos se aplican a todos los compuestos dentro de la definición de fórmula I y II. También debe entenderse que, en un aspecto particular de la invención, los compuestos de fórmula I, tal como están restringidos por las condiciones, se usan en las aplicaciones, usos, Formulaciones, etc., que se tratan a continuación.

Los compuestos de la invención pueden contener dobles enlaces y, por lo tanto, pueden existir como los isómeros geométricos *E* (*entgegen*) y *Z* (*zusammen*) sobre cada doble enlace individual. Todos estos isómeros y mezclas de los mismos están incluidos dentro del alcance de la invención.

Los compuestos de la invención también pueden exhibir tautomería. Todas las formas tautoméricas y mezclas de las mismas están incluidas dentro del alcance de la invención. Salvo que se especifique de otra forma, los grupos alquilo definidos en el presente documento pueden ser de cadena lineal o, cuando hay un número suficiente (es decir, un mínimo de dos o tres, según corresponda) de átomos de carbono, ser de cadena ramificada y / o cíclicos formando así un grupo cicloalquilo. Tales grupos cicloalquilo pueden ser monocíclicos o bicíclicos y pueden estar, adicionalmente, formando puentes. Además, cuando hay un número suficiente (es decir, un mínimo de cuatro) de átomos de carbono, dichos grupos también pueden ser parcialmente cíclicos. Dichos grupos alquilo también pueden estar saturados o, cuando hay un número suficiente (es decir, un mínimo de dos) de átomos de carbono, estar insaturados formando, por ejemplo, un grupo alqueno o alquino.

Los términos "halógeno" o "halo", cuando se usan en el presente documento, incluyen flúor, cloro, bromo y yodo.

Los grupos arilo que se pueden mencionar incluyen grupos arilo C₆₋₁₄ (tal como C₆₋₁₃ (tal como C₆₋₁₀)). Dichos grupos pueden ser monocíclicos o bicíclicos y tienen entre 6 y 14 átomos de carbono en el anillo, en los que al menos un anillo es aromático. Los grupos arilo C₆₋₁₄ incluyen grupos fenilo, naftilo y grupos tales como 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y fluorenilo. Otros grupos arilo que se pueden mencionar incluyen aquellos en los que los anillos están directamente unidos pero no fusionados, por ejemplo bifenilo. El punto de unión de los grupos arilo puede ser a través cualquier átomo del sistema de anillos. Sin embargo, cuando los grupos arilo son bicíclicos o tricíclicos, están ligados al resto de la molécula a través de un anillo aromático.

Para disipar cualquier duda, en los casos en los que la identidad de dos o más sustituyentes en un compuesto de la invención puede ser la misma, las identidades reales de los sustituyentes respectivos no son de ninguna manera interdependientes. Por ejemplo, en la situación en la que X¹ and X² representan ambos un halógeno, los halógenos en cuestión pueden ser iguales o diferentes.

Los sustituyentes R¹ y R² etc. en los compuestos finales de la invención o los intermedios relevantes pueden modificarse una o más veces, después o durante los procesos descritos anteriormente por medio de métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de dichos métodos incluyen sustituciones, reducciones, oxidaciones, alquilaciones, acilaciones, hidrólisis, esterificaciones, eterificaciones, halogenaciones o nitraciones. Dichas reacciones pueden dar como resultado la formación de un compuesto final simétrico o asimétrico de la invención o intermedio. Los grupos precursores pueden cambiarse a un grupo diferente o a los grupos definidos en

la fórmula I, en cualquier momento durante la secuencia de reacción. En este sentido, el experto también puede referirse a "Comprehensive Organic Functional Group Transformations" de A. R. Katritzky, O. Meth-Cohn y C. W. Rees, Pergamon Press, 1995.

- 5 Los compuestos de la invención se pueden aislar a partir de sus mezclas de reacción usando técnicas convencionales (por ejemplo, recristalizaciones).

Los expertos en la materia apreciarán que, en los procedimientos descritos anteriormente y en lo sucesivo, los grupos funcionales de compuestos intermedios pueden necesitar protección por grupos protectores. La protección y desprotección de grupos funcionales puede tener lugar antes o después de una reacción en los esquemas mencionados anteriormente.

Los grupos protectores se pueden eliminar de acuerdo con técnicas que son bien conocidas por los expertos en la materia y como se describe a continuación. Por ejemplo, los compuestos / intermedios protegidos descritos en el presente documento se pueden convertir químicamente en compuestos no protegidos usando técnicas de desprotección estándar. Por "grupo protector", los inventores también incluyen grupos alternativos adecuados que son precursores del grupo real que se desea proteger. Por ejemplo, en lugar de un grupo protector de amino "estándar", se puede emplear un grupo nitro o azido para servir eficazmente como un grupo protector de amino, grupos que pueden convertirse más tarde (habiendo servido para actuar como grupo protector) en el grupo amino, por ejemplo en condiciones de reducción estándar descritas en el presente documento.

El tipo de química implicada dictará la necesidad y el tipo de grupos protectores, así como la secuencia para lograr la síntesis.

- 25 El uso de grupos protectores se describe completamente en 'Protective Groups in Organic Synthesis', 3ª Edición, T.W. Greene y P.G.M. Wutz, Wiley-Interscience (1999)).

El término "cepa bacteriana productora de coagulasa" como se usa en el presente documento se refiere a una cepa bacteriana que produce la enzima coagulasa.

30

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describirá a continuación a modo de ejemplo, haciendo referencia a las figuras adjuntas, en las que:

35

La figura 1 ilustra el uso de un sistema de colorante acoplado a sustrato que se usa como agente de detección bacteriano;

La figura 2A muestra la concentración 10^6 de MRSA con LGX 50 μ M;

La figura 2B muestra la concentración 10^5 de MRSA con LGX 50 μ M;

40 La figura 2C muestra la concentración 10^3 de MRSA con LGX 50 μ M;

La figura 2D muestra la concentración 10^2 de MRSA con LGX 50 μ M;

La figura 3A muestra la concentración 10^4 de MRSA con LGX 100 μ M;

La figura 3B muestra la concentración 10^3 de MRSA con LGX 100 μ M;

La figura 3C muestra la concentración 10^2 de MRSA con LGX 100 μ M;

45 La figura 4A muestra la concentración 10^6 de MSSA con LGX 50 μ M;

La figura 4B muestra la concentración 10^5 de MSSA con LGX 50 μ M;

La figura 4C muestra la concentración 10^3 de MSSA con LGX 50 μ M;

La figura 4D muestra la concentración 10^2 de MSSA con LGX 50 μ M;

La figura 5A muestra la concentración 10^4 de MSSA con LGX 100 μ M;

50 La figura 5B muestra la concentración 10^3 de MSSA con LGX 100 μ M;

La figura 5C muestra la concentración 10^2 de MSSA con LGX 100 μ M;

La figura 6A(1) muestra la concentración 10^6 de E.coli con LGX 50 μ M;

Figura 6A (2) (valor del eje Y disminuido): concentración 10^5 de E.coli con LGX 50 μ M;

La figura 6B(1) muestra la concentración 10^5 de E.coli con LGX 50 μ M;

55 Figura 6B(2) (valor del eje Y disminuido): concentración 10^5 de E.coli con LGX 50 μ M;

La figura 6C(1) muestra la concentración 10^3 de E.coli con LGX 50 μ M;

La figura 6C(2) muestra (valor del eje Y disminuido): concentración 10^3 de E.coli con LGX 50 μ M;

La figura 6D(1) muestra la concentración 10^2 de E.coli con LGX 50 μ M;

La Figura 6D(2) muestra (valor del eje Y disminuido): concentración 10^2 de E.coli con LGX 50 μ M;

60 La figura 7A(1) muestra la concentración 10^4 de E.coli con LGX 100 μ M;

La Figura 7A(2) (valor del eje Y disminuido): concentración 10^4 de E.coli con LGX 100 μ M;

La figura 7B(1) muestra la concentración 10^3 de E.coli con LGX 100 μ M;

Figura 7B(2) (valor del eje Y disminuido): concentración 10^3 de E.coli con LGX 100 μ M;

La figura 7C(1) muestra la concentración 10^2 de E.coli con LGX 100 μ M;

65 La Figura 7C(2) muestra (valor del eje Y disminuido): concentración 10^2 de E.coli con LGX 100 μ M;

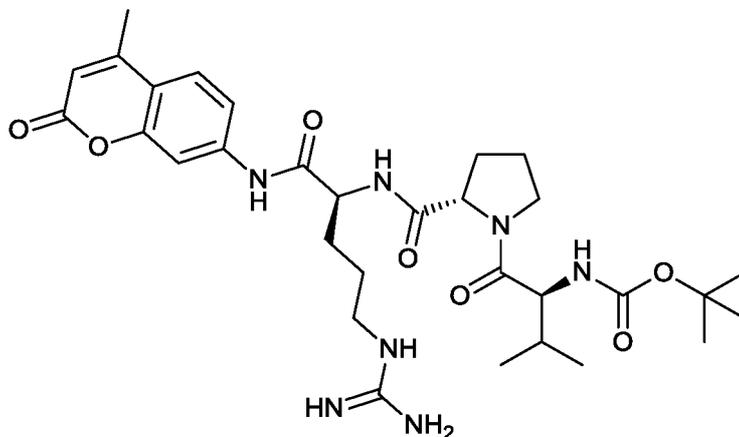
La figura 8A(1) muestra la concentración 10^6 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 50 μ M;

- La figura 8A(2) muestra (valor del eje Y disminuido): la concentración 10^6 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 50 μM ;
- La figura 8A(1) muestra la concentración 10^5 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 50 μM ;
- 5 La figura 8B(2) muestra (valor del eje Y disminuido): la concentración 10^5 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 50 μM ;
- La figura 8C(1) muestra la concentración 10^3 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 50 μM ;
- La Figura 8C(2) muestra (valor del eje Y disminuido): la concentración 10^3 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 50 μM ;
- 10 La figura 8D(1) muestra la concentración 10^2 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 50 μM ;
- La Figura 8D(2) muestra (valor del eje Y disminuido): la concentración 10^2 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 50 μM ;
- La figura 9A(1) muestra la concentración 10^4 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 100 μM ;
- La figura 9A(2) muestra (valor del eje Y disminuido) la concentración 10^4 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 100 μM ;
- 15 La figura 9B(1) muestra la concentración 10^3 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 100 μM ;
- La figura 9B(2) muestra (valor del eje Y disminuido): la concentración 10^3 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 50 μM ;
- La figura 9C(1) muestra la concentración 10^2 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 50 μM ;
- La Figura 9C(2) muestra (valor del eje Y disminuido): la concentración 10^2 de estafilococos negativos para coagulasa con LGX 50 μM ;
- 20 La figura 10 muestra los efectos de 500 μM de N-t-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina sobre la fluorescencia mediada por estafilocoagulasa en diversas especies bacterianas;
- La figura 11 muestra los efectos de 100 μM de N-t-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina sobre la fluorescencia mediada por estafilocoagulasa en diversas especies bacterianas;
- 25 La figura 12 muestra una comparación directa entre 100 μM y 500 μM de N-t-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina sobre la fluorescencia mediada por estafilocoagulasa en diversas especies bacterianas y LGX 100 μM sobre la fluorescencia mediada por estafilocoagulasa en diversas especies bacterianas;
- La figura 13 muestra concentraciones bacterianas altas de MRSA, MSSA, *S. epidermidis* y *E.coli* con LGX 50 μM ;
- 30 La figura 14 muestra concentraciones bacterianas bajas de MRSA, MSSA, *S. epidermidis* y *E.coli* con LGX 100 μM ; y
- la figura 15 muestra concentraciones bacterianas variables de MRSA, MSSA, *S. epidermidis* y *E.coli* con cumarina 100 μM .
- La figura 16A muestra la detección de *S. aureus* en muestras mediante técnicas estándar y la fluorescencia relativa de las muestras con 100 μM de LGX con 1 X de protrombina a los 15 minutos.
- 35 La figura 16B muestra la detección de *S. aureus* en muestras mediante técnicas estándar y la fluorescencia relativa de las muestras con 100 μM de LGX con 1 X de protrombina a los 30 minutos.
- La figura 16C muestra la detección de *S. aureus* en muestras mediante técnicas estándar y la fluorescencia relativa de las muestras con 100 μM de LGX con 1 X de protrombina a los 60 minutos.
- 40 La figura 17A muestra la detección de *S. aureus* en muestras mediante técnicas estándar y la fluorescencia relativa de las muestras con 100 μM de LGX con 1 X de pretrombina a los 15 minutos.
- La figura 17B muestra la detección de *S. aureus* en muestras mediante técnicas estándar y la fluorescencia relativa de las muestras con 100 μM de LGX con 1 X de pretrombina a los 30 minutos.
- 45 La figura 17C muestra la detección de *S. aureus* en muestras mediante técnicas estándar y la fluorescencia relativa de las muestras con 100 μM de LGX con 1 X de pretrombina a los 60 minutos.
- La figura 18 muestra los valores medios para muestras positivas para *S. aureus* y negativas para *S. aureus*.

Descripción detallada de la invención

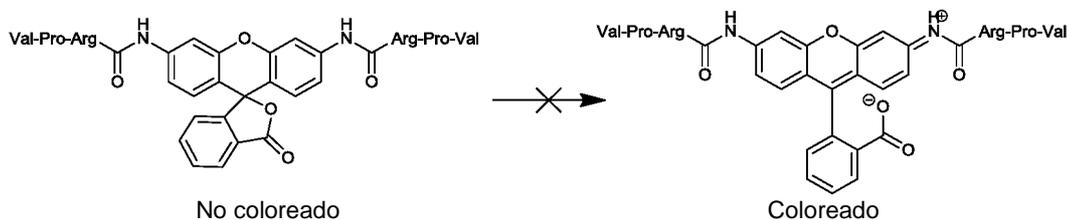
- 50 La presente invención implica el uso de rodamina acoplada al tripéptido Val-Pro-Arg. Esto genera un agente de detección bacteriana para detectar cepas bacterianas productoras de coagulasa. En particular, la presente invención se refiere a sistemas de colorante específicos de coagulasa de *Staphylococcus aureus* que se utilizan como herramienta del punto de atención para detectar MSSA y MRSA dentro de cualquier entorno basado en la atención médica (consulte la Figura 1).
- 55 Las principales ventajas que tiene el sistema de colorante acoplado a sustrato de acuerdo con la presente invención frente a las técnicas de ELISA y de transferencia de western altamente específicas y fiables para la identificación de proteínas son;
- 60
- no es necesario el uso de anticuerpos monoclonales caros;
 - no es necesario el uso de reactivos para el desarrollo de placas;
 - no hay tiempo de incubación prolongado para cultivo celular o preenriquecimiento;
 - detección rápida (cantidades en partes por billón de, por ejemplo, rodamina son visibles a simple vista);
 - se puede usar para detectar enzimas en múltiples matrices, por ejemplo, incluyendo directamente en las superficies
- 65
- potencial para una sensibilidad igualmente alta a las técnicas de PCR / ELISA

El método molecular existente se basa en la detección de coagulasa de MRSA / MSSA. Boc-Val-Pro-Arg-7-AMC (véase más adelante) se notificó primero en 1977 (Ford *et al*).



5 El tripéptido se había identificado como un sustrato que imita el fibrógeno y la escisión del tripéptido a partir de la aminometilcumarina (AMC) por el complejo de coagulasa de MRSA da como resultado un cambio en la fluorescencia y el espectro UV del compuesto. Este cambio puede usarse para identificar la coagulasa y, en consecuencia, el MRSA. Uno de los inconvenientes es la sensibilidad, que requiere técnicas de cultivo celular (24 horas), para que
 10 cantidades suficientes de coagulasa se expresen externamente para que la detección sea posible. El otro inconveniente es que no hay cambio de color observable para el ojo humano. Otro problema es el alto costo del Boc-Val-Pro-Arg-7-AMC (Sigma-Aldrich), suficiente para la prueba de solo un pequeño número (<5) de muestras.

15 La elección de la rodamina como cromóforo se basa en su capacidad de coexistir como un zwitterión rojo o lactona incolora. Este interruptor se explota uniendo un enlace peptídico a los grupos de amina rodamina colgantes, convirtiéndolos así en grupos amida deficientes en electrones, haciendo que la estructura zwitteriónica coloreada no pueda formarse. Tras la escisión del enlace o enlaces amida, la forma zwitteriónica, que se prefiere en solución acuosa, se formará automáticamente, garantizando un cambio sustancial en el color, desde incoloro hasta amarillo fluorescente.
 20



25 Se sabe que la secuencia del tripéptido Val-Pro-Arg es un sustrato reconocible para la estafilotrombina, un complejo formado por la expresión de SA de la estafilo-coagulasa y la protrombina. El complejo de estafilotrombina confunde el tripéptido con una parte de la proteína del fibrógeno, que convierte en fibrina. La actividad de la amidasa del complejo de estafilotrombina es específica de esta secuencia tripeptídica como se indicó en investigaciones previas y el uso de este compuesto y es la base de la prueba actual de coagulasa en tubo comercial.

30 LGX es un compuesto que funciona más o menos de la misma manera, pero funciona como un ensayo de estafilotrombina que es mucho más sensible a una concentración dada de estafilotrombina y, por lo tanto, al número de unidades formadoras de colonias SA.

35 La estimación de sensibilidad mejorada se basa en la presencia de dos tripéptidos de sustrato en una molécula de colorante, duplicando esencialmente la concentración y el hecho de que los colorantes de cumarina tienen un coeficiente de extinción de 20.000 (aunque no dentro de la región visible), comparado con el coeficiente de extinción de rodamina de 110.000.

40 Los colorantes comerciales actuales absorben en la región UV a 372 nm y, por lo tanto, no hay resultados visibles de cambio de color y la espectrofotometría de fluorescencia se debe usar para detectar la pérdida del tripéptido. En el caso del nuevo compuesto LGX, es posible detectar un cambio dentro de la región visible (488 nm) y, por lo tanto, se pueden usar espectrofotómetros de colorimetría más económicos.

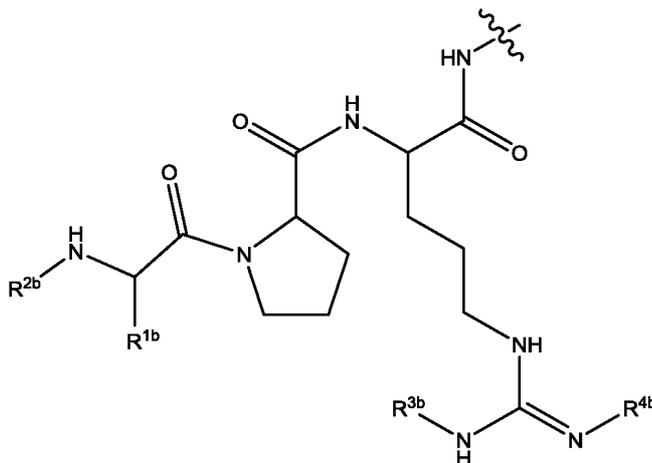
45 Para una mayor sensibilidad, sin embargo, LGX también tiene un perfil de fluorescencia distinto, que también puede explotarse. La sensibilidad mejorada de LGX significa que la misma cantidad de estafilotrombina (y, por lo tanto,

unidades formadoras de colonias de SA) se puede determinar en un período de tiempo mucho más corto. Una visión alternativa es que podrían identificarse cantidades más pequeñas de bacterias SA durante el mismo período de tiempo.

- 5 LGX funciona como un ensayo de estafilotrombina para su uso en la detección de MRSA y MSSA y es 10 veces más sensible que el sistema de colorantes comerciales existentes.

- 10 Debe apreciarse que el compuesto, el método y el kit de la invención se pueden usar para detectar MSSA y MRSA dentro de cualquier entorno basado en la asistencia sanitaria o entorno agrícola. El compuesto, el método y el kit de la invención también se pueden usar para detectar MSSA y MRSA en cualquier producto alimenticio o de bebida.

En la presente invención R^7 de fórmula I está representado por



- 15 y R^{1a} y R^{1b} son isopropilo.

En una realización preferida, X es C(O).

- 20 En una realización preferida, Y es O, S o NH, preferentemente O.

- 25 En una realización preferida, R^{2a} y R^{2b} son cada uno independientemente -H, $-OR^a$, $-C(O)R^a$, $-C(O)OR^b$, preferentemente $C(O)R^a$ o $-C(O)OR^b$, preferentemente, en la que R^a y R^b son cada uno independientemente un metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo, preferentemente isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo o terc-butilo, de la forma más preferente terc-butilo. En una realización, R^{2a} y R^{2b} son idénticos.

- 30 En una realización preferida, R^{3a} y R^{3b} son cada uno independientemente un -H, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo o terc-butilo, preferentemente -H, metilo o etilo, de la forma más preferente -H. En una realización, R^{3a} y R^{3b} son idénticos.

- 35 En una realización preferida, R^{4a} y R^{4b} son cada uno independientemente un -H, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo o terc-butilo, preferentemente -H, metilo o etilo, de la forma más preferente -H. En una realización, R^{4a} y R^{4b} son idénticos.

- 40 En realizaciones en las que cualquiera de los grupos sustituyentes son arilo o C_{1-6} alquilo, o contienen un grupo arilo o alquilo C_{1-6} , el grupo arilo o alquilo C_{1-6} puede estar sustituido con uno o más sustituyentes halo. En realizaciones preferentes, están sustituidos con de 1 a 10 sustituyentes halo, más preferentemente de 1 a 7 y, de la forma más preferente, de 1 a 4.

- 45 En una realización preferida, n es 0 o 1, preferentemente 0.

En una realización preferida, m es 0 o 1 para ambos R^{6a} y R^{6b} , preferentemente 0.

- 50 Cuando R^5 está presente, puede ocupar cualquier posición vacante en el anillo de arilo. En realizaciones preferidas R^5 ocupa la posición -meta y / o -para del anillo de arilo.

En una realización preferida:

- X es C(O);
Y es O, S o NH, de la manera más preferente O;

R^{1a} y R^{1b} son isopropilo;

R^{2a} y R^{2b} son cada uno independientemente un C(O)R^a o -C(O)OR^b, en la que R^a y R^b son cada uno preferentemente isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo o terc-butilo, de la forma más preferente terc-butilo;

R^{3a} y R^{3b} son cada uno independientemente -H, metilo o etilo, de la manera más preferente -H;

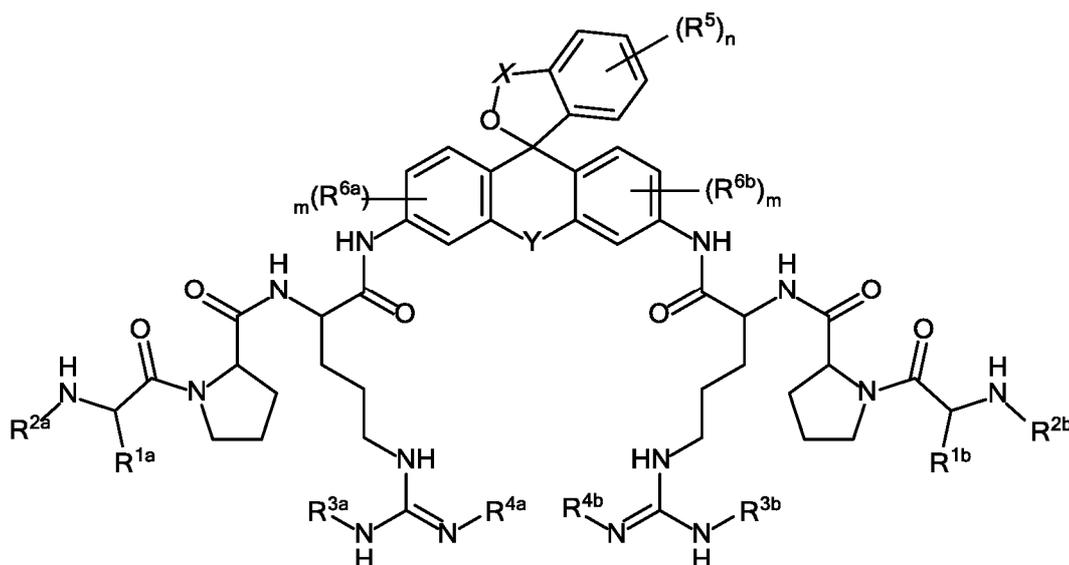
5 R^{4a} y R^{4b} son cada uno independientemente -H, metilo o etilo, lo más preferentemente, -H;

n es 0 o 1, lo más preferentemente 0; y

m es 0 o 1 para ambos R^{6a} y R^{6b}, lo más preferentemente 0.

En una realización preferida se proporciona,

10



en la que

15 X representa C(O) o S(O)_t;

t representa 1 o 2;

20 Y representa O, S, NH o CH₂;

R^{1a} y R^{1b} son isopropilo;

R^{2a} y R^{2b} representan cada uno independientemente H, -C(O)R^a, -C(O)OR^b, -L-arilo o un grupo G;

25 R^{3a}, R^{3b}, R^{4a} y R^{4b} representan cada uno independientemente H, -NO₂, -OH, -C(O)R^c o alquilo C₁₋₆, en el que el último grupo pueden estar opcionalmente sustituido con uno o más halo;

cada R⁵ representa independientemente halo, -OR^d, -C(O)R^e, arilo o alquilo C₁₋₆, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

30

y/o dos grupos R⁵ cualesquiera pueden unirse entre sí para formar, junto con los átomos de carbono a los que están necesariamente unidos, un grupo cicloalquilo o arilo de 5 o 6 miembros, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

35 n representa de 0 a 4;

cada R⁶ representa independientemente -N(H)R^f, -N(R^g)R^h, C(O)R^h, -ORⁱ, arilo o alquilo C₁₋₆, en el que los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

40 cada m representa independientemente de 0 a 3;

cada R^a a Rⁱ representa independientemente alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido con uno o más halógeno;

L representa un enlace directo o CH₂;

45

G representa cualquier aminoácido que puede estar sustituido adicionalmente.

En una realización de la presente invención cuando:

X = C(O);

Y=O;

5 R^{1a} y R^{1b} son cada uno isopropilo;
 R^{3a} , R^{3b} , R^{4a} y R^{4b} son cada uno H; y

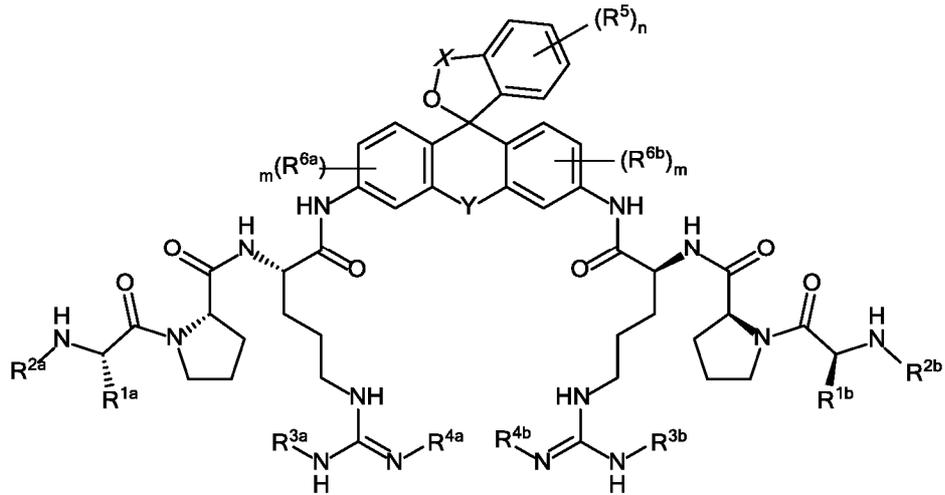
n es 0 para R^5 ; y

m es 0 para R^{6a} y R^{6b} ;

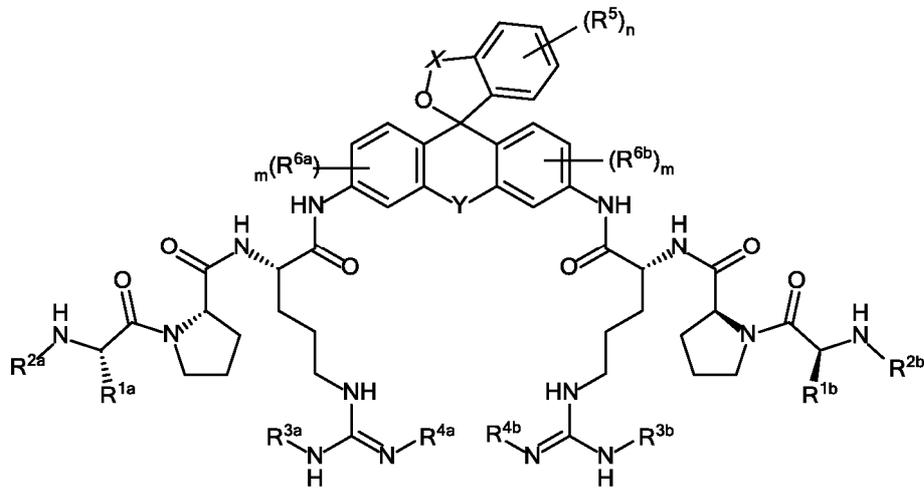
R^{2a} y R^{2b} no pueden estar representados cada uno por Cbz.

10

En una realización más preferente, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula III:

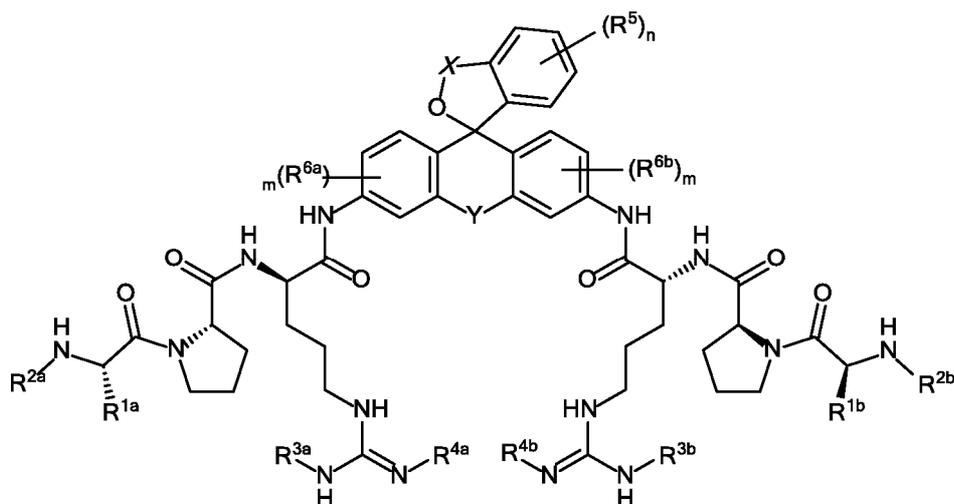


15 En otra realización se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula IIIa:



En una realización adicional se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula IIIb:

20



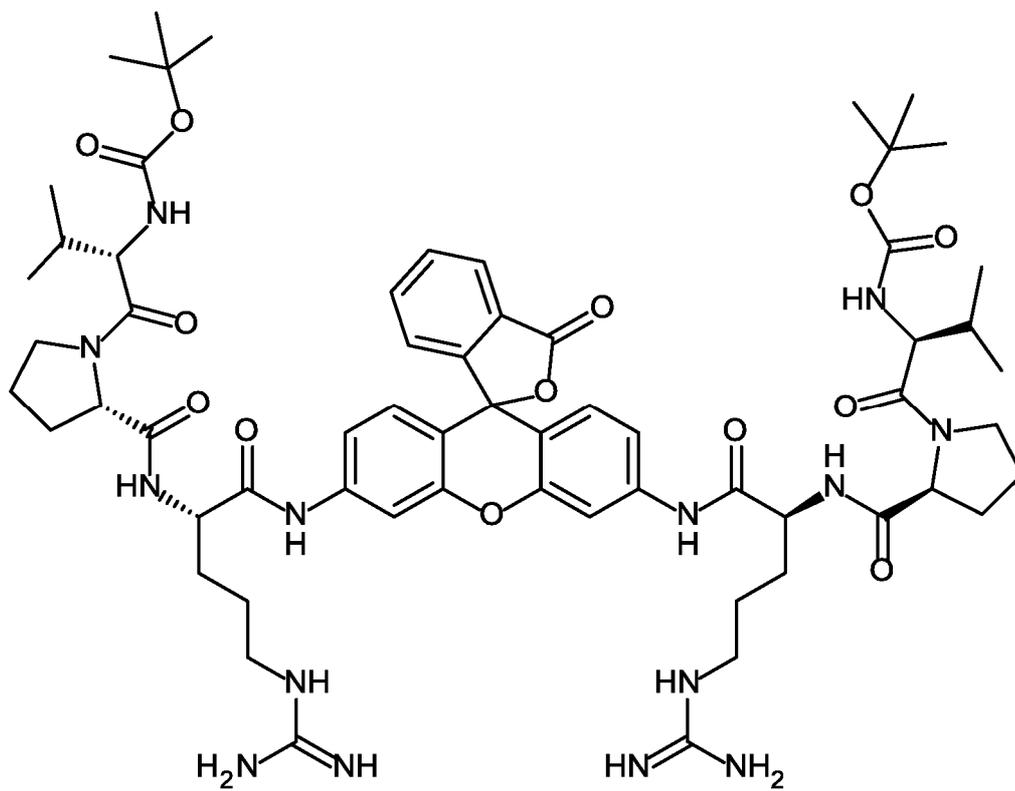
En un aspecto de la presente invención, se proporciona una mezcla de los compuestos representados por la fórmula III, la fórmula IIIa y la fórmula IIIb opcionalmente en las que:

- 5 el compuesto de Fórmula III está presente en una cantidad de aproximadamente 95,0 % a aproximadamente 100 % en peso de la mezcla;
 el compuesto de Fórmula IIIa está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5,0% en peso de la mezcla; y
 10 el compuesto de Fórmula IIIb está presente en una cantidad de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 % en peso de la mezcla.

Por ejemplo, el compuesto de Fórmula III está presente en una cantidad de aproximadamente 97,0% a aproximadamente 99,5% en peso de la mezcla;

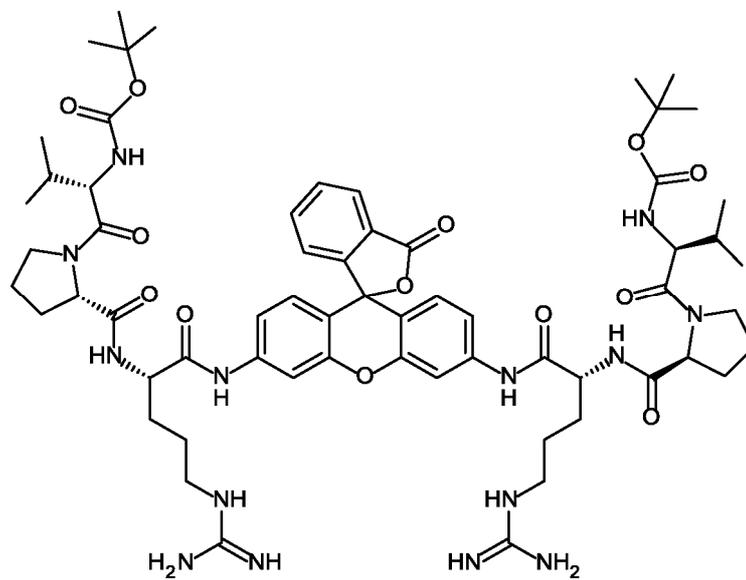
- 15 el compuesto de Fórmula IIIa está presente en una cantidad de aproximadamente 1,0% a aproximadamente 3,0% en peso de la mezcla; y
 el compuesto de Fórmula IIIb está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,05% en peso de la mezcla.

- 20 En una realización particularmente preferida, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula II:

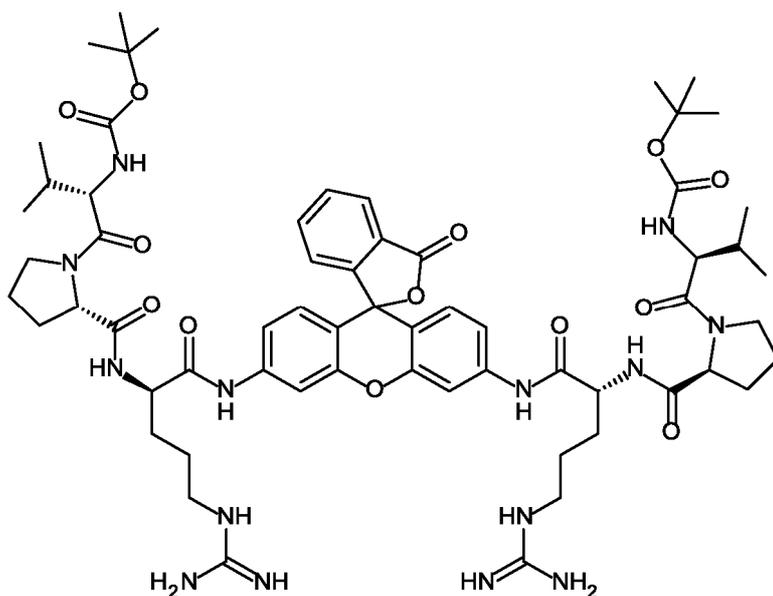


Fórmula II

5 En otra realización se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula IIa y la fórmula IIb:



Fórmula IIa



Fórmula IIb

5 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una mezcla de los compuestos representados por la fórmula II, la fórmula Ila y la fórmula IIb opcionalmente en las que:

el compuesto de Fórmula II está presente en una cantidad de aproximadamente 95,0 % a aproximadamente 100 % en peso de la mezcla;

10 el compuesto de Fórmula Ila está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5,0 % en peso de la mezcla; y

el compuesto de Fórmula IIb presente en una cantidad de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 % en peso de la mezcla.

15 PARTE EXPERIMENTAL

Para asegurar que el efecto de la estafilocagulasa sobre el potencial de fluorescencia de los compuestos de la presente invención no era un fenómeno específico de la cepa y era de hecho una reacción específica de especie, se cultivaron varios aislados clínicos de MRSA (nombre de la muestra 1-3-12,13,15-17, 19-20 ambos incluidos), MSSA (nombre de la muestra 58-59,61-64,66-69, 71,74 y 65-78 ambos incluidos), y 68-76), *E.coli* (nombre de la muestra 1-11,12,15 y 17, y la cepa 1 NTCT) y especies de estafilococos negativos para la coagulasa (*S. epidermidis* 1-4, *S.epidermidis* negativo para coagulasa (SNC), *S. hominus*, *S. warneri*, *M. Luteus* y 2 cepas de laboratorio de *S. epidermidis* en agar nutriente antes de cultivar durante la noche en caldo nutritivo en condiciones de agitación a 37 °C. Cada muestra se aclaró generosamente en 1 X PBS estéril y se generaron concentraciones variables de suspensión bacteriana de 10^0 - 10^6 mediante dilución en serie en 1 x PBS. Además, los cultivos bacterianos se mantuvieron adicionalmente en agar nutritivo para evaluar el estado de la coagulasa del aislado.

Para determinar los efectos de concentraciones bacterianas variables con respecto a cepas bacterianas y las concentraciones de los compuestos de acuerdo con la presente invención sobre la actividad de estafilocagulasa, se prepararon soluciones de 100 y 50 μ M que contenían LGX en 1 x PBS con la adición de Tampón Tris 0,05 M y NaCl 0,1 M para mantener un pH de 8,5 usando LGX disuelto en MeOH de modo que la concentración final de metanol no sea más de 2,5 %. Además, se añadió a la solución una concentración apropiada (100 μ M y 50 μ M, respectivamente) de protrombina humana.

35 Se añadieron 90 μ l de solución preparada de LGX 50 μ M o 100 μ M a concentraciones variables de bacterias (10^6 , 10^5 , 10^3 , 10^2 y 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^0 respectivamente) en una placa de microtitulación y la actividad de estafilocagulasa determinada por espectrofotometría de fluorescencia que exhibe excitación a 488 nm y emisión a 525 nm a intervalos de 15 minutos durante un período de tiempo de 6 horas. El lector de placas utilizado fue un Fluostar Optima y las placas utilizadas fueron placas Nunclon Surface de 96 pocillos. Los controles positivos para cada experimento fueron una cepa de MRSA y el control negativo para cada experimento fue una cepa de *E. coli*, ambos se seleccionaron al azar para asegurar que no hubiera sesgo dentro de los datos. Una relación 1:1 de la solución de LGX con PBS también se analizó como muestra de "LGX individualmente", que se ha designado como una línea negra en los gráficos siguientes. n= 3 cultivos se analizaron en cada caso.

45 En conjunto con todos los ensayos fluorométricos que usan LGX, se determinó el estado positivo / negativo / falso

positivo de la coagulasa presente en cada aislamiento bacteriano respectivo, usando un kit de prueba de estafilasa (Oxoid), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las cargas completas de bacterias, que se habían cultivado durante la noche en agar, se analizaron basándose en la aglutinación mediada por coagulasa de las células de sangre ovina sensibilizadas con fibrinógeno. A diferencia de ser un ensayo colorimétrico o fluorométrico, que proporciona una coagulación visible instantánea de los reactivos después de la exposición a las bacterias. n = 3 cultivos se analizaron en cada caso.

Para asegurar que el efecto de la estafiloagulasina sobre el potencial de fluorescencia del compuesto LGX no era un fenómeno específico de la cepa y era de hecho una reacción específica de especie, se analizaron 20 aislados clínicos de MRSA en las mismas condiciones que se detallaron anteriormente, y se les designó con la nomenclatura MRSA 1-20. Usando la prueba de estafilasa, se confirmó que todos los aislados eran positivos para coagulasa. Como se puede observar en la Figura 2A - 2D, en la que la concentración de LGX estaba en 50 μM y la concentración bacteriana era 10^6 , 10^5 , 10^3 y 10^2 , existe un considerable grado de variación en la eficacia del compuesto con respecto a la fluorescencia que alcanza su máximo a lo largo del tiempo en diferentes cepas bacterianas, sin embargo, a un concentración bacteriana 10^6 , el nivel máximo se alcanzó en 2 horas para todas las muestras, mientras que a 10^5 , 10^3 y 10^2 , la fluorescencia tiende a alcanzar el máximo en diferentes momentos.

Es evidente a partir de estos resultados que a altas concentraciones bacterianas de algunas cepas de MRSA (10^6), hubo una reacción casi instantánea, alcanzando la fluorescencia la lectura máxima de 65.000 UFR en 2 horas en la mayoría (90 %). El 10 % de las muestras no alcanzó el máximo, sin embargo, estas fueron significativamente más altas que el LGX solo y el control negativo en varios órdenes de magnitud. A una concentración más baja (10^5) de ambos MRSA, se observó un aumento más gradual en la fluorescencia, alcanzando la fluorescencia la lectura máxima de 65.000 UFR en 2 horas en la mayoría (60 %). Sin embargo, el 20 % de las muestras no alcanzó la fluorescencia máxima, en 5 horas, no obstante, todavía hay una discriminación altamente significativa entre estas cepas "más lentas" que el control negativo incluso a las 6 horas.

A una concentración aún más baja (10^3 y 10^2) de muestras de MRSA, se observó un aumento más gradual en la fluorescencia, alcanzando la fluorescencia la lectura máxima de 65.000 UFR en 4 horas en la mayoría (60 % y 40 %, respectivamente). Sin embargo, el 40 % y el 60 % de las muestras, respectivamente, no alcanzó la fluorescencia máxima, en un marco de tiempo de 6 horas del experimento, de nuevo todavía existe una discriminación altamente significativa entre estas muestras a las 6 horas. Es importante señalar que, a pesar de la gran variación en la eficacia a través de las cepas bacterianas, la fluorescencia es aún significativamente más alta en todas las muestras cuando se compara con el control negativo, en las que la fluorescencia permanece constantemente baja durante el período de tiempo de 6 horas.

Además, usando utilizando concentraciones bacterianas más altas (100 μM) de LGX y más bajas (10^4 , 10^3 y 10^3), como se demuestra en la Figura 3A-D, los resultados fueron consistentes con lo observado en las Figuras 2A-D, de modo que a concentraciones bacterianas más altas, la fluorescencia alcanzó sus límites superiores en 2 horas en el 50 % de las muestras (10^4), en el 40 % de las muestras en 3 horas (10^3) o en 4 horas en el 40 % de las muestras (10^2). Durante el período de tiempo de 6 horas, el 90 % de MRSA a una concentración de 10^4 alcanzó la fluorescencia máxima, mientras que a concentraciones más bajas de 10^3 y 10^2 , el 40 % de los aislados no logró alcanzar la fluorescencia máxima, sin embargo, se puede observar una distinción entre las cepas de MRSA y el control negativo y LGX solo en todos los casos, por lo que el control negativo se mantuvo bajo y no demostró ningún aumento en el tiempo.

Se analizaron 20 aislados clínicos de MRSA en las mismas condiciones que se detallaron anteriormente y se les designó con la nomenclatura MSSA 58-65 y 68-76. Usando la prueba de estafilasa, se confirmó que todos los aislados eran positivos para coagulasa. Como se puede observar en la Figura 4A - D, en la que la concentración de LGX estaba en 50 μM y la concentración bacteriana era 10^6 , 10^5 , 10^3 y 10^2 , existe un considerable grado de variación en la eficacia del compuesto con respecto a la fluorescencia que alcanza su máximo a lo largo del tiempo en diferentes cepas bacterianas, sin embargo, a un concentración bacteriana 10^6 , el nivel máximo se alcanzó en 2 horas, mientras que a 10^5 , 10^3 y 10^2 , la fluorescencia tiende a alcanzar el máximo en diferentes momentos. Es evidente a partir de estos resultados que a concentraciones bacterianas altas de algunas cepas de MRSA (10^6), hubo una reacción casi instantánea, alcanzando la fluorescencia la lectura máxima de 65.000 UFR en todas las muestras 1 hora y 45 minutos.

A una concentración más baja (10^5) de ambos MSSA, se observó un aumento más gradual en la fluorescencia, alcanzando la fluorescencia la lectura máxima de 65.000 UFR en 2 horas en la mayoría (75%). Solo el 5 % de las muestras no alcanzó la fluorescencia máxima, en 6 horas, no obstante, de nuevo, esto fue significativamente más alto que el control negativo y el LGX solo. A una concentración aún más baja (10^3) de muestras de MSSA, se observó un aumento más gradual en la fluorescencia, alcanzando la fluorescencia la lectura máxima de 65.000 UFR en el 25 % de las muestras en 2,5 horas y en 6 horas el 60 % de las muestras había alcanzado la fluorescencia máxima en los 10^3 aislados. En las muestras de concentración 10^2 , ninguna muestra alcanzó la fluorescencia máxima, una vez más, se observó discriminación entre MSSA a esta concentración y el control negativo.

Además, usando utilizando concentraciones bacterianas más altas (100 μM) de LGX y más bajas (10^4 , 10^3 y 10^3),

como se demostró en la Figura 5A-D, los resultados fueron, de nuevo, consistentes con lo observado en las Figuras 2A-D, de modo que a concentraciones bacterianas más altas, la fluorescencia alcanzó sus límites superiores en 1 hora en el 70 % de las muestras (10^4), aún, a esta concentración, el 20 % de las muestras permanecieron por debajo de la fluorescencia máxima, sin embargo, los resultados aún mantenían una diferenciación entre MSSA y el control negativo. El 45 % de las muestras alcanzó la fluorescencia máxima dentro de las 4 horas en las muestras de 10^3 o dentro de 2 horas en el 5 % de las muestras y el 25 % de las muestras durante un período de tiempo de 6 horas (10^2). De nuevo, todas las muestras tanto a 10^3 como a 10^2 demostraron una discriminación significativa entre la presencia de MRSA en cualquier concentración y el control negativo, por lo que el control negativo se mantuvo bajo y no demostró ningún aumento en el tiempo.

Para demostrar aún más el potencial discriminatorio de LGX, entre MRSA y MSSA positivos para coagulasa y especies bacterianas negativas para coagulasa, diversas cepas de *E. coli* y los estafilococos negativos para coagulasa probados se analizaron junto con un control positivo (MRSA). Las figuras 6, A-D (1 y 2) demuestran el efecto de la presencia de concentraciones altas (10^6 , 10^5 , 10^3 y 10^2) de cepas de *E. coli* sobre la escisión de amida inducida por fluorescencia de LGX, designado con la nomenclatura *E. coli* 1-20. Es importante tener en cuenta que los gráficos se han separado en 1 y 2, siendo 1 lograr 80000 unidades en el eje Y y 2 demostrando un eje Y que alcanza un máximo de 30000, para ilustrar las diferencias en las unidades de fluorescencia dentro de las muestras de *E. coli* solo.

A las concentraciones de 10^6 , 10^5 y 10^3 , las lecturas de fluorescencia alcanzan un máximo casi inmediatamente o en el plazo de una hora para el control positivo, o a las 6 horas para las concentraciones más bajas, mientras que las cepas negativas para coagulasa de estafilococos permanecen consistentemente bajas y tienden a no desviarse del nivel basal durante todo el tiempo el experimento. En ocasiones, hay casos en los que la fluorescencia cae por debajo del nivel basal, lo que puede ser sugerente de hidrólisis del compuesto o un mecanismo alternativo que puede afectar al potencial de fluorescencia de LGX. Es importante señalar que no hay discriminación entre los estafilococos negativos para coagulasa en ninguna concentración o punto de tiempo, y los resultados se mantienen constantes a lo largo del experimento.

De nuevo, como se demuestra mediante los resultados representados en las Figuras 7A-C (1 y 2), y de acuerdo con los datos presentados en la Figura 4, concentraciones más bajas de las cepas bacterianas respectivas (10^4 , 10^3 y 10^3) se analizaron en presencia de 100 μ M de solución LGX y los resultados tendieron a seguir el mismo patrón, por lo que la fluorescencia, que es relativa a la actividad de estafilocoagulasa, tenía una tendencia a alcanzar un máximo en 3 horas a todas las concentraciones en MRSA, mientras que las cepas bacterianas negativas para coagulasa se mantuvieron consistentemente bajas durante el período de 6 horas.

Las figuras 8, A-D (1 y 2), demuestran el efecto de la presencia de concentraciones altas (10^6 , 10^5 , 10^3 y 10^2) de especies de *S. epidermidis*, cepas de SNC, cepas de laboratorio, *S. Hominus*, *S. Wameri* y *M. luteus*, todos ellos negativos para coagulasa, sobre la escisión de amida inducida por fluorescencia de LGX, en comparación con MRSA positiva para coagulasa. Es importante tener en cuenta que los gráficos se han separado en 1 y 2, siendo 1 lograr 80000 unidades en el eje Y y 2 demostrando un eje Y que alcanza un máximo de 30000, para ilustrar las diferencias en unidades de fluorescencia dentro de muestras de estafilococos individualmente. Usando la prueba de estafilasa, se confirmó que todos los aislados eran negativos para la coagulasa, siendo la excepción *M. luteus*, que se demostró que producía un resultado falso positivo. A las concentraciones de 10^6 , 10^5 y 10^3 , las lecturas de fluorescencia alcanzan un máximo casi inmediatamente o dentro de una hora para el control positivo, mientras que las cepas negativas para coagulasa de estafilococos permanecen consistentemente bajas y tienden a no desviarse del nivel basal durante todo el tiempo el experimento. En ocasiones, hay casos en los que la fluorescencia cae por debajo del nivel basal, lo que puede ser sugerente de hidrólisis del compuesto o un mecanismo alternativo que puede afectar al potencial de fluorescencia de LGX.

Es importante señalar que no hay discriminación entre los estafilococos negativos para coagulasa y el control negativo en ninguna concentración o punto de tiempo, y los resultados se mantienen constantes a lo largo del experimento. De nuevo, como lo demuestran los resultados representados en la Figura 9A-C (1 y 2) y de acuerdo con los datos presentados en la Figura 3, concentraciones más bajas de las cepas bacterianas respectivas (10^4 , 10^3 y 10^3) se analizaron en presencia de 100 μ M de solución LGX y los resultados tendieron a seguir el mismo patrón, por lo que la fluorescencia, que es relativa a la actividad de estafilocoagulasa, tiende a alcanzar un máximo en 3 horas a todas las concentraciones en MRSA, mientras que las cepas bacterianas negativas para coagulasa se mantuvieron consistentemente bajas durante el período de 6 horas.

Los datos que se muestran en este estudio han demostrado ampliamente el uso de LGX para determinar la presencia de MRSA y MSSA en una muestra, en comparación con las cepas bacterianas negativas a la coagulasa. Usando una gran cantidad de aislados, la capacidad de LGX para detectar rápidamente la presencia de estafilocoagulasa en una muestra, que es independiente del cultivo, elimina el potencial para mostrar un resultado falso positivo y puede detectar una concentración baja de bacterias dentro de una muestra, que está basado en el tiempo. Los métodos más tradicionales de detección bacteriana y diagnóstico de infección requieren un cultivo nocturno, seguido de pruebas de laboratorio y pruebas potencialmente más confirmatorias, tales como ELISA y PCR, mientras que este sistema puede proporcionar un potencial para la detección rápida de una bacteria sin la

necesidad de un período de tiempo tan largo, una herramienta de "punto de atención", que facilita el diagnóstico y el tratamiento oportunos de la infección.

Conclusiones

5 A lo largo de un amplio espectro de aislados bacterianos, el uso de este sistema en la identificación de MRSA y MSSA en muestras clínicas o en un entorno de laboratorio no requiere cultivo y puede detectar la presencia de bacterias a concentraciones de tan solo 10^2 .

10 Usando $50 \mu\text{M}$ de LGX y 10^4 y las concentraciones celulares anteriores tanto de MRSA y MSSA, se considera que una lectura de fluorescencia superior a 20.000 en 30 minutos es un resultado positivo, sin embargo, a concentraciones celulares de 10^3 y 10^2 de MRSA y MSSA, el 5 % y el 20 %, de los aislados, respectivamente, no alcanzó este nivel de fluorescencia, en este límite de tiempo de 30 minutos.

15 El aumento de la concentración de LGX a $100 \mu\text{M}$ tiene un efecto significativo sobre la sensibilidad y la selectividad a concentraciones bacterianas más bajas. A la concentración celular de 10^3 células y superior, el 100 % de las muestras de MRSA y MSSA probadas hasta la fecha dieron una lectura de fluorescencia mayor que 20.000 en 30 minutos, lo que indica un resultado positivo. A concentraciones de 10^2 de bacterias, se alcanza una lectura de fluorescencia de 20.000 en 1 hora en el 95 % y el 90 % de las muestras de MRSA y MSSA, respectivamente.

20 No se observó una respuesta por encima de 5000 unidades de fluorescencia en *E. coli* y estafilococos negativos a la coagulasa en concentraciones de $50 \mu\text{M}$ o $100 \mu\text{M}$ de LGX dentro de este marco de tiempo de 1 hora.

25 A una concentración de $50 \mu\text{M}$ de LGX y utilizando todas las concentraciones de bacterias, más del 80 % de MRSA y MSSA muestran una absorbancia significativa de más de 20,000 unidades de fluorescencia después de 1 hora, mientras que el 0 % de *E. coli* y los estafilococos negativos para coagulasa muestran la misma respuesta en el mismo período de tiempo.

30 El potencial de N-t-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina para detectar especies bacterianas variables a concentraciones bacterianas variables

35 Con el fin de comparar y contrastar la eficacia del sistema LGX, con un medio similar y bien establecido para detectar estafilocagulasa (Nt-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina), fue necesario evaluar los mismos espectros de especies bacterianas y concentraciones bajo los mismos parámetros utilizados en el sistema LGX y también utilizando los mismos métodos que ya se han caracterizado (Ford *et al*, 1999). Como ya se ha demostrado, el sistema LGX detecta eficazmente concentraciones bacterianas bajas a una concentración relativamente baja de compuestos y también distingue de manera potente entre MRSA y MSSA positivo a coagulasa y *E.coli* y *S. epidermidis* negativos para coagulasa.

40 Como se ha descrito para el sistema LGX, se cultivaron aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA), *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli* en agar nutritivo antes de cultivar durante la noche en caldo nutritivo en condiciones de agitación a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Para determinar los efectos de concentraciones bacterianas variables con respecto a las cepas bacterianas y las concentraciones de Nt-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina sobre la actividad de estafilocagulasa, una comparación directa entre el sistema LGX y el uso existente de Nt-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina como medio para detectar estafilocagulasa era necesaria (Ford *et al*, 1999).

45 Se prepararon soluciones de $100 \mu\text{M}$ y $500 \mu\text{M}$ de una solución de cumarina en 1 x PBS con la adición de Tampón Tris 0,05 M y NaCl 0,1 M para mantener un pH de 8,5 usando N-t-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina disuelto en MeOH. Además, se añadió a la solución una $100 \mu\text{M}$ y $500 \mu\text{M}$ de protrombina humana. $90 \mu\text{l}$ de $50 \mu\text{M}$ o $100 \mu\text{M}$ de la solución de N-t-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina a concentraciones variables de bacterias (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^0 , respectivamente) en una placa de microtitulación y la actividad de estafilocagulasa se determinó mediante espectrofotometría de fluorescencia (excitación de 355 nm, emisión de 460 nm) a intervalos de 15 minutos en un periodo de tiempo de 6 horas. En cada caso se analizaron al menos N= 3 cultivos. Al igual que con el sistema LXG, el lector de placas utilizado fue un Fluostar Optima y las placas utilizadas fueron placas Nunclon Surface de 96 pocillos.

50 La Figura 10 demuestra el efecto de la presencia de concentraciones variables de MRSA, MSSA, *S. epidermidis* y *E.coli* sobre la fluorescencia de $500 \mu\text{M}$ de Nt-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina, usando los mismos parámetros que se usan en el sistema LGX. Es evidente a partir de estos resultados que a concentraciones bacterianas altas de todas las especies bacterianas (10^6), hubo poca discriminación entre la fluorescencia de todas las muestras, lo que es ciertamente lo contrario de lo que se observa en el sistema LGX, con la excepción de MSSA en 10^6 , por lo que se observó un ligero aumento, pero fue significativamente menor de lo que se observaría usando LGX. Además, a concentraciones altas y bajas de MRSA, MSSA, *S.epidermidis* y *E.coli*, no se observó aumento de la fluorescencia y los resultados se mantuvieron consistentemente bajos para todas las especies bacterianas durante el período de tiempo de 6 horas, lo que demuestra que el uso de Nt-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina no

tiene el potencial de discriminar entre especies bacterianas a concentración baja.

La figura 11 demuestra el efecto de la presencia de concentraciones variables de MRSA, MSSA, *S. epidermidis* y *E. coli* sobre el potencial de fluorescencia de 100 μM de Nt-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina. De nuevo, se puede observar que a concentraciones bacterianas altas de MRSA y MSSA (10^6 y 10^5), no hay discriminación entre las muestras bacterianas y este patrón prevalece a concentraciones bacterianas más bajas en todas las especies bacterianas. De nuevo, a diferencia del sistema LGX, y de acuerdo con los datos presentados en la Figura 10, concentraciones excepcionalmente altas de Nt-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina no fueron capaces de distinguir entre especies bacterianas a concentraciones bajas durante un período de tiempo de 6 horas.

La figura 12 muestra la comparación entre 100 y 500 μM de N-t-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina y 100 μM de LGX en MRSA, MSSA, *E. coli* y *S. epidermidis* a una concentración de 10^2 , que se consideraría un nivel "normal" de bacterias. Es muy evidente que en las muestras de MRSA y MSSA a esta concentración, no hay comparación entre el sistema de LGX y -t-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina, el uso de LGX produce, con mucho, una respuesta superior en términos de selectividad y velocidad a una concentración más baja que la del sistema de cumarina.

El sistema de LGX facilita la producción de una respuesta de fluorescencia instantánea e incrementada, incluso a concentraciones bacterianas muy baja y tiene el potencial de determinar la presencia de MRSA y MSSA mucho más significativamente que Nt-BOC-val-pro-arg-7-amido -4-metilcumarina. La velocidad y la selectividad del sistema de LGX, como se demuestra en estos datos, muestran que este nuevo sistema puede demostrar ser una herramienta vital en la detección de bacterias positivas a la coagulasa, más que los sistemas que ya están en funcionamiento.

La síntesis de la primera generación del prototipo de molécula activa (LGX) se ha logrado utilizando la síntesis de péptidos en fase líquida, aprovechando los reactivos de acoplamiento altamente reactivos Oxyma, COMU® y EDCI. En primer lugar, la rodamina se acopla adecuadamente a un resto de arginina adecuadamente protegido (Boc-(Z)-Arg) utilizando EDCI y Oxyma en piridina/DMF. Los dos grupos protectores de Boc se eliminan utilizando TFA, antes de acoplar Rhod(Arg(Z)₂NH₂)₂ adicionalmente al dímero peptídico protegido con boc (Boc-Val-Pro). Finalmente, la desprotección en condiciones de hidrogenación elimina los grupos protectores de Cbz, lo que da LGX.

Se cultivaron aislados clínicos de *Staphylococcus Aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y otras especies de estafilococos en agar nutritivo antes de cultivar durante la noche en caldo nutritivo en condiciones de agitación a 37 °C. Cada muestra se aclaró generosamente en 1 X PBS estéril y se generaron concentraciones variables de suspensión bacteriana de 10^0 - 10^6 mediante dilución en serie en 1 x PBS. Además, los cultivos bacterianos se mantuvieron adicionalmente en agar nutritivo para evaluar el estado de la coagulasa del aislado.

Para determinar los efectos de concentraciones bacterianas variables con respecto a cepas bacterianas y las concentraciones de LGX sobre la actividad de estafiloagulasas, se prepararon soluciones de 100 y 50 μM de LGX en 1 x PBS con la adición de tampón Tris 0,05 M y NaCl 0,1 M para mantener un pH de 8,5 usando LGX disuelto en MeOH de modo que la concentración final de metanol no sea más de 2,5 %. Además, se añadió a la solución una concentración apropiada (100 μM y 50 μM , respectivamente) de protrombina humana. A la placa de microtitulación se añadieron 90 μl de solución de LGX a cada aislado bacteriano respectivo a concentraciones variables. La actividad de la estafiloagulasas resultante de la escisión de enlaces amida dentro del compuesto se determinó usando espectrofotometría de fluorescencia que exhibía excitación a 488 nm y emisión a 525 nm a intervalos de 15 minutos durante un período de tiempo de 6 horas. En cada caso se analizaron n = 3 cultivos. El lector de placas utilizado fue un Fluostar Optima y las placas utilizadas fueron placas Nunclon Surface de 96 pocillos.

También se realizaron pruebas para validar que el metanol no tenía efectos adversos sobre el crecimiento de una serie de cepas bacterianas hasta una solución de metanol al ~5 %. Se incubaron concentraciones variables de metanol (0,25 %, 0,5 %, 1 %, 2,5 %, 4 % y 5 %) con cada especie bacteriana también a concentraciones variables (10^2 - 10^6) durante 2 horas antes de la siembra en agar nutritivo para evaluar los efectos del disolvente sobre la viabilidad bacteriana. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C y se contó el número de colonias y se encontró que hasta 4 % de metanol, la viabilidad bacteriana no se vio comprometida en todas las concentraciones de bacterias, proporcionando de este modo, la concentración óptima para mantener la solubilidad del compuesto y asegurar una viabilidad celular bacteriana del 2,5 %.

Para comparar la eficacia de este ensayo de estafiloagulasas con los métodos de detección de coagulasa "de referencia" actuales y bien establecidos, tal como un ensayo de cumarina, prueba de coagulasa y prueba de aglutinación de látex, se prepararon aislados bacterianos en suspensión como se ha indicado anteriormente y los aislados clínicos de cada cepa se cultivaron durante la noche en agar nutritivo. Se añadieron 90 μl de suspensión bacteriana a una solución que consiste en soluciones 100 μM de N-t-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina preparadas en 1 x PBS con la adición de tampón Tris 0.05 M y NaCl 0.1 M para mantener un pH de 8,5. La actividad de la estafiloagulasas se determinó midiendo la absorbancia a 385 nm a intervalos de 15 minutos durante un período de tiempo de 6 horas. Debe observarse que generalmente se requiere una concentración de 795 μM del colorante de cumarina después del cultivo (10^6 - 10^8 bacterias) para observar una respuesta cromogénica

significativa.

Además, para determinar el estado positivo / negativo / falso positivo de la coagulasa presente en cada aislado bacteriano, se evaluaron cargas completas de cada cultivo respectivo usando un kit de prueba de estafilasa (Oxoid), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit en particular se usa habitualmente en hospitales y laboratorios de investigación y funciona a través de la aglutinación mediada por coagulasa de células sanguíneas ovinas sensibilizadas con fibrinógeno. A diferencia de ser un ensayo colorimétrico o fluorométrico, el kit de estafilasa proporciona una coagulación visible instantánea de los reactivos después de la exposición a las bacterias tras 24 horas de cultivo. En cada caso se analizaron n = 3 cultivos.

La figura 13 demuestra el efecto de la presencia de concentraciones altas de MRSA, MSSA, *S. epidermidis* y *E.coli* sobre el potencial de fluorescencia de 50 µM de LGX después de la escisión mediada por estafilocagulasa de enlaces amida dentro del compuesto. Es evidente a partir de estos resultados que a concentraciones bacterianas altas de MRSA y MSSA (10^6), hubo una reacción casi instantánea, alcanzando la fluorescencia la lectura máxima de 65.000 UFR para cada muestra. Sin embargo, a una concentración más baja (10^5) tanto de MRSA como de MSSA, se observó un aumento más gradual en la fluorescencia, alcanzando la fluorescencia un máximo después de aproximadamente 3 horas. Además, a concentraciones tanto altas como bajas de *S. epidermidis* y *E. coli*, no se observó aumento de la fluorescencia y los resultados se mantuvieron consistentemente bajos para ambas especies bacterianas durante el período de tiempo de 6 horas.

La figura 14 demuestra el efecto de la presencia de concentraciones más bajas de MRSA, MSSA, *S. epidermidis* y *E.coli* sobre el potencial de fluorescencia de 100 µM de LGX después de la escisión mediada por estafilocagulasa de enlaces amida dentro del compuesto. De nuevo, se puede observar que a altas concentraciones bacterianas de MRSA y MSSA (10^4 y 10^3), y concentraciones 10^2 de MSSA, hubo una reacción casi instantánea, alcanzando la fluorescencia la lectura máxima de 65.000 UFR para cada muestra. Sin embargo, a una concentración más baja (10^2) de MRSA, se observó un aumento más gradual en la fluorescencia, alcanzando la fluorescencia un máximo después de aproximadamente 3 horas. Consistente con los datos presentados en la figura 1.1, a concentraciones tanto altas como bajas de *S. epidermidis* y *E. coli*, no se observó aumento de la fluorescencia y los resultados se mantuvieron consistentemente bajos para ambas especies bacterianas durante el período de tiempo de 6 horas.

La figura 15 detalla la eficacia de 100 µM de Nt-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina como medio para detectar estafilocagulasa y para mantener un patrón de detección distinto entre MRSA y MSSA, y *S. epidermidis* y *E. coli*. Como se puede observar, se observa un patrón de absorbancia mayor a concentraciones de 10^6 de todos los tipos de bacterias, sin embargo, hay un pequeño aumento durante el período de 6 horas. Además, a concentraciones de 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 , no hay aumento o varianza entre las cepas bacterianas durante el período de 6 horas, y la absorbancia permanece constante para todas las muestras.

La Tabla 1 muestra los resultados de la prueba de estafilasa en comparación con el sistema de LGX, que se basa en el potencial de aglutinación de especies y cepas bacterianas, para MRSA, MSSA, *E. epidermidis*, *Encolpia* y otras cepas de bacterias negativas para coagulasa conocidas, incluidos *S.hominus*, *S. warneri* y *M.luteus*. El kit utilizado tiene la capacidad de distinguir entre la presencia de cepas bacterianas positivas y negativas a coagulasa, además de determinar si se demuestra que una muestra es un falso positivo. Como se demuestra en la tabla, MRSA y MSSA son bacterias positivas a la coagulasa, como así lo confirma el sistema de LGX de los inventores y la prueba de estafilasa. Se ha demostrado que *S.epidermidis*, *E.coli*, *S.warneri*, *S.hominus* y *M. Luteus* son negativas para coagulasa y tanto LGX como la prueba de estafilasa mostraron que *E.coli* y *S.epidermidis*, *S.warneri* y *S.hominus* dieron negativo para la actividad coagulasa. Sin embargo, *M.luteus* proporcionó un resultado falso positivo usando la prueba de estafilasa, pero mostró que era negativo usando el sistema de LGX.

Tabla 1: Datos de LGX frente a la prueba de estafilasa para la detección de muestras positivas para coagulasa

ESPECIE BACTERIANA	COAGULASA +/-	SISTEMA DE LGX	PRUEBA DE ESTAFILASA
MRSA	+	+	+
MSSA	+	+	+
S.EPIDERMIDIS	-	-	-
E.COLI	-	-	-
S.WARNERI	-	-	-
S.HOMINUS	-	-	-
M.LUTEUS	-	-	Falso positivo

Según estos datos, es evidente que el sistema de acuerdo con la presente invención es superior a lo que ya se ha puesto en práctica para detectar rápidamente la presencia de estafilocagulasa dentro de una muestra bacteriana, que es relativa a la cantidad de bacterias dentro de un cultivo.

Usando el sistema de LGX se observa una respuesta fluorescente inmediata y significativa en presencia de solo 10^2 unidades de *Staphylococcus aureus* a 525 nm (por ejemplo, 488 nm). Esto supera a la N-t-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina en términos de sensibilidad en varios órdenes de magnitud (10^4 bacterias).

5 El sistema de LGX también ofrece una buena selectividad para bacterias positivas a la coagulasa y discrimina rápidamente para SA contra *E. coli* y *S. epidermidis* y otras bacterias comunes, que se ha mostrado que dan resultados insignificantes cuando se prueban con Nt-BOC-val-pro-arg-7 -amido-4-metilcumarina a las bajas concentraciones bacterianas a las que el sistema de LGX muestra una respuesta clara. El cultivo de SA es esencial para su detección mediante la prueba de estafilasa y N-t-BOC-val-pro-arg-7-amido-4-metilcumarina. La presente invención puede detectar SA a concentraciones bacterianas muy bajas y puede usarse en el punto de atención como herramienta de diagnóstico rápido para el cribado de personas, materiales y superficies para SA antes del tipado de la cepa y / o el microanálisis discriminatorio adicional.

15 Además, se ha demostrado que el uso de este método de detección anula la provisión de falsos positivos dentro de una muestra. La detección rápida y las aplicaciones potenciales de este compuesto como medio de cultivo independiente para determinar la presencia de SARM y MSSA proporcionará una herramienta vital en el diagnóstico de esta infección y puede conducir a un tratamiento más rápido y más específico de la enfermedad, lo que demuestra que este sistema tiene un importante potencial de diagnóstico, tanto desde una perspectiva de investigación como clínica.

20 Eficacia de un compuesto y un método de la presente invención, en combinación con protrombina o pretrombina, para detectar *S. Aureus* en muestras de pacientes

25 Este conjunto de experimentos se llevó a cabo para evaluar la eficacia de un método de la presente invención en combinación con protrombina o pretrombina usando muestras de pacientes. Los resultados se verificaron usando tinción de Gram, métodos de cultivo celular y el kit de prueba de estafilasa (oxid).

30 A una población de 113 voluntarios se administró un "conjunto" de hisopos, que comprendía dos hisopos que estaban prehumedecidos con H₂O estéril y un hisopo que estaba seco. Cada voluntario raspó con el hisopo la periferia interna de cada orificio nasal con los dos hisopos humedecidos. Después, cada voluntario raspó con el hisopo la periferia interna de cada orificio nasal con el hisopo seco. Los hisopos se colocaron después en medio de transporte amies para mantener la viabilidad de las células bacterianas. Cada muestra fue anónima y el estudio fue aleatorizado.

35 Se pipeteó una solución de 100 µl de LGX 100 µM con protrombina 1X o pretrombina 1X (tamponada a pH 8,5 con base de Tris y NaCl), en tubos eppendorf estériles de 1,5 ml. Cada hisopo humedecido se colocó en el tubo Eppendorf, y se cortó a una longitud para facilitar el cierre del tubo, con un par de tijeras esterilizadas. Cada tubo se sometió a una agitación enérgica y las puntas del hisopo se extrajeron con pinzas estériles. La solución restante se pipeteó posteriormente en una placa de microtitulación (placas de 96 pocillos Nunclon). La fluorescencia relativa de la muestra se registró a continuación cada quince minutos durante un período de tiempo de seis horas λ_{ex} = 488 nm y λ_{em} = 525 nm).

45 En conjunto con esto, los hisopos restantes (en medio de transporte amies) se transfirieron a placas de agar de sal de manitol precalentado (agar cromogénico para la determinación de *S. Aureus*) y se incubaron durante hasta 48 horas a 37 °C. Se notó el cambio de color y el aspecto de colonia de la bacteria. Un cambio de color de rojo a amarillo demuestra la presencia de *S. aureus*, debido a la fermentación del manitol, provocando un cambio en el pH. Tras esto, se subcultivaron 20 colonias discretas separadas sobre agar nutritivo y también sobre agar de Baird Parker (agar para la determinación de *S. Aureus* y *S. epidermidis*). Después de una incubación de una noche a 37 °C, se observó la morfología y el aspecto de la colonia (las colonias de *S. Aureus* son grandes con un "halo" pálido que rodea a las colonias, las colonias de *S. epidermidis* son pequeñas y negras).

50 Además, los aislados de los hisopos nasales cultivados en agar nutritivo se analizaron para determinar la actividad de la coagulasa usando un kit de prueba de estafilasas (oxid). Las cargas completas de bacterias se analizaron basándose en la aglutinación mediada por coagulasa de las células de sangre ovina sensibilizadas con fibrinógeno. Una bacteria positiva a la coagulasa es indicativa de *S. aureus* y tan solo 1 aislado positivo se considera posteriormente un portador de *S. aureus*.

60 Una prueba final para determinar la identificación de las bacterias dentro de cada muestra, se realizó una tinción de Gram. Esto se basa en la presencia de peptidoglucano en células grampositivas y su capacidad para retener cristal violeta. *S. aureus* es una bacteria grampositiva. En resumen, se colocó una gota de dH₂O estéril sobre un portaobjetos de microscopio y se le aplicó una pequeña cantidad de cultivo y se dejó secar al aire. El portaobjetos se pasó a través de una llama para fijar las bacterias. Se aplicó cristal violeta a cada portaobjetos, seguido de lavado con dH₂O. A continuación se agregó yodo a los portaobjetos, seguido de lavado con dH₂O y la posterior decoloración con etanol y otro lavado con dH₂O. Cada portaobjetos se sometió a contratinción con carbol fushchina (para gramnegativos), se aclaró de nuevo y se dejó secar. Cada portaobjetos se observó para detectar bacterias grampositivas usando un aumento de 40 en un microscopio óptico.

Resultados

Cada muestra de hisopo se examinó para detectar la presencia de *S. aureus* basado en las técnicas de identificación anteriores, y se denominó "positivo" o "negativo". Los resultados se compararon con el hallazgo del ensayo de la presente invención (prueba de LGX), con pretrombina o protrombina, y se representaron gráficamente en un gráfico de barras en función de unidades de fluorescencia relativas.

Las figuras 16A a 16C ilustran los resultados usando LGX 100 μM con 1 X de protrombina a 15, 30 y 60 minutos. El límite del umbral más bajo para unidades de fluorescencia relativa de 20.000 UFR se utilizó para determinar si una muestra era "positiva" o "negativa" para *S. aureus* usando el método de la invención. Este umbral se basó en datos previos utilizando cepas clínicas a una concentración de 10^2 unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ ml^{-1}). Como se puede ver en las Figuras 16A y 16C, aproximadamente 29 muestras dieron positivo para *S. aureus* usando un método de la presente invención después de 15 minutos y aproximadamente 34 muestras probadas fueron positivas para *S. aureus* después de 60 minutos usando un método de la presente invención. Como se ilustra en la Figura 16C, varias muestras dieron negativo para *S. aureus* usando un ensayo de la presente invención, que resultó positivo para *S. aureus* (al demostrar una prevalencia de $\leq 5\%$ de bacterias+ para coagulasa) usando otras técnicas de identificación. Se considera que este resultado de "falso negativo" se debía a que los números de colonia eran insuficientes para producir resultados positivos con el método de la presente invención. En general, el uso de protrombina en el ensayo de la presente invención fue eficiente en la detección *S. aureus* en tan solo 15 minutos.

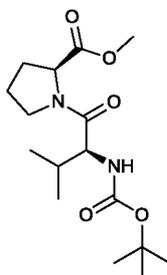
Las figuras 17A a 17C ilustran los resultados usando LGX 100 μM con 1 X de pretrombina a 15, 30, 60 y 120 minutos. El límite de umbral más bajo para unidades de fluorescencia relativa de 20.000 RFU se utilizó para determinar si una muestra era "positiva" o "negativa" para *S. aureus*. Este umbral se basó en datos previos utilizando cepas clínicas a una concentración de 10^2 unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ ml^{-1}). Como se puede ver en las Figuras 17A y 17C, aproximadamente 49 muestras dieron positivo para *S. aureus* tras 15 minutos usando un método de la presente invención y aproximadamente 49 muestras probadas fueron positivas para *S. aureus* después de 60 minutos usando un método de la presente invención. Como se ilustra en la Figura 17C, varias muestras dieron negativo para *S. aureus* usando un ensayo de la presente invención, que resultó positivo para *S. aureus* (al demostrar una prevalencia de $\leq 5\%$ de bacterias+ para coagulasa) usando otras técnicas de identificación. Se considera que este resultado de "falso negativo" se debía a que los números de colonia eran insuficientes para producir resultados positivos con el método de la presente invención. En general, el uso de pretrombina en el ensayo de la presente invención fue eficiente en la detección *S. aureus* en tan solo 15 minutos.

Conclusión

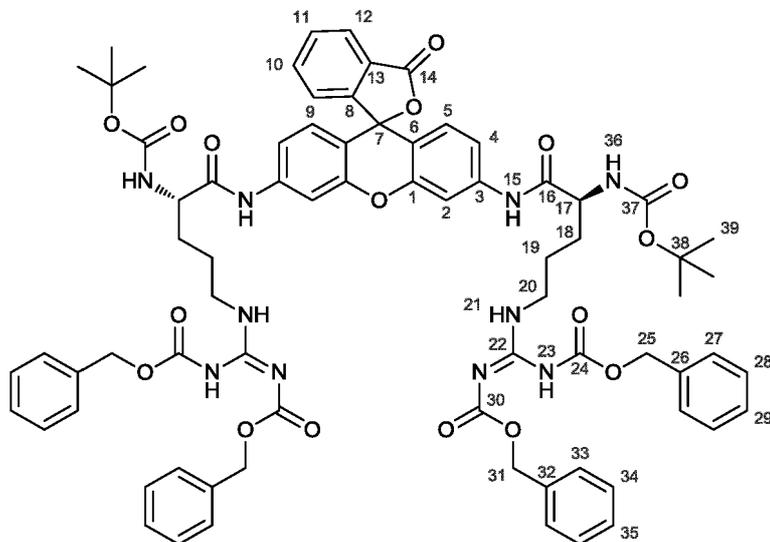
Como se puede observar en las figuras 16 y 17, el uso de pretrombina en el ensayo de la invención proporcionó una sensibilidad y especificidad mayores que el uso de protrombina, es decir, hubo más resultados positivos verdaderos y menos resultados "falsos positivos" y "falsos negativos". Se considera que este resultado se debe al hecho de que la protrombina no se metaboliza tan rápido como la pretrombina y, por lo tanto, no demuestra una especificidad tan potente en términos de detección de bacterias positivas para la coagulasa. Esto se ilustra adicionalmente en la Figura 18, que muestra los valores medidos para muestras positivas para *S. aureus* y negativas en cada intervalo de tiempo usando el método de la invención con protrombina y pretrombina.

PARTE EXPERIMENTAL DE SÍNTESIS

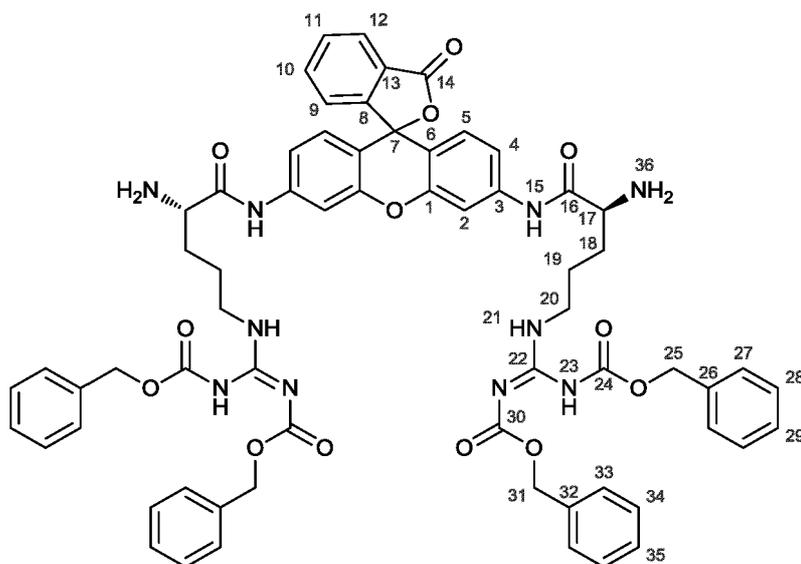
Boc-NH-Val-Pro-OMe



A una solución de NH-Pro-OMe (3,00 mmol, 0,50 g, 1 equiv.) Y Boc-NH-Val-OH (3,00 mmol, 0,65 g, 1 equiv.) en DMF anhidra (6 ml) se añadió NEt_3 (9,00 mmol, 0,91 g, 1,25 ml, 3 equiv.) y la solución se enfrió a $0\text{ }^\circ\text{C}$. A continuación se añadió COMU (3,00 mmol, 1,28 g, 1 equiv.) a la mezcla de reacción y se agitó durante 1 hora a $0\text{ }^\circ\text{C}$ antes de calentar a temperatura ambiente durante 4 horas. La reacción se diluyó a continuación con EtOAc (12 ml), se lavó con NaHCO_3 acuoso saturado (2 x 4 ml), El LiCl acuoso 1 M (2 x 4 ml) se secó sobre NaSO_4 y se concentró para dar el producto como un aceite marrón claro que se usó sin purificación adicional (2,07 mmol, 0,68 g, 69%).

Rho-(Arg-(Z)₂-NHBoc)₂

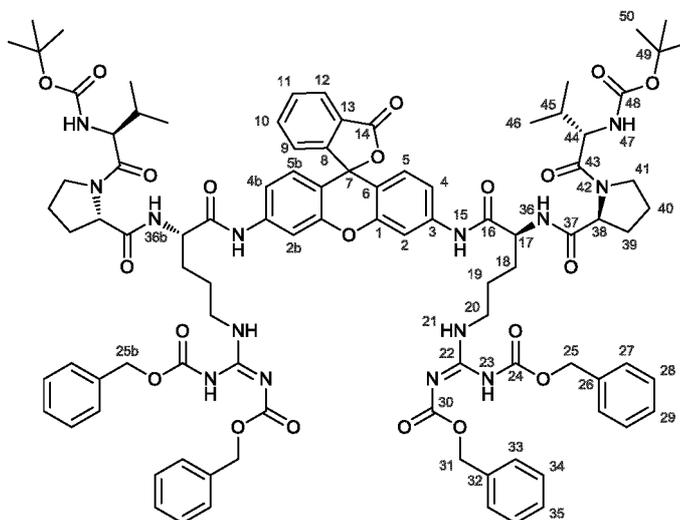
- 5 A una solución de HO-arg(Z)₂NHBoc (4,61 mmol, 2,5 g, 6 equiv.), se añadieron EDCI (4,61 mmol, 883 mg, 6 equiv.), oxima (4,60 mmol, 654 mg, 6 equiv.) en DMF anhidra (5 ml) pero usando piridina anhidra recién destilada (5 ml) seguido de rodamina 110 (0,763 mmol, 280 mg, 1 equiv.) y la solución se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 10 días. La reacción se diluyó a continuación con EtOAc (20 ml), se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (2x10 ml), LiCl acuoso 1M (2 x 10 ml) y CuSO₄ acuoso al 10 % (3 x 10 ml), se secó sobre
- 10 MgSO₄ y se concentró para dar un sólido oleoso verde. Este producto bruto se purificó a continuación por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con 25 % de EtOAc en CHCl₃ para producir el producto en forma de un sólido de color blanco amorfo (0,14 mmol, 200 mg, 18 %): δ_H (400 MHz, CDCl₃), 9,45 (2H, s, ancho, NH-23), 9,29 (2H, s, ancho, NH-21), 9,01 (2H, s, ancho, NH-15), 8,02 (1H, dd, ³J_{HH} = 6,02 Hz, ⁴J_{HH} = 2,01 Hz, CH-12), 7,56 - 7,69 (2H, m, CH-10 y CH-11), 7,43, (2H, s, CH-2), 7,38-7,20 (20H, m, CH-27, CH-28, CH-29, CH-33, CH-34 y CH-35), 7,05 (1 H, dd, ³J_{HH} = 6,02Hz, ⁴J_{HH} = 2,01 Hz, CH-9), 6,77 (2H, d, ³J_{HH} = 6,02Hz, CH-4), 6,69 (2H, dd, ³J_{HH} = 6,02Hz, CH-5), 5,70, (2H, s, ancho, NH-36), 5,30-5,02 (8H, m), CH₂-25 y CH₂-31), 4,39, (2H, m, CH-17) 4,07-3,87 (4H, m, CH₂-20), 1,86-1,62 (8H, m), CH₂-18 y CH₂-19), 1,41 (18H, s), (CH₃)-39); δ_C (100 MHz) 171,1, 171,0, 169,5, 163,6, 160,8, 156,2, 155,7, 153,1, 139,6, 136,4, 135,1, 134,4, 134,4, 129,7, 128,9, 128,8, 128,5, 128,4, 128,3, 128,0, 128,0, 126,2, 124,9, 124,1, 115,4, 114,2, 107,9, 82,4, 80,4, 69,1, 67,2, 54,8, 44,0, 28,5, 28,3, 25,01.
- 20

Rho-(Arg-(Z)₂-NH₂)₂

- 25 A una solución de Rho-(Arg-(Z)₂-NHBoc)₂ (0,14 mmol, 200 mg, 1 equiv.) en DCM (2 ml) se añadió TFA (0.3 ml) y la reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 6 horas. La reacción se inactivó a continuación con NaOH acuoso 1M (1 ml) y se extrajo. A continuación, la capa orgánica se lavó con NaCl acuoso saturado (3 x 1 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró para producir producto en forma de un sólido amorfo que se usó inmediatamente

(0,13 mmol, 156 mg, 94 %).

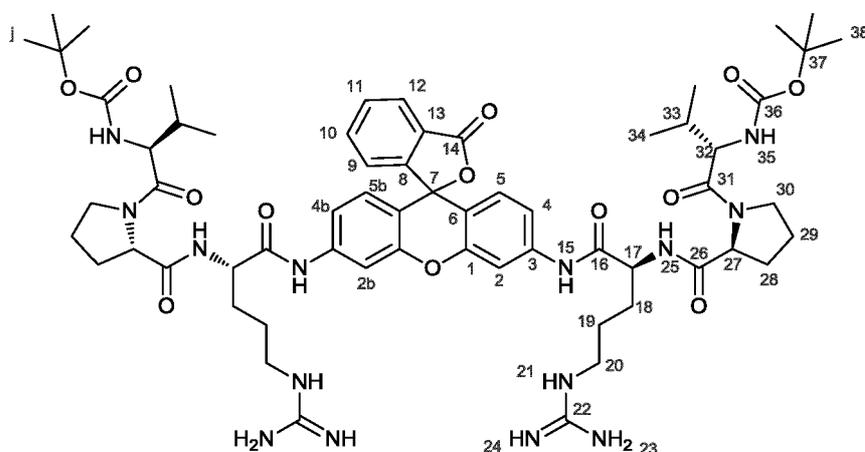
Rho-(Arg-(Z)₂-Pro-Val-NHBoc)₂



5

Una solución de Rho-(Arg-(Z)₂-NH₂)₂ (0,132 mmol, 156 mg, 1 equiv.), HO-Pro-Val-NHBoc (0,264 mmol, 92 mg, 2 equiv.) y NEt₃ (0,396 mmol, 40 mg, 55 μl, 3 equiv.) en DMF anhidra (1 ml) se enfrió a 0 °C antes de la adición de COMU (0,264 mmol, 114 mg, 2 equiv.). La reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 1 hora a 0 °C antes de calentar a temperatura ambiente durante 3 horas adicionales. A continuación, la reacción se diluyó con EtOAc (2 ml), se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 1 ml), LiCl acuoso 1M (3x1 ml) después se secó sobre NaSO₄ y se concentró para dar el producto bruto. El producto se purificó por HPLC preparativa para dar el producto en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,0182 mmol, 32mg, 14 %): δ_H (600 MHz; CDCl₃) 9,42 (2H, m, NH-23), 8,83, (2H, s, NH-21), 8,05 (1H, d, ³J_{HH} = 7,6, CH-12), 7,77 (1H, s, CH-2b), 7,70-7,61 (3H, m), CH-2, CH-10 y CH-11), 7,57 (1H, s, NH-36), 7,51 (1H, s, NH-36b), 7,41-7,36 (10H, m), CH-27, CH-28 y CH-29), 7,34-7,30 (4H, m, CH-33), 7,26-7,20 (6H, m, CH-34 y CH-35), 7,10 (1H, d, ³J_{HH} = 6,4, CH-9), 7,09 (1H, d, ³J_{HH} = 8,4, CH-4), 7,03 (1H, d, ³J_{HH} = 8,4, CH-4b), 6,69 (1H, d, ³J_{HH} = 8,4, CH-5), 6,68 (1H, d, ³J_{HH} = 8,4, CH-5b), 5,27 (4H, s), CH₂-31), 5,20 (2H, d, ³J_{HH} = 12,0, CH₂-25), 5,16 (2H, d, ³J_{HH} = 8,6, NH-47), 5,06 (2H, d, ³J_{HH} = 12,0, CH₂-25b), 4,53 (2H, m), CH-17), 4,34 (2H, m), CH-38), 4,25 (2H, m), CH-44), 4,07 (4H, m, CH₂-20), 3,73 (2H, m), CHH-41), 3,58 (2H, m), CHH-41), 2,07-1,66 (18H, m, -(CH₂)-18, -(CH₂)-19, -(CH₂)-39, -(CH₂)-40, CH-45), 1,47 (18H, s), CH₃-50), 0,97-0,84 (12H, m), (CH₃)-46); δ_C (125MHz; CDCl₃) 172,0, 170,0, 163,5, 161,1, 155,9, 151,6, 140,0, 136,2, 135,0, 134,5, 129,7, 128,9, 128,9, 128,5, 128,5, 128,4, 128,3, 128,2, 128,1, 126,3, 125,1, 123,9, 114,2, 108,2, 82,6, 79,7, 69,2, 67,2, 60,5, 60,3, 57,3, 57,2, 54,0, 47,7, 44,0, 31,3, 29,7, 28,4, 25,2, 25,0, 19,4, 17,5, 17,5, 14,2.

25 **Rho-(Arg-Pro-Val-NHBoc)₂**



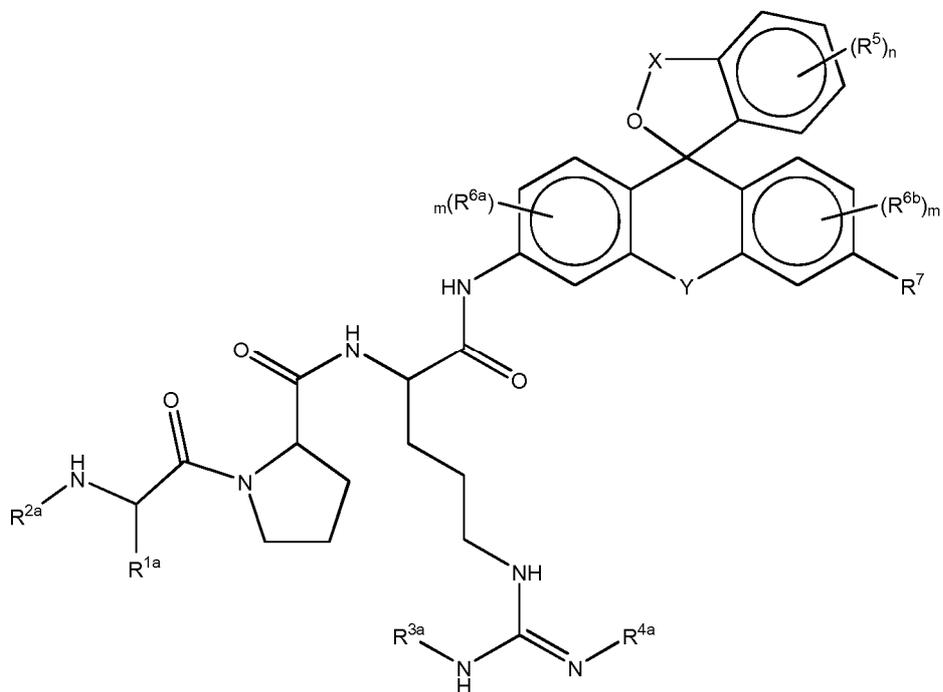
A una solución de Rho-(Arg-(Z)₂-Pro-Val-NHBoc)₂ (0,0182 mmol, 32 mg, 1 equiv.) en DMF anhidra (0,5 ml) y MeOH anhidro (0,5 ml) se añadió Pd/C al 5 % (1 mg) y la mezcla se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 48 horas. A continuación se concentró la mezcla de reacción, se disolvió en metanol y se filtró a través de celite. La concentración dio el producto como un sólido amorfo (0,0140 mmol, 22 mg, 77 %): δ_H(600 MHz; CD₃OD) 10,11 (2H, d, ³J_{HH} = 7,7, NH-24), 8,48 (2H, d, ³J_{HH} = 7,0, NH-25), 8,17 (2H, s, NH-15), 8,05 (1H, d, ³J_{HH} = 7,6, CH-12), 7,89 (1H,

ES 2 655 212 T3

s, CH-2b), 7,82 (1H, s, CH-2), 7,79 (1H, dd, $^3J_{HH} = 8,5$, $^4J_{HH} = 6,9$, CH-11) 7,73 (1H, dd, $^3J_{HH} = 8,5$, $^4J_{HH} = 6,9$, CH-10), 7,41 (2H, s, NH-21), 7,22 (1H, d, $^3J_{HH} = 7,8$, CH-4), 7,21 (1H, d, $^3J_{HH} = 7,8$, CH-9), 7,19 (1H, d, $^3J_{HH} = 7,8$, CH-4b), 6,75 (2H, d, $^3J_{HH} = 7,8$, CH-5), 6,75 (2H, d, $^3J_{HH} = 7,8$, CH-5b), 6,65 (2H, $^3J_{HH} = 7,8$, NH-35), 4,52-4,96 (4H, m, CH-17 y CH-27), 4,20 (2H, m), CH-32), 3,93 (2H, m), CHH-30), 3,70 (2H, m, CHH-30) 3,24 (4H, m, CH₂-20), 2,28 (4H, m, CH₂-18), 2,12 (2H, m, CHH-28), 2,04-1,96 (6H, m, CHH-28, CHH-29 y CH-33), 1,87 (2H, m, CHH-29) 1,45 (18H, s, CH₃-38) 1,01 (6H, m, CH₃-34) 0,96 (6H, m, (CH₃)-34); δ_C (125MHz; CD₃OD) 173,2, 172,2, 171,0, 169,8, 163,8, 157,4, 156,7, 151,5, 140,7, 135,4, 130,0, 128,0, 126,2, 124,6, 123,7, 115,6, 114,1, 107,4, 82,7, 79,2, 73,3, 60,4, 58,0, 53,7, 48,6, 48,3, 44,1,40,7, 35,6, 30,2, 29,4, 29,2, 28,9, 27,3, 24,9, 24,7, 22,3, 18,4, 17,2. (3 picos adicionales para C-2b, C-4b y C-5b); m/z (CI) 618.3317 [M+2H]; HRMS: Hallado 618,3322 (z=2) [M+2H],
 10 C₆₂H₈₆₆N₁₄O₁₃ [M] requiere 1235,4322 (z=1), 617,7161 (z=2).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I,

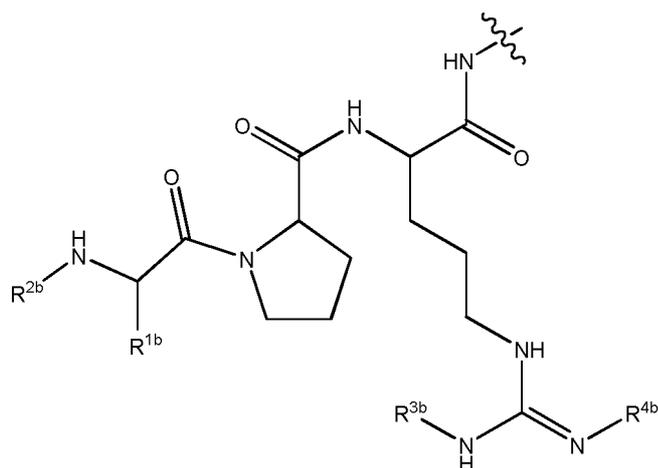


5

en el que

10

X representa C(O) o S(O)_t;
 t representa 1 o 2;
 Y representa O, S, NH o CH₂;
 R⁷ representa



15

20

25

R^{1a} y R^{1b} son isopropilo;
 R^{2a} y R^{2b} representan cada uno independientemente -H, -OR^a, -C(O)R^a, -C(O)OR^b, un grupo G, -L-arilo o alquilo -C₁₋₆, en donde los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;
 R^{3a}, R^{3b}, R^{4a} y R^{4b} representan cada uno independientemente -H, -NO₂, -OH, -C(O)R^c o alquilo C₁₋₆, en donde el último grupo pueden estar opcionalmente sustituido con uno o más halo;
 cada R⁵ representa independientemente -NO₂, -OR^d, -NR^d₂, -SR^d, -C(O)R^e, -C(O)OR^e, -C(O)N(H)R^e, -C(O)NR^e₂, -S(O)₃R^e, -S(O)₂N(H)R^e, -S(O)₂NR^e₂, halo, arilo o alquilo C₁₋₆, en donde los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;
 y/o dos grupos R⁵ adyacentes cualesquiera pueden unirse entre sí para formar, junto con los átomos de carbono a los que están necesariamente unidos, un grupo cicloalquilo o arilo de 5 o 6 miembros, en donde los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

n representa de 0 a 4;

R^{6a} y R^{6b} representan independientemente -NO₂, -N(H)R^f, -N(Rg)R^h, -ORⁱ, -SRⁱ, -C(O)R^h, -C(O)OR^h, -C(O)N(H)R^h, -C(O)NR₂^h, S(O)₃R^h, -S(O)₂N(H)R^h, -S(O)₂NR₂^h, arilo o alquilo C₁₋₆, en donde los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

5 cada m representa independientemente de 0 a 3;

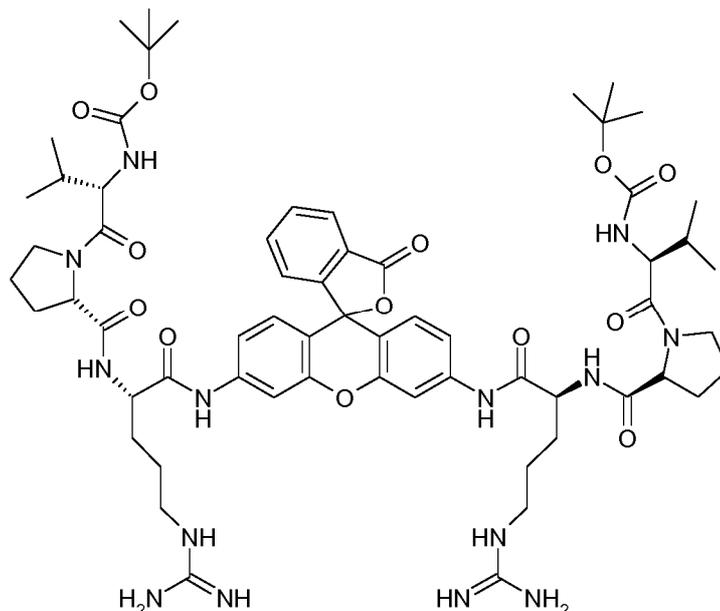
cada R^a to Rⁱ representa independientemente -H, arilo o alquilo C₁₋₆, en donde los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;

L representa un enlace directo o CH₂;

G representa cualquier aminoácido que puede estar sustituido adicionalmente.

10

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la estructura es acorde con la fórmula II:



15 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en la detección de una cepa o cepas bacterianas productoras de coagulasa; en donde la cepa bacteriana es, opcionalmente, *Staphylococcus aureus*; o la cepa bacteriana es, opcionalmente, MRSA o MSSA.

20 4. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para la detección de una cepa o cepas bacterianas productoras de coagulasa; en donde la cepa bacteriana es, opcionalmente, *Staphylococcus aureus*; o la cepa bacteriana es, opcionalmente, MRSA o MSSA.

25 5. Uso de rodamina acoplada al tripéptido Val-Pro-Arg para la detección de una cepa o cepas bacterianas productoras de coagulasa, en el que la rodamina se acopla a uno u, opcionalmente, dos tripéptidos Val-Pro-Arg; y en donde la cepa bacteriana es, opcionalmente, *Staphylococcus aureus*; o la cepa bacteriana es, opcionalmente, MRSA o MSSA.

30

6. Un método para detectar una cepa bacteriana productora de coagulasa, que comprende:

añadir un compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 a una muestra que contiene la cepa bacteriana; y detectar una respuesta óptica.

35

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el método comprende adicionalmente añadir a la muestra una cualquiera o ambas de las proteínas protrombina y pretrombina; opcionalmente en donde el método comprende la adición de pretrombina a la muestra.

40

8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que la respuesta óptica es un cambio de color dentro de la región visible del espectro electromagnético; o en el que la respuesta óptica es fluorescencia.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la muestra es una muestra de alimento o en el que la muestra incluye un fluido biológico, una muestra de tejido, una sección de tejido, una muestra celular o un fluido o un sustrato no biológicos; opcionalmente en donde la muestra es una muestra humana o una

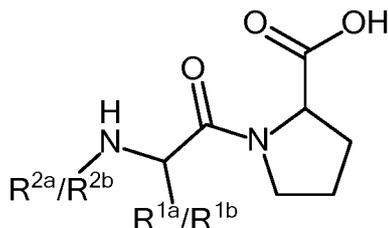
45

muestra de un animal.

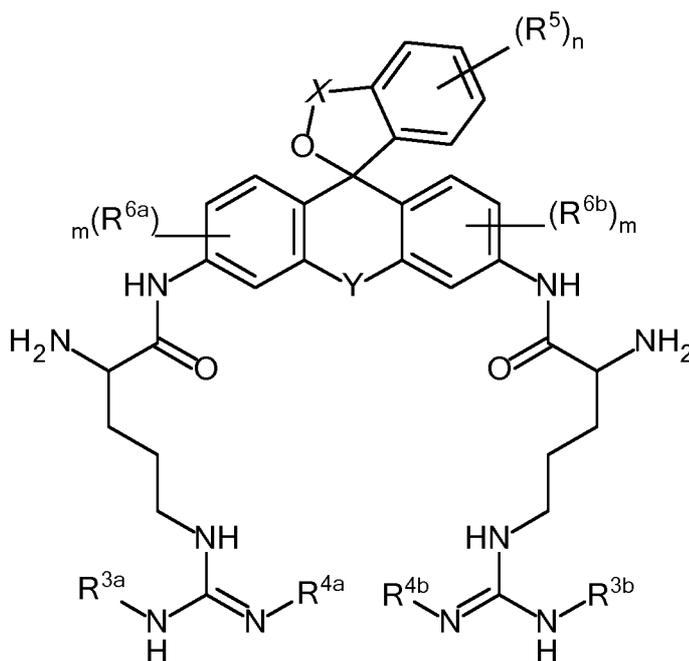
10. Un kit para la detección de cepas bacteriana productoras de coagulasa, que comprende:

- 5 un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2; y una cualquiera o ambas de las proteínas protrombina y pretrombina.

11. Un método para preparar los compuestos de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende la etapa de mezclar un ácido carboxílico con una diamina en presencia de un agente de acoplamiento peptídico; en donde el ácido carboxílico está representado, opcionalmente, por la estructura:



15 en la que R^{1a}/R^{1b} representa isopropilo; R^{2a}/R^{2b} representa -H, -OR^a, -C(O)R^a, -C(O)OR^b, un grupo G, -L-arilo o alquilo -C₁₋₆, en donde los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo; y la diamina está representada, opcionalmente, por la estructura:

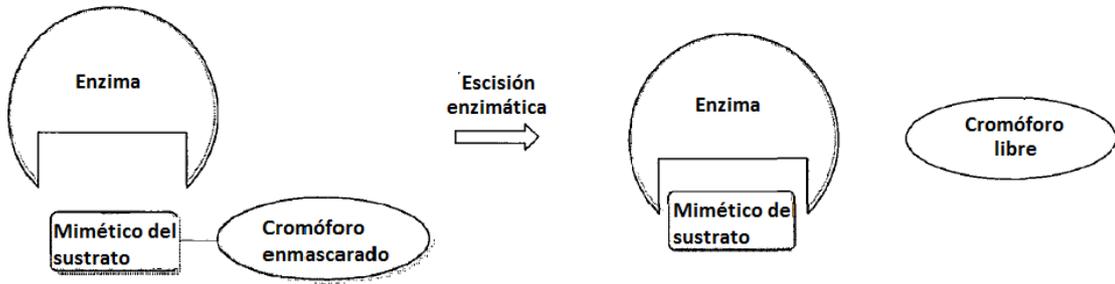


20 X representa C(O) o S(O)_t;
t representa 1 o 2;
Y representa O, S, NH o CH₂;
R^{3a}, R^{3b}, R^{4a} y R^{4b} representan cada uno independientemente -H, -NO₂, -OH, -C(O)R^c o alquilo C₁₋₆, en donde el
25 último grupo pueden estar opcionalmente sustituido con uno o más halo;
cada R⁵ representa independientemente -NO₂, -OR^d, -NR^d₂, -SR^d, -C(O)R^e, -C(O)OR^e, -C(O)N(H)R^e, -C(O)NR^e₂, -
S(O)₃R^e, -S(O)₂N(H)R^e, -S(O)₂NR^e₂, halo, arilo o alquilo C₁₋₆, en donde los dos últimos grupos pueden estar
30 opcionalmente sustituidos con uno o más halo;
y/o dos grupos R⁵ adyacentes cualesquiera pueden unirse entre sí para formar, junto con los átomos de carbono
a los que están necesariamente unidos, un grupo cicloalquilo o arilo de 5 o 6 miembros, en donde los dos últimos
grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo;
n representa de 0 a 4;
R^{6a} y R^{6b} representan independientemente -NO₂, -N(H)R^f, -N(R^g)R^h, -ORⁱ, -SRⁱ, -C(O)R^h, -C(O)OR^h, C(O)N(H)R^h, -
35 C(O)NR^h₂, S(O)₃R^h, -S(O)₂N(H)R^h, -S(O)₂NR^h₂, arilo o alquilo C₁₋₆, en donde los dos últimos grupos pueden estar
opcionalmente sustituidos con uno o más halo;
cada m representa independientemente de 0 a 3;

ES 2 655 212 T3

cada R^a to R^i representa independientemente -H, arilo, alquilo C_{1-6} , en donde los dos últimos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más halo.

FIGURA 1



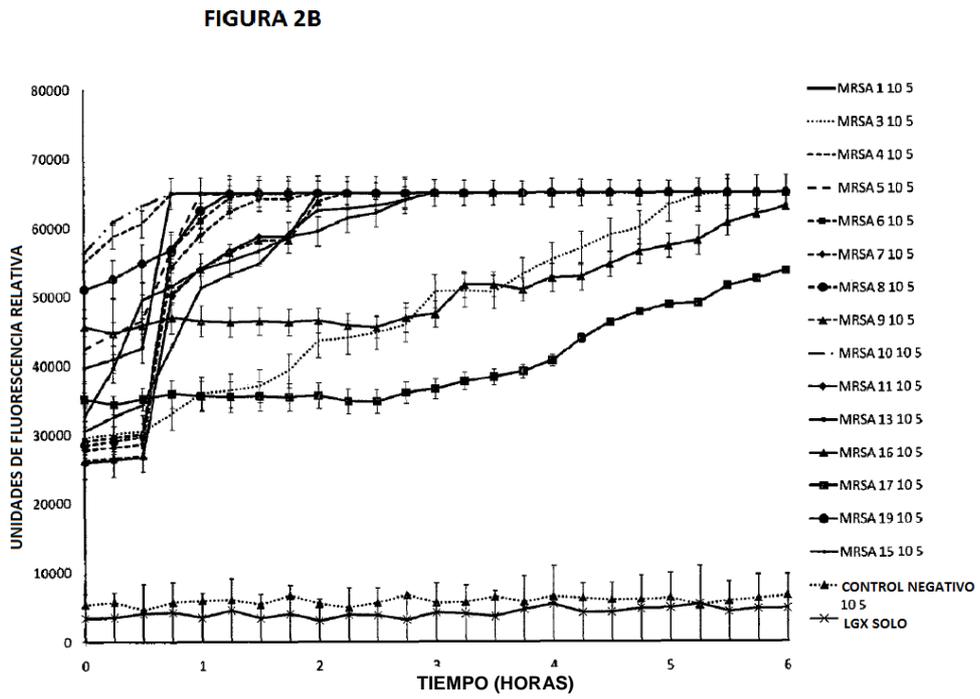
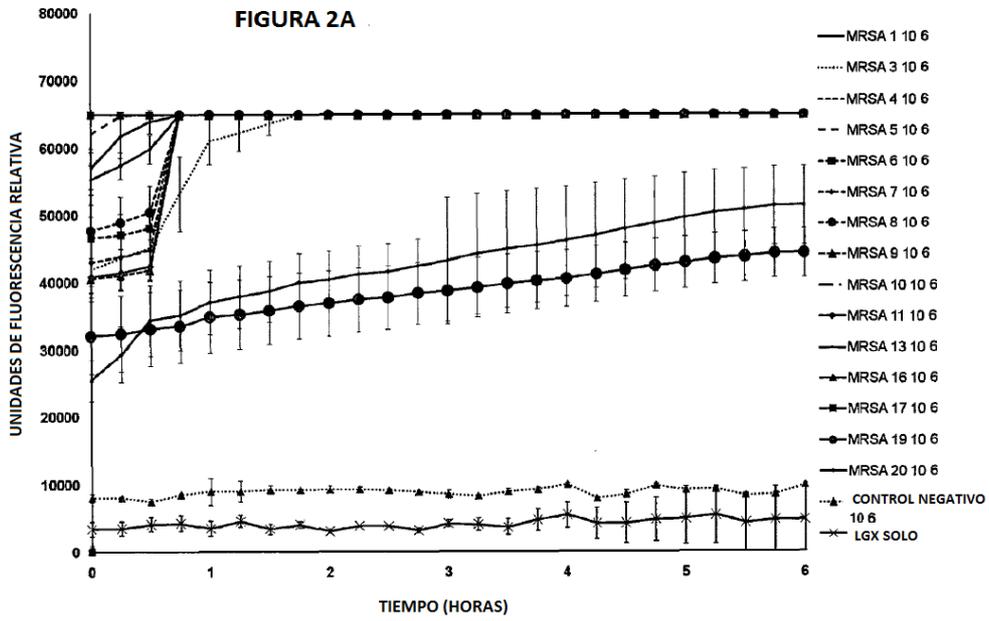
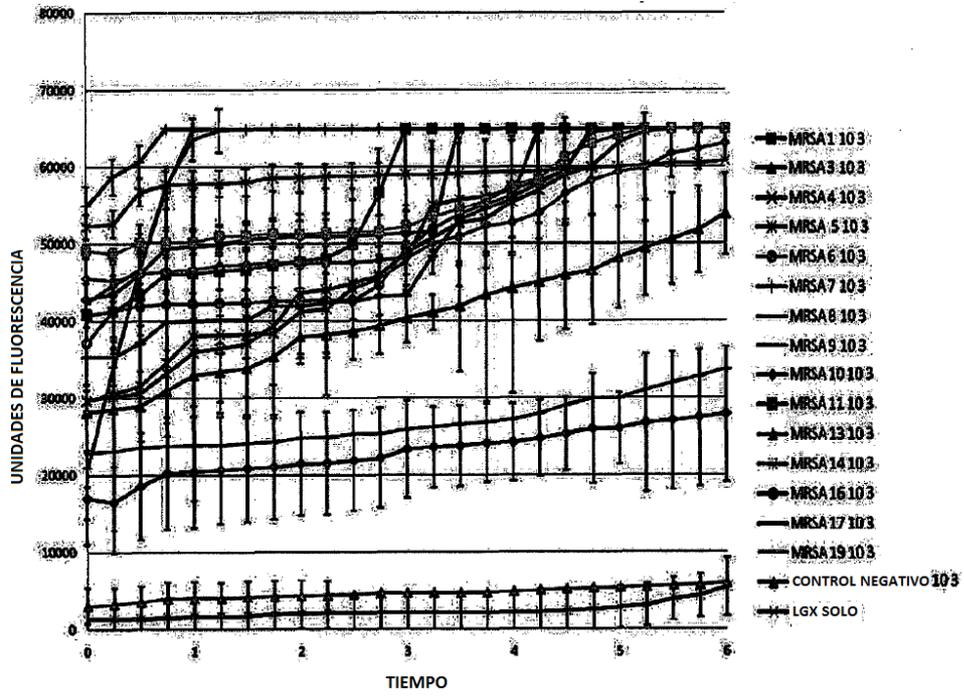


FIGURA 2C



8

FIGURA 2 D

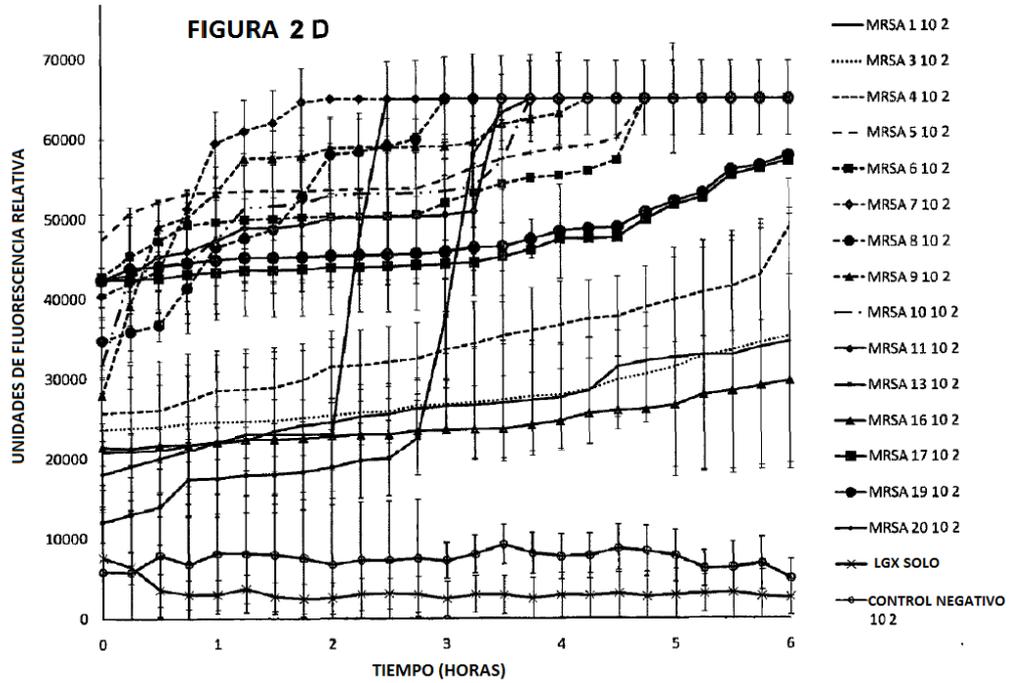


FIGURA 3 A

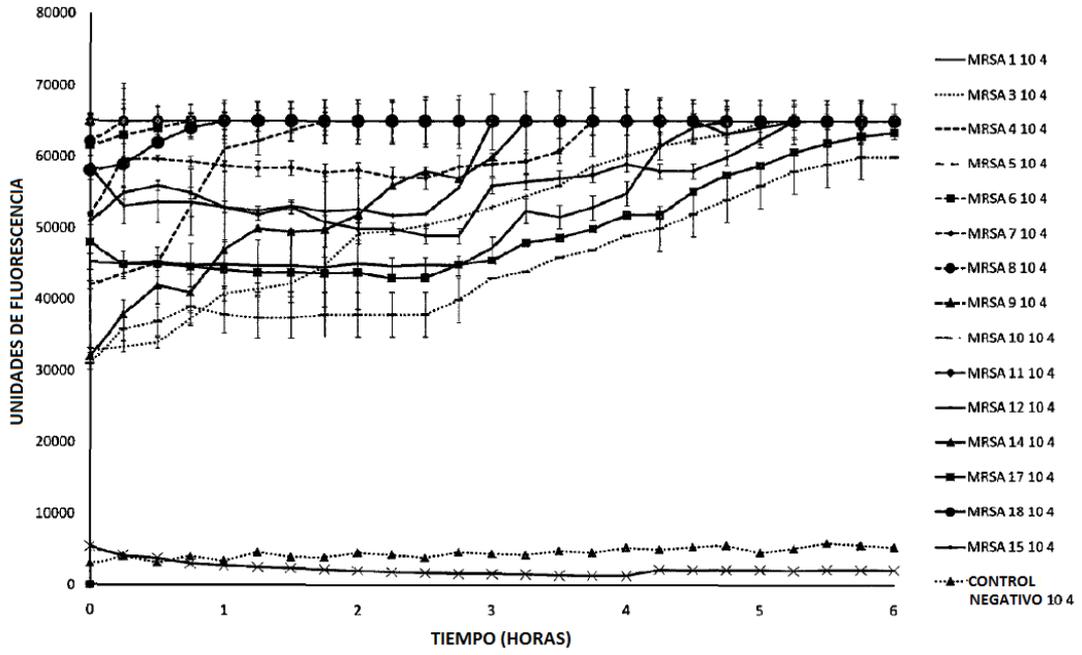


FIGURE 3 B

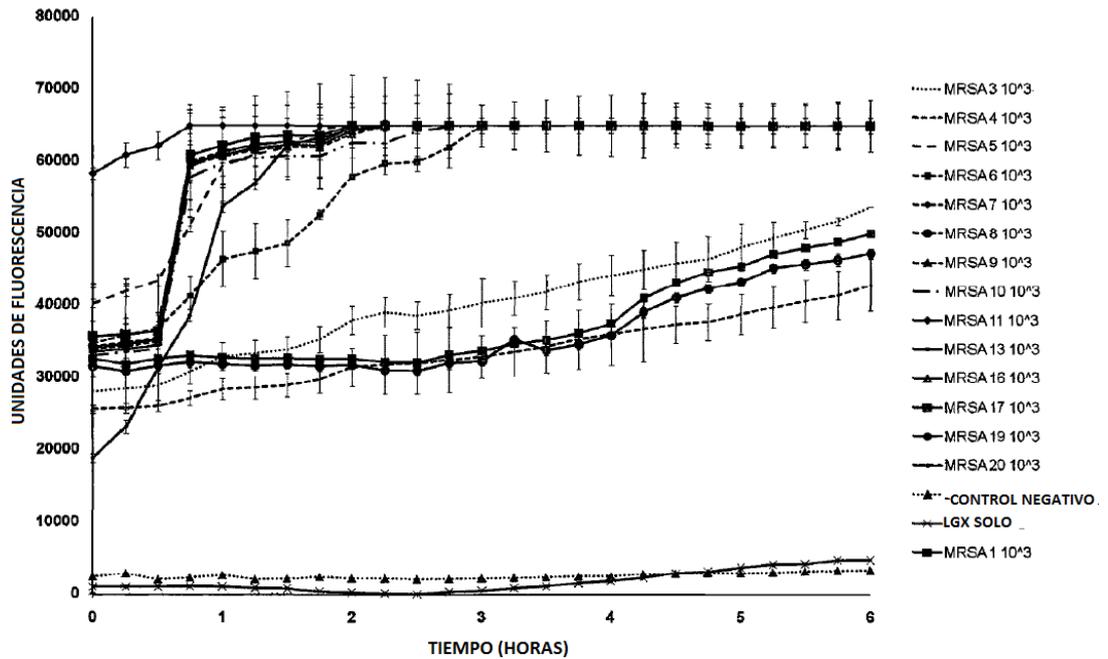
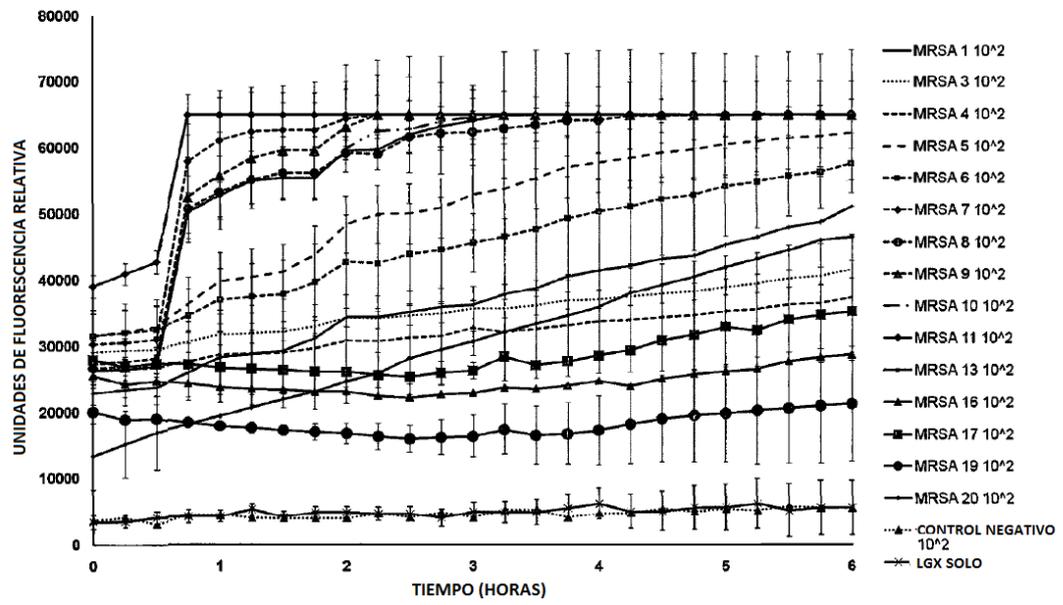


FIGURA 3 C



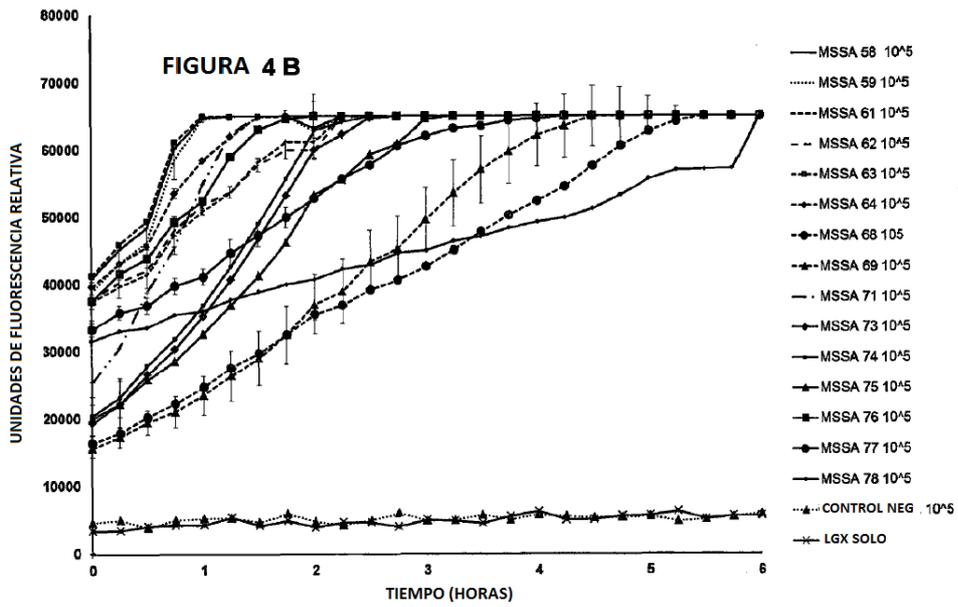
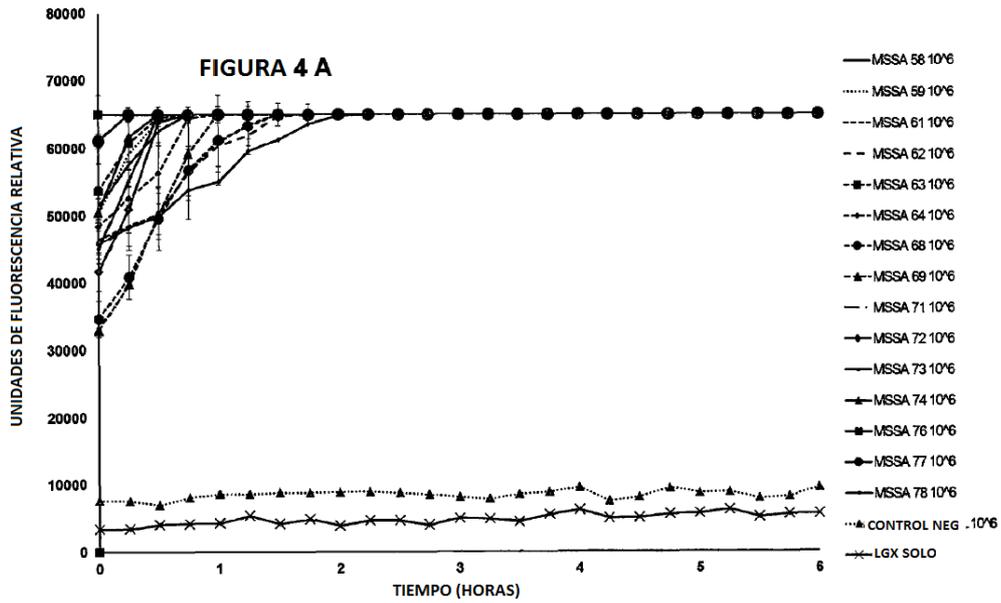


FIGURA 4 C

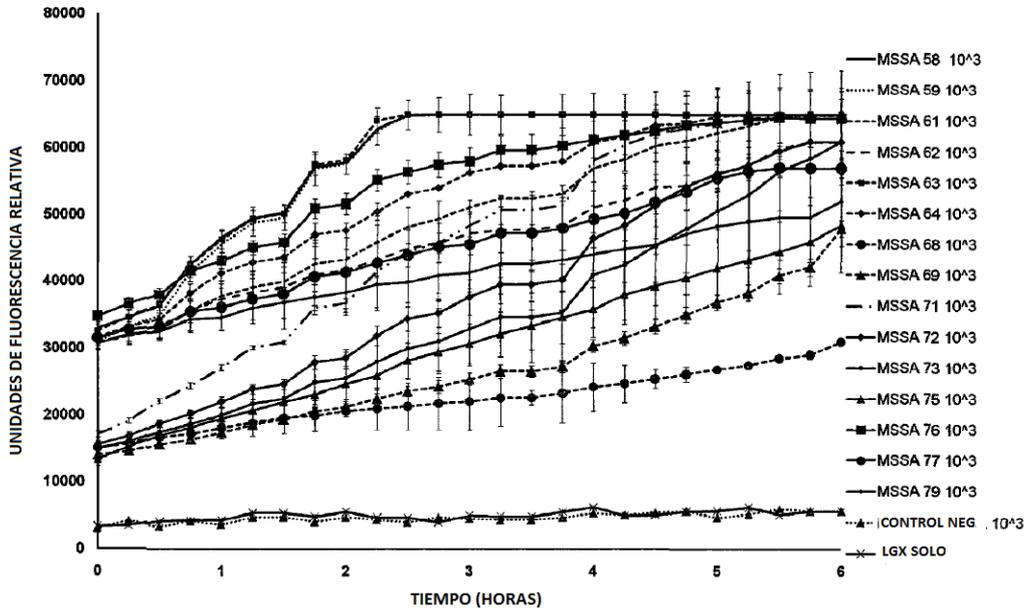


FIGURA 4 D

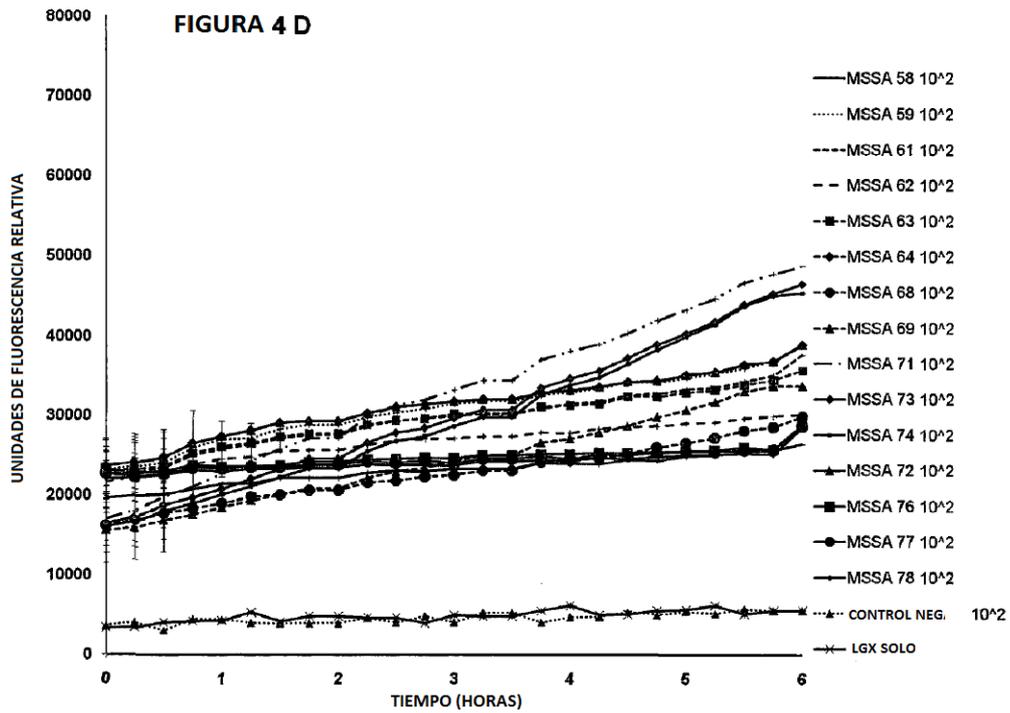


FIGURA 5 A

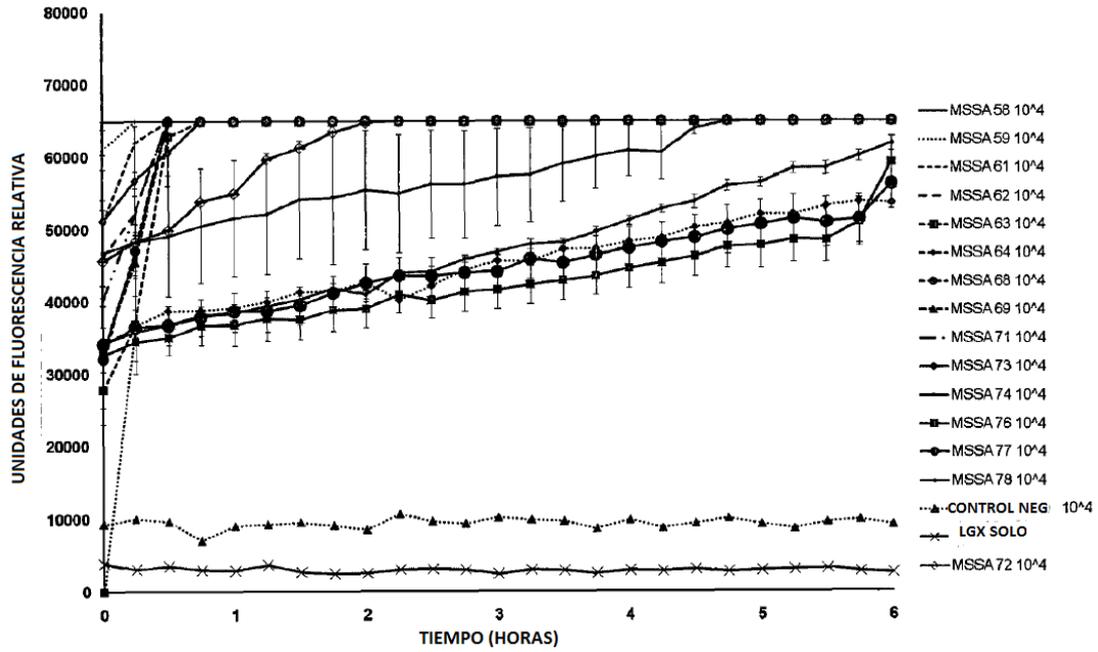


FIGURA 5 B

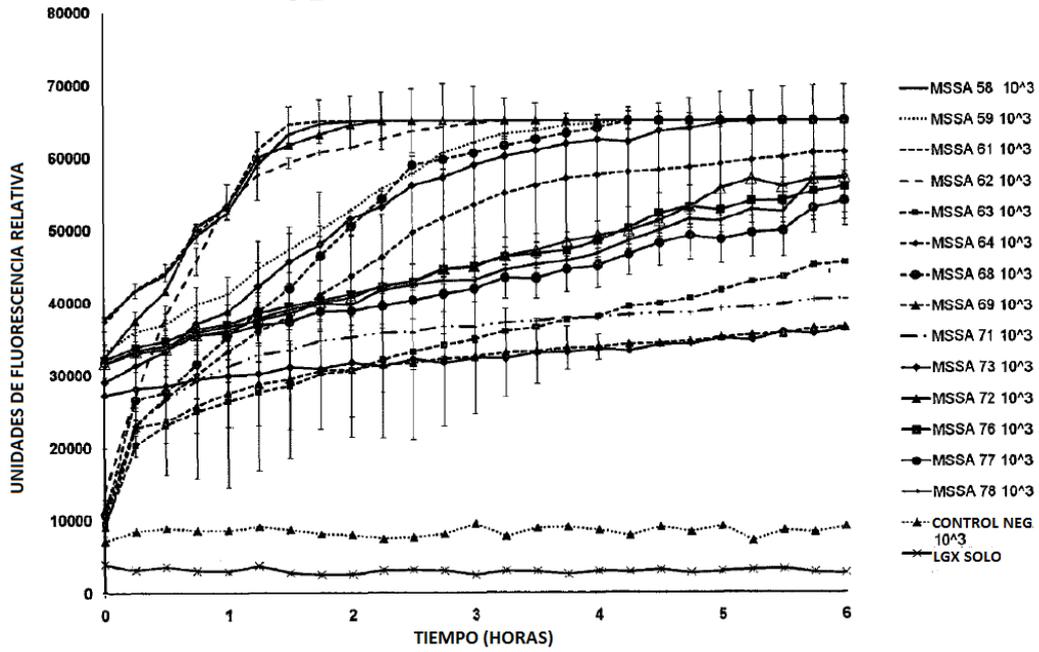


FIGURA 5 C

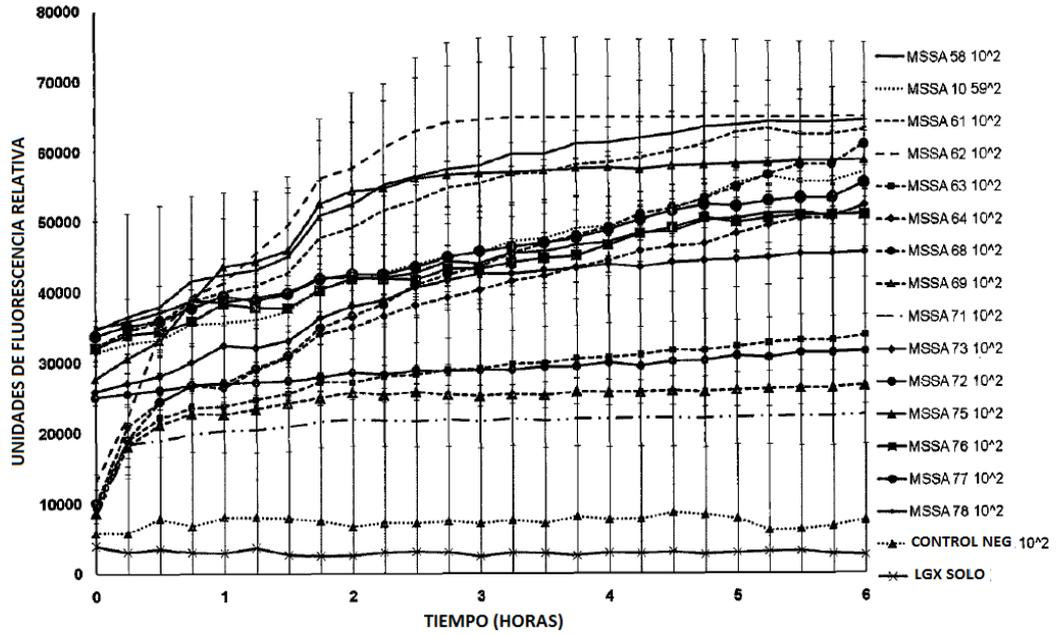
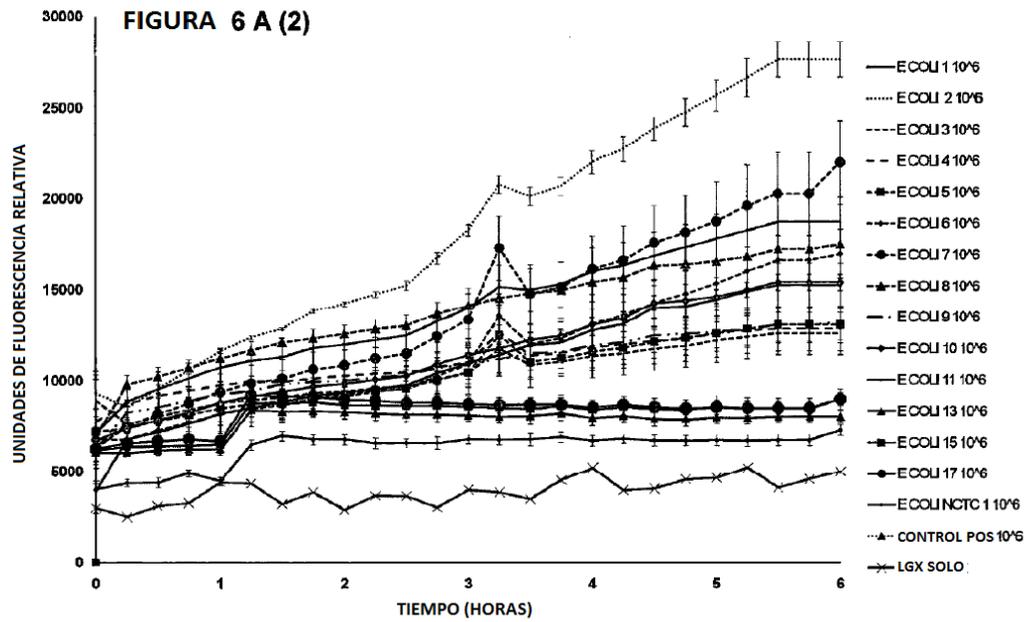
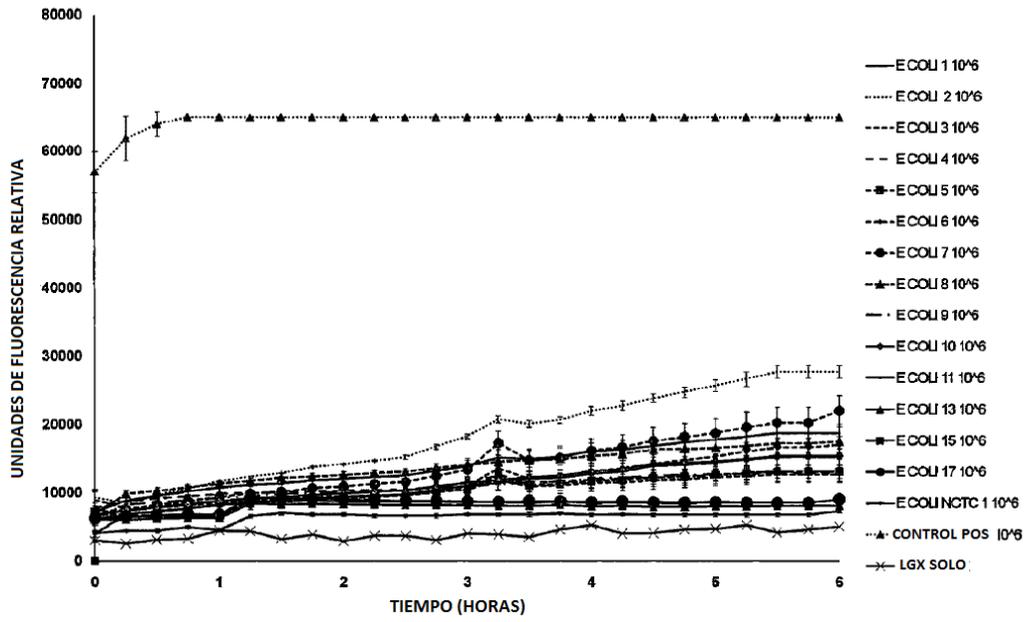
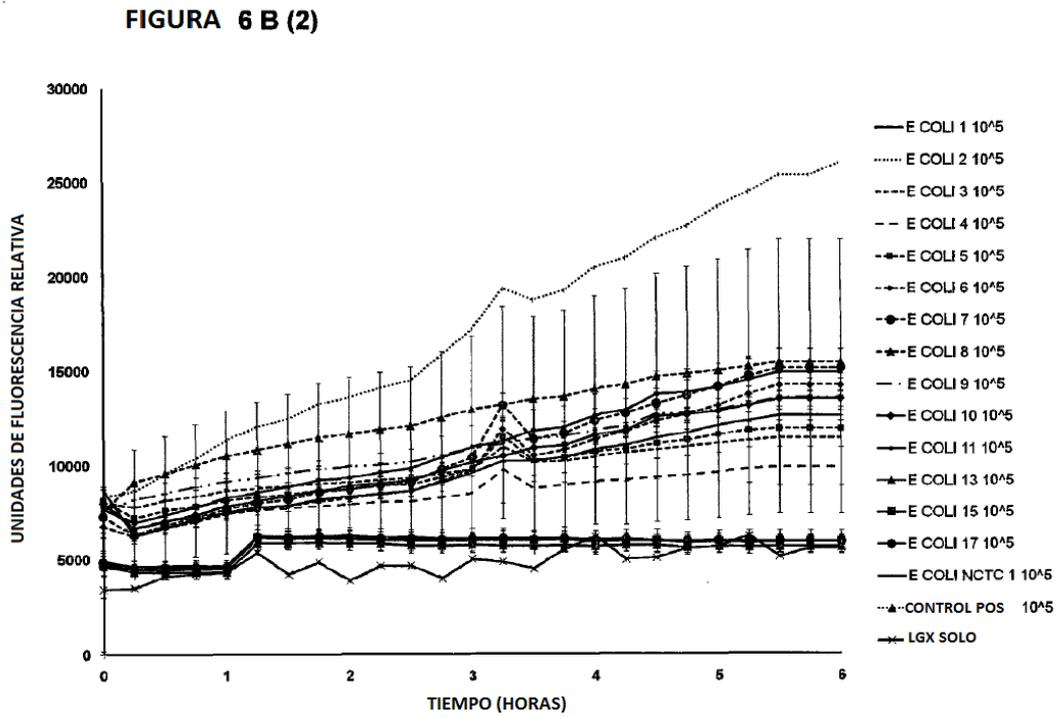
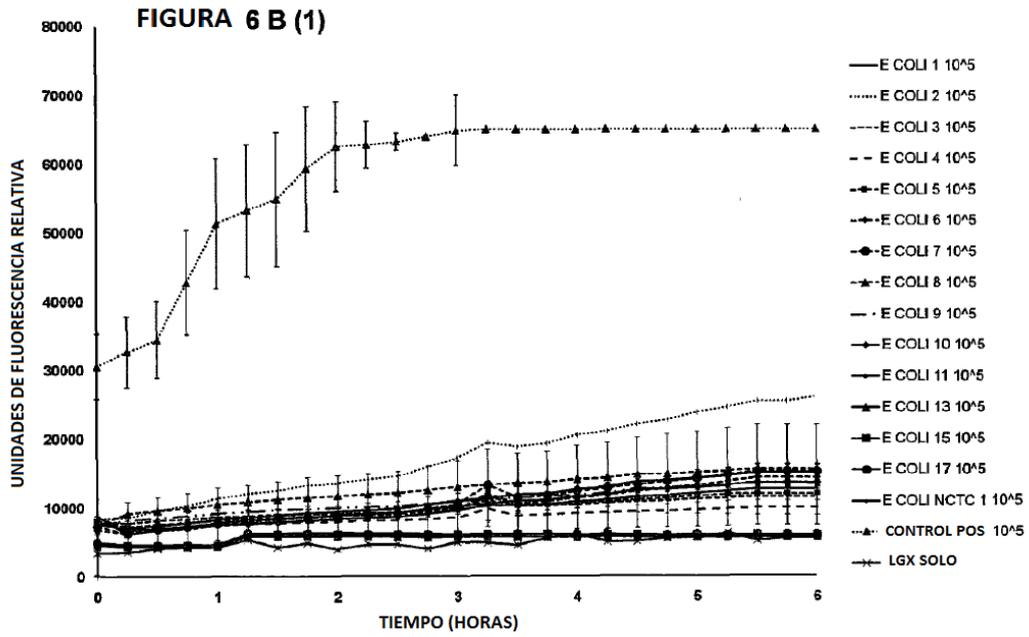
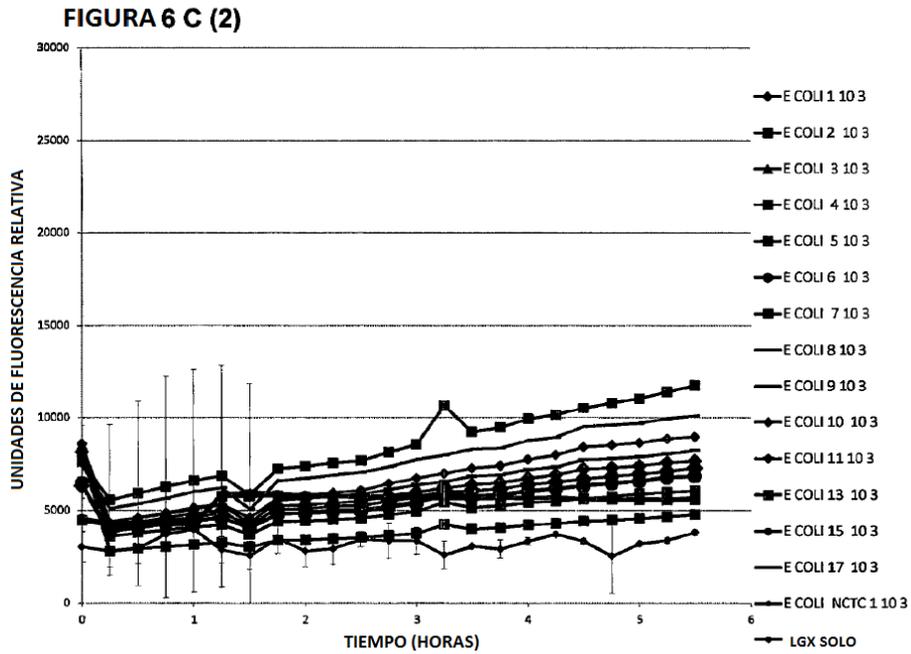
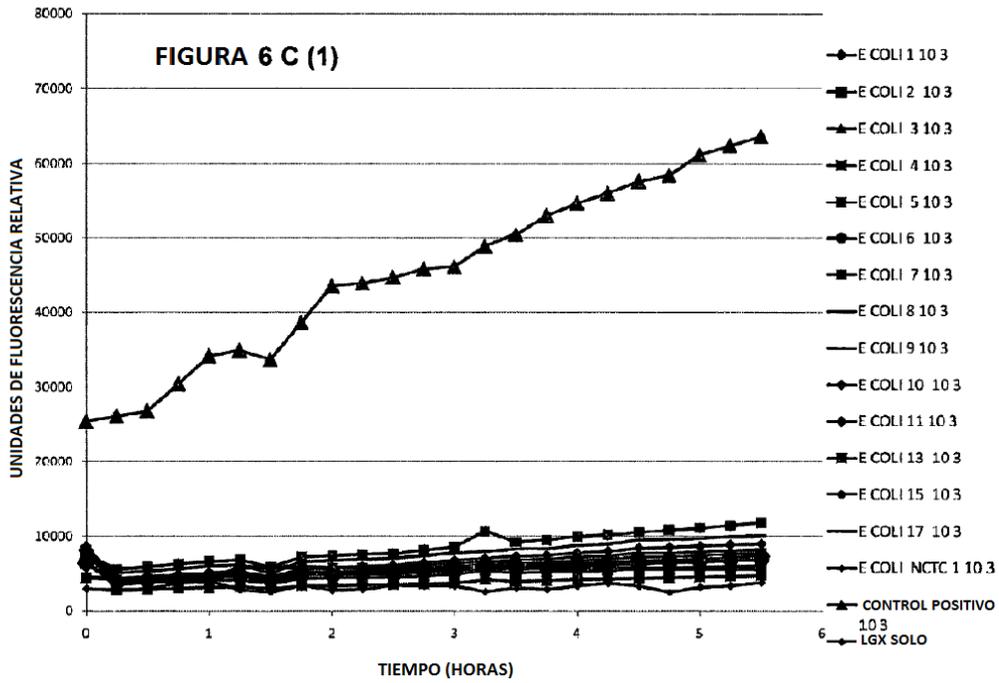
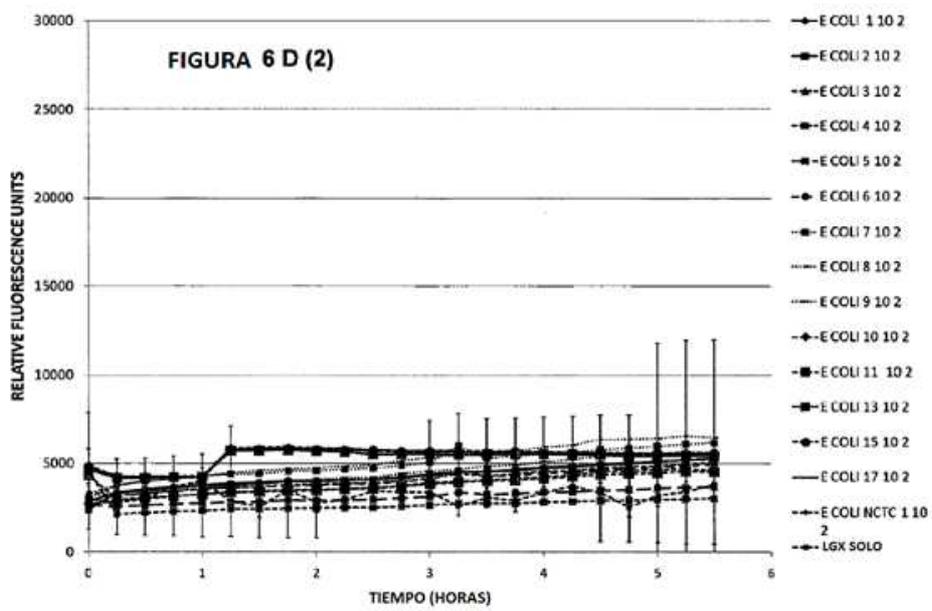
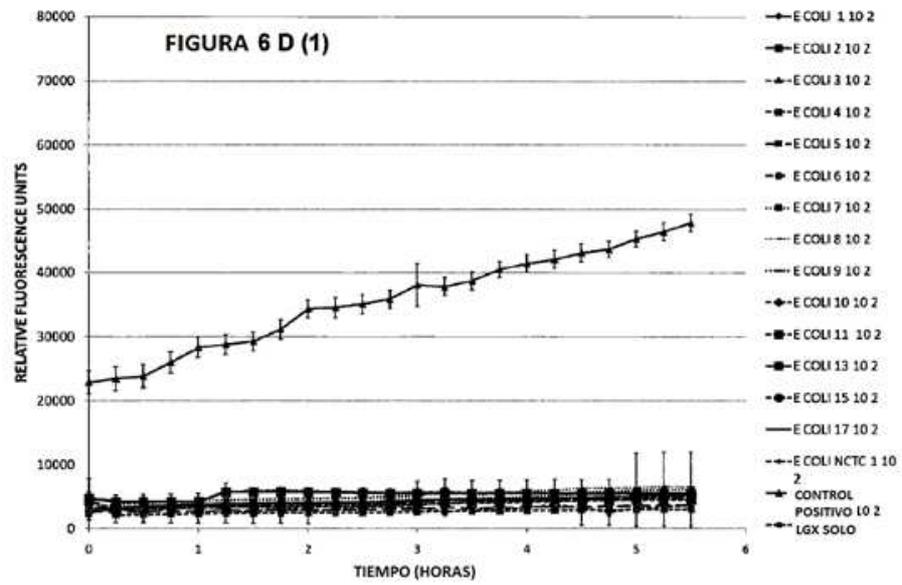


FIGURA 6 A (1)









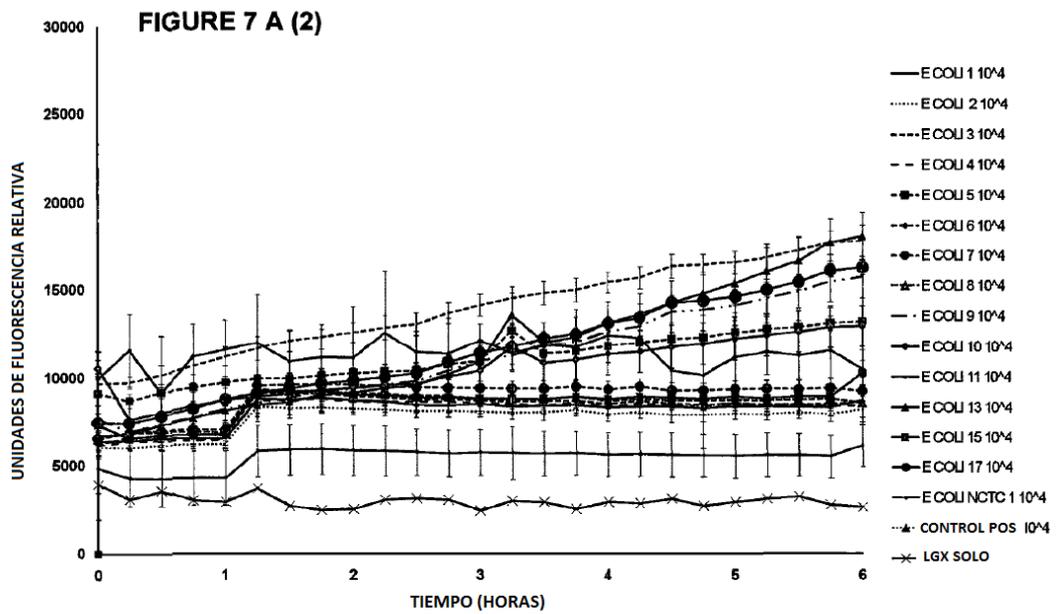
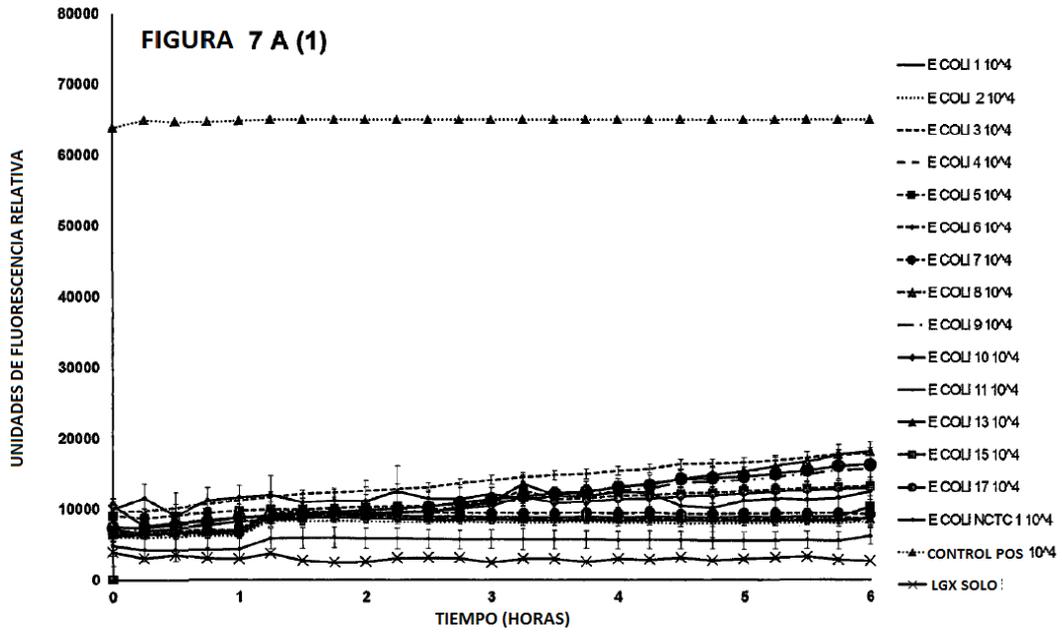


FIGURA 7 B (1)

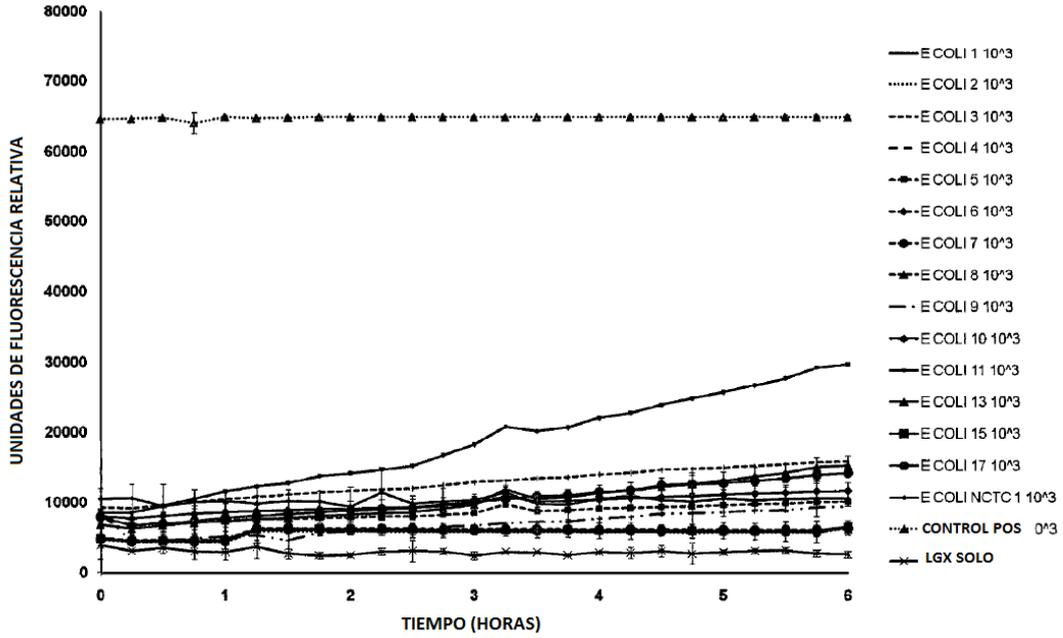
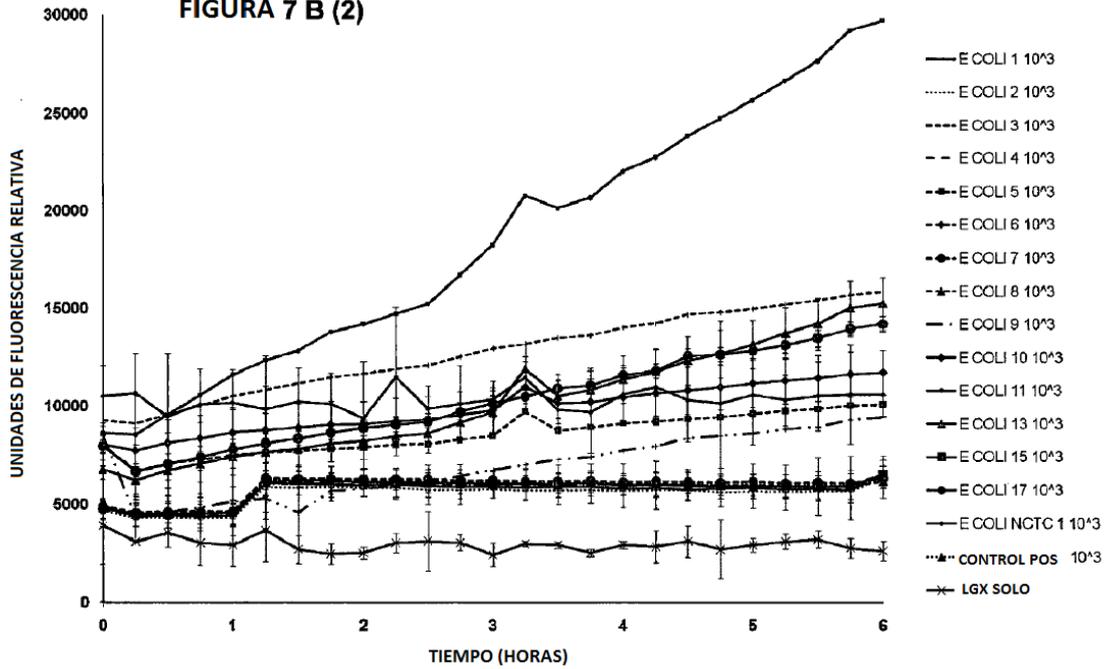
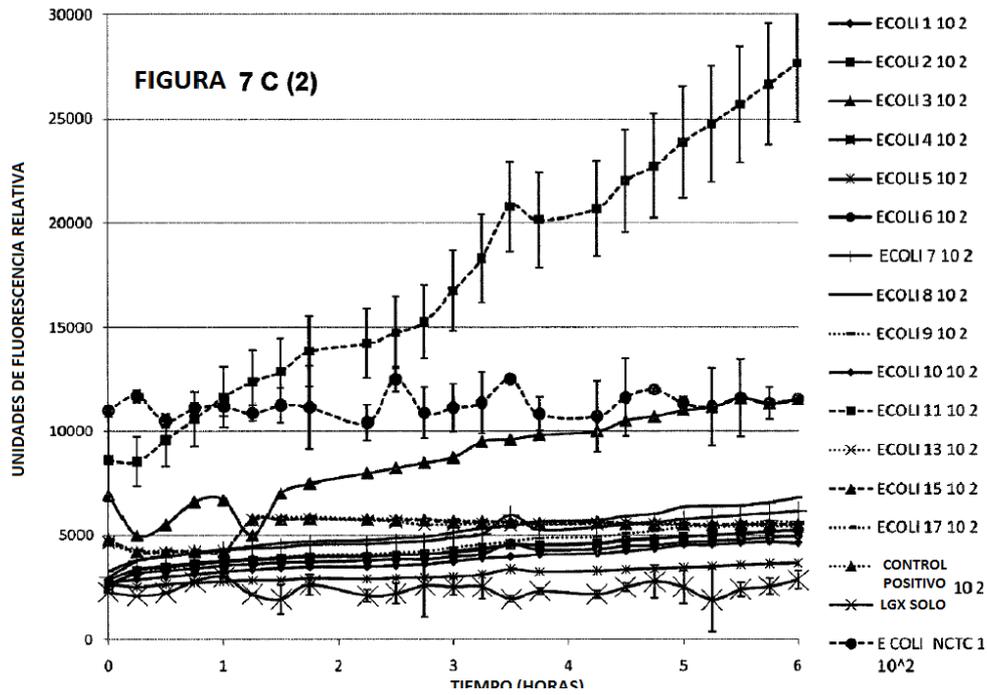
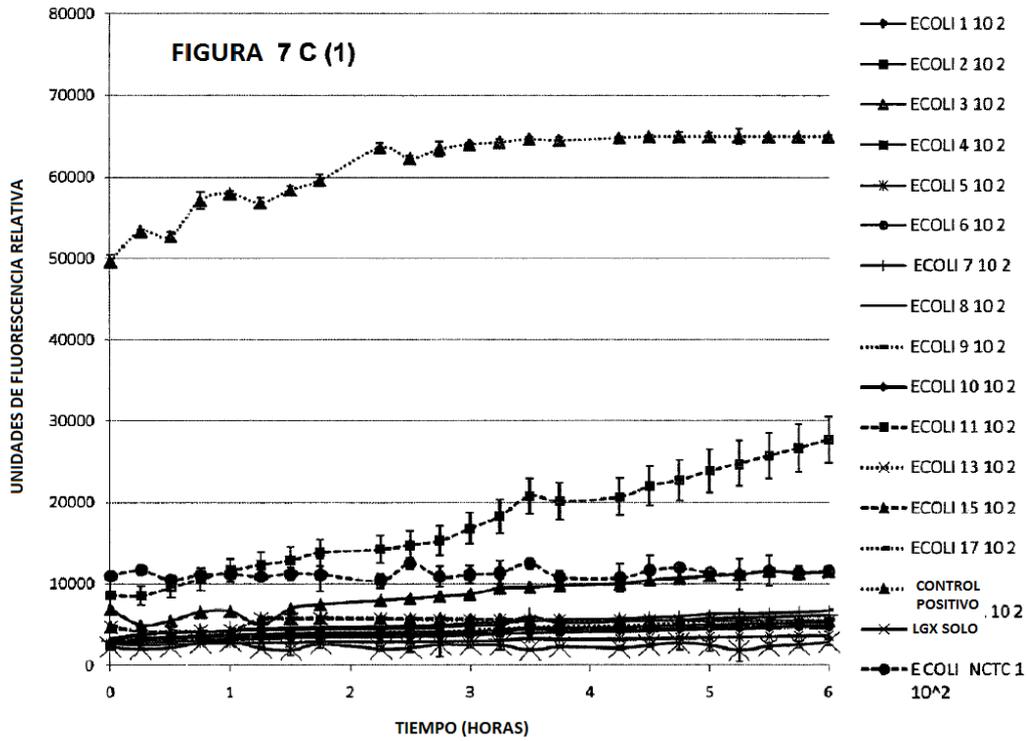


FIGURA 7 B (2)





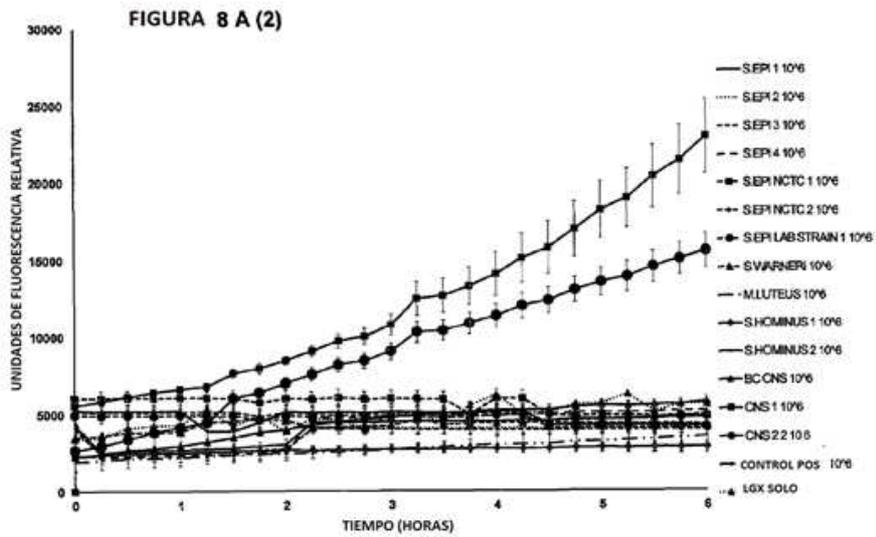
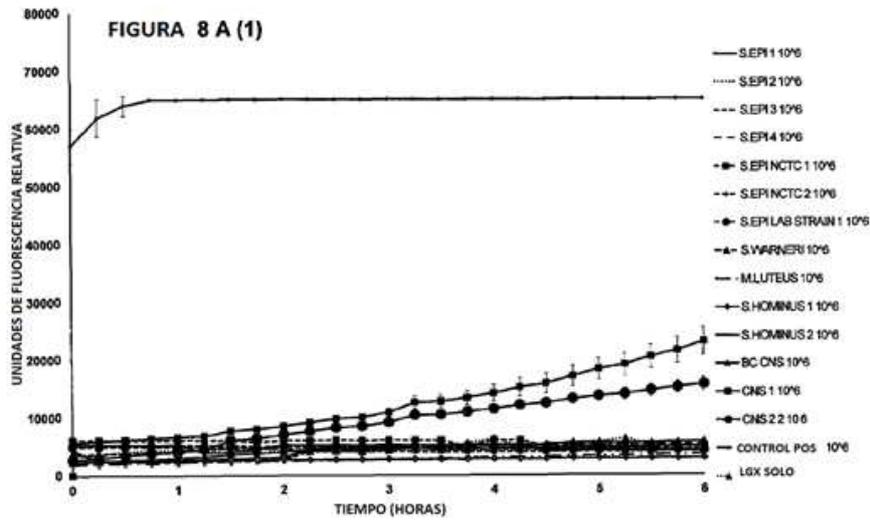


FIGURA 8 B (1)

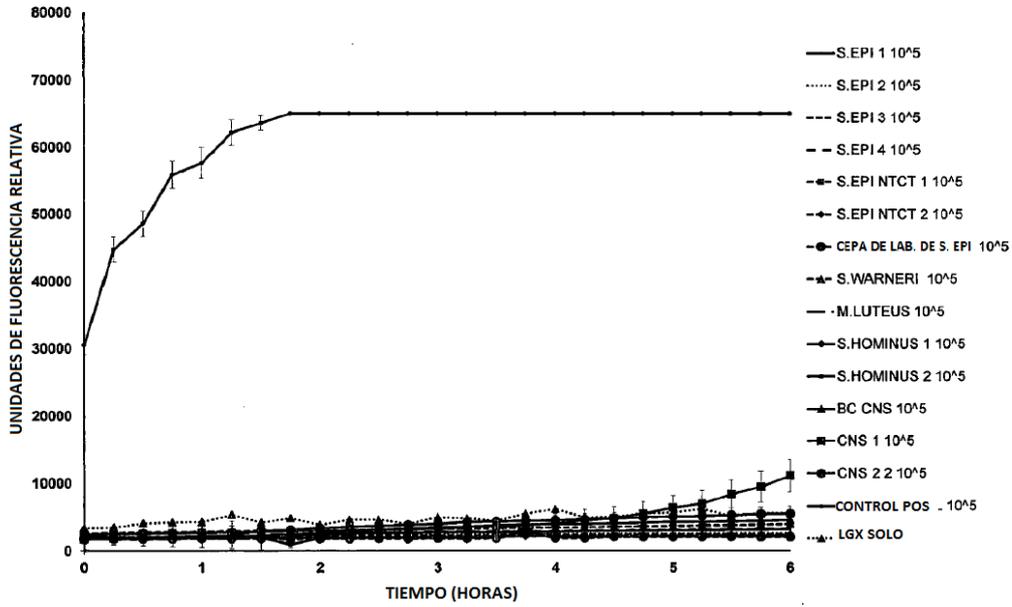


FIGURA 8 B (2)

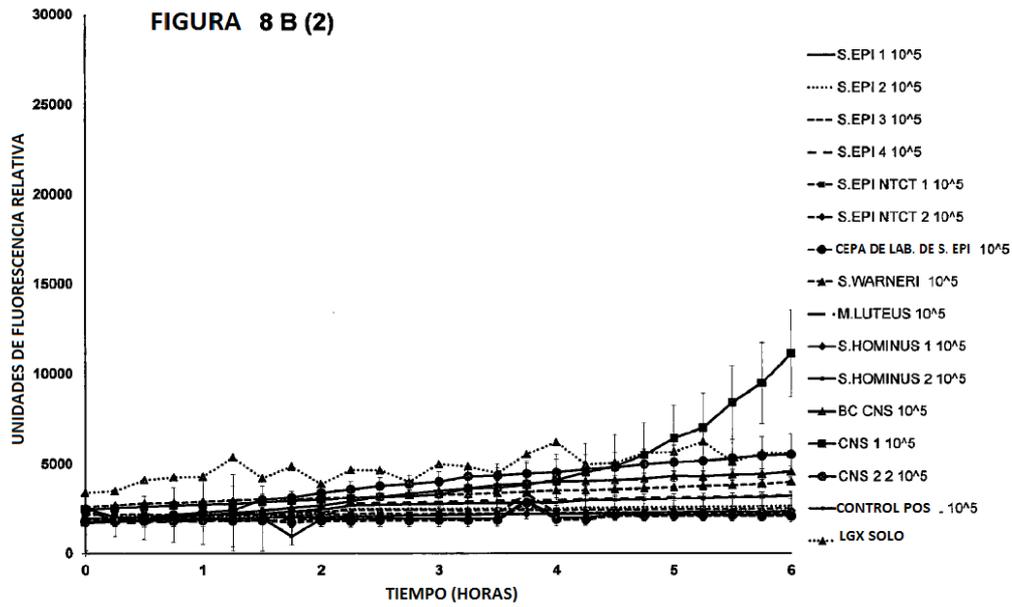


FIGURA 8 C (1)

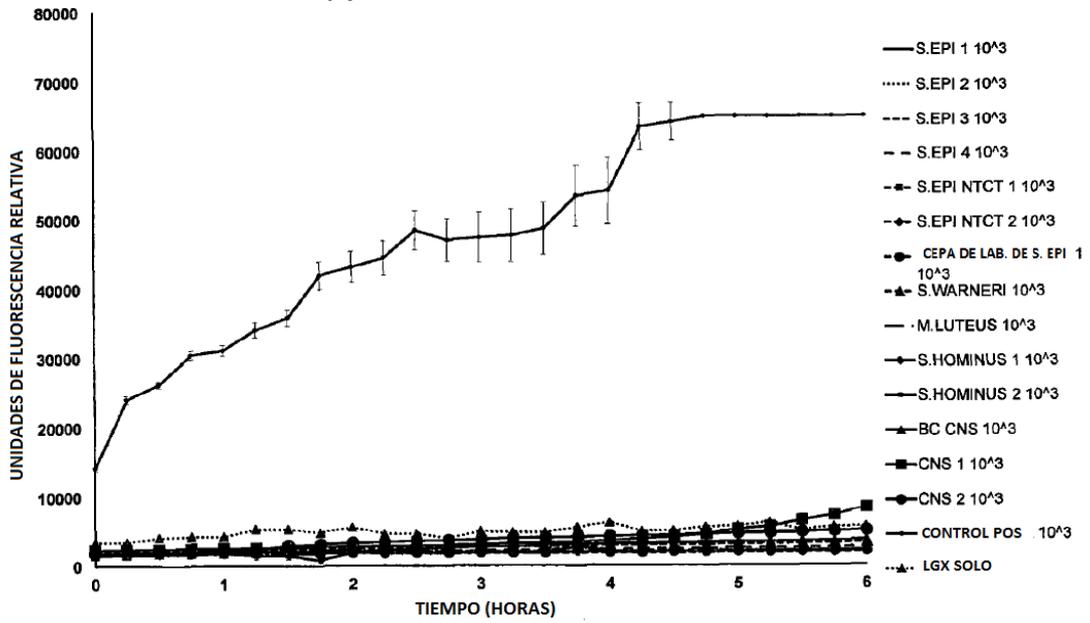
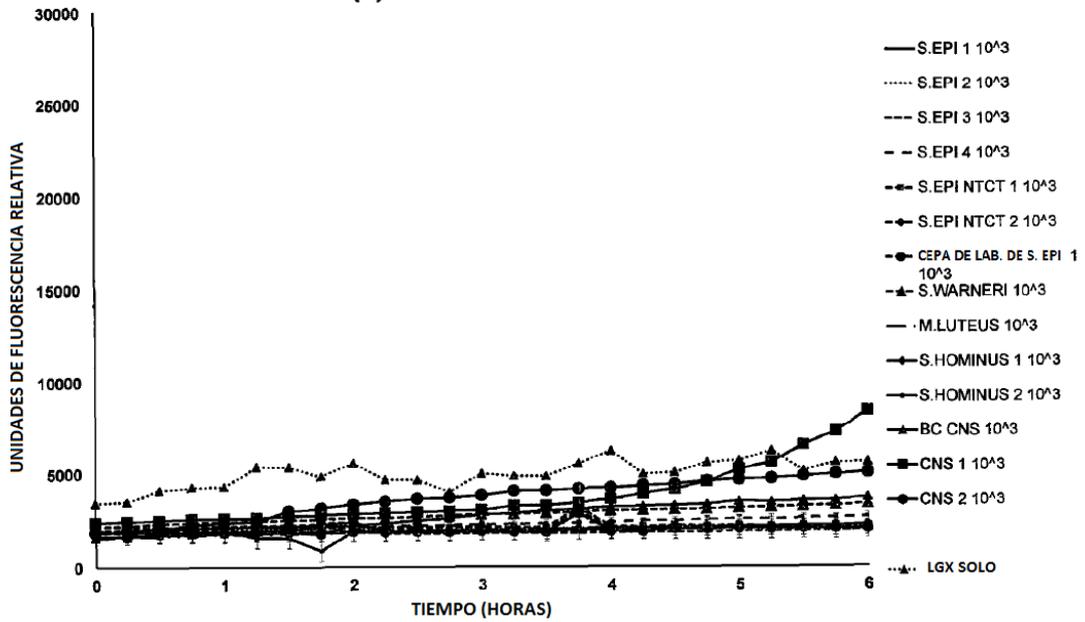
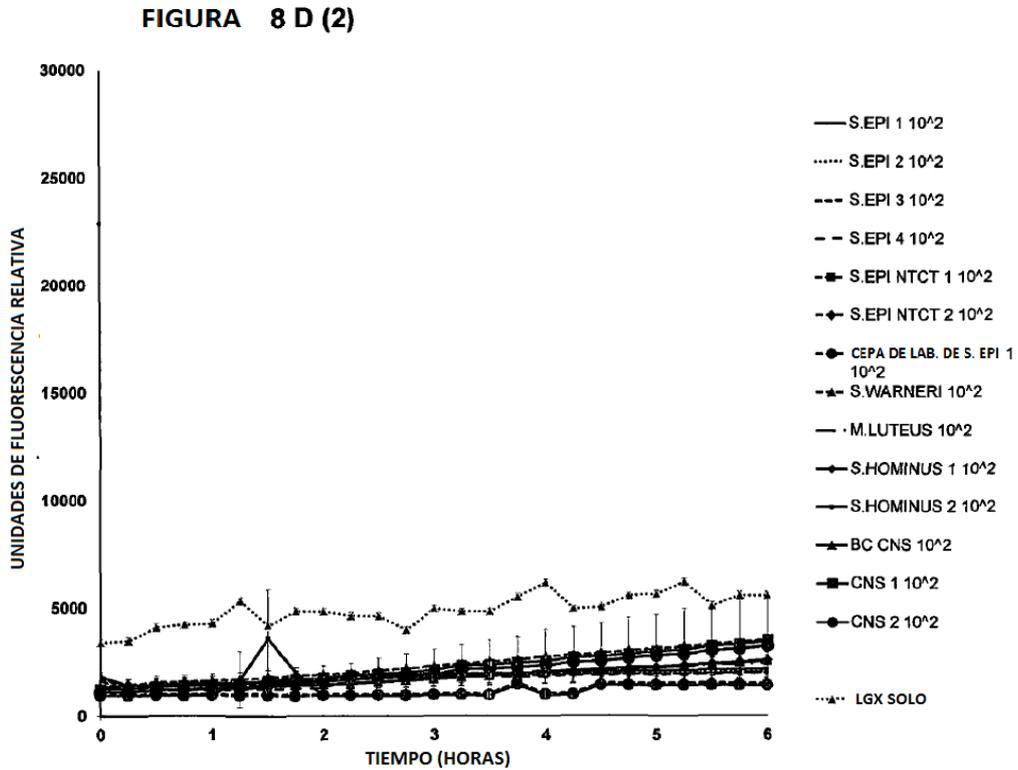
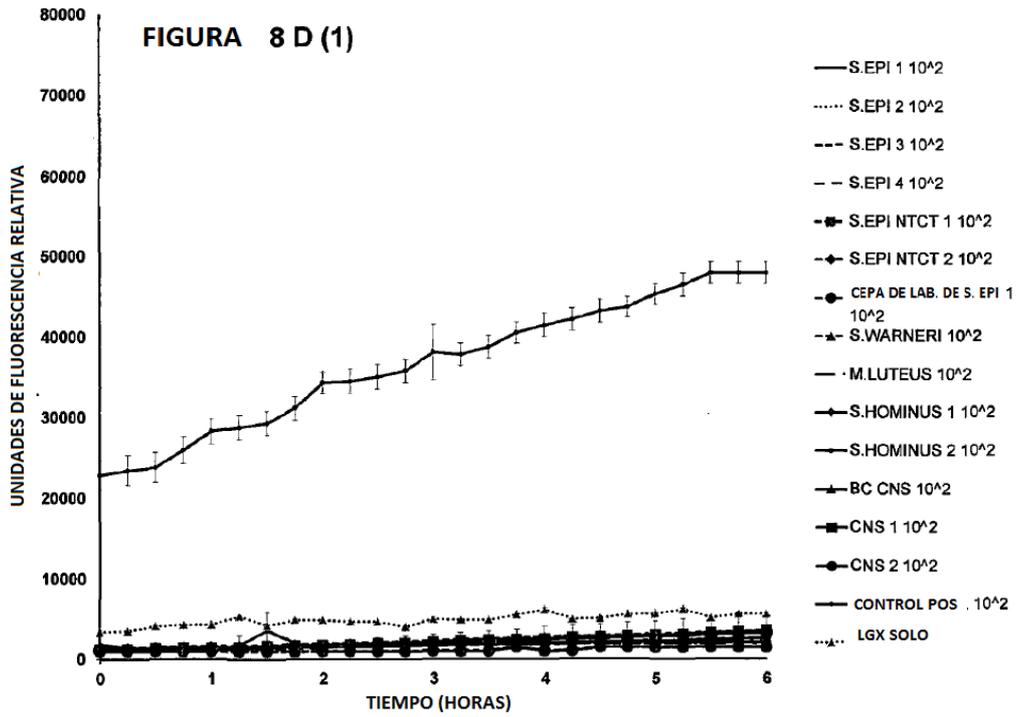
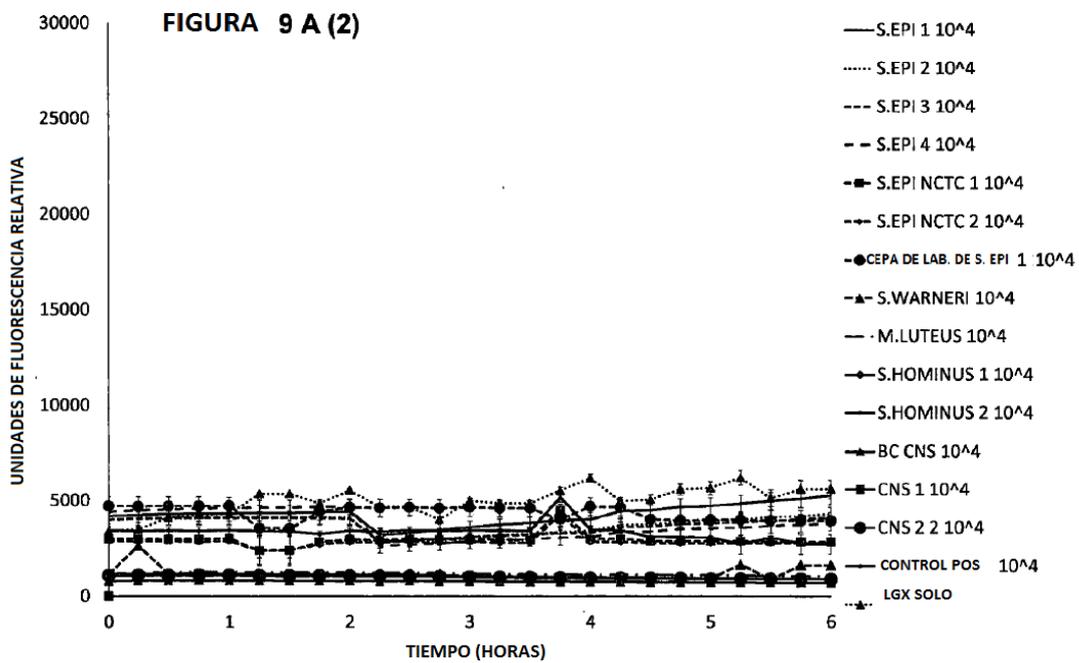
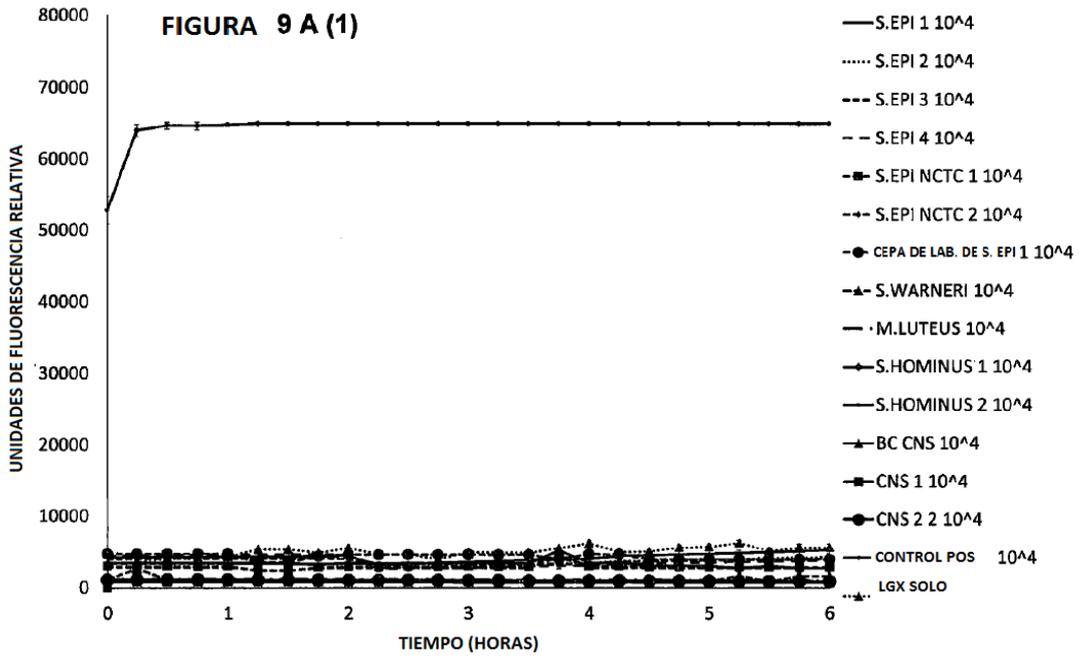
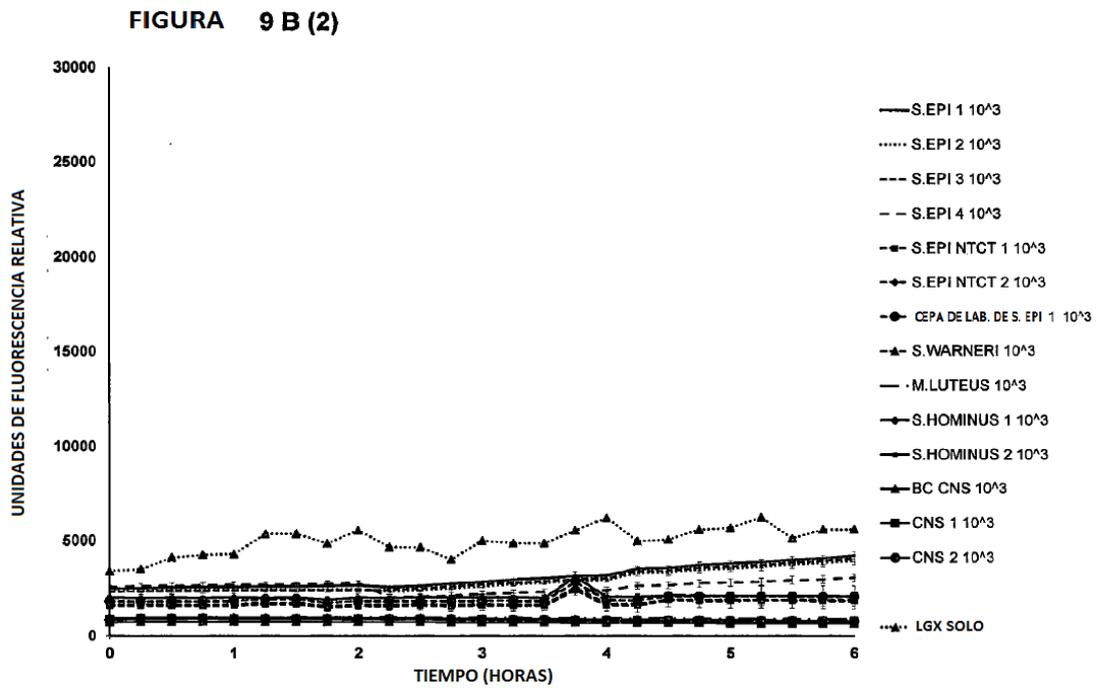
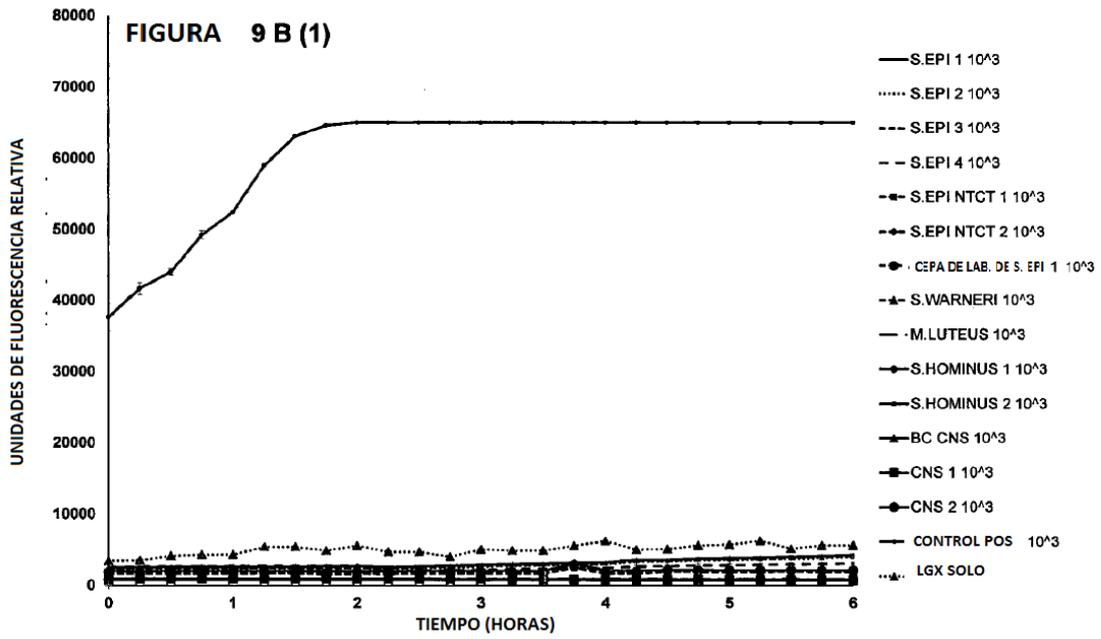


FIGURA 8 C (2)









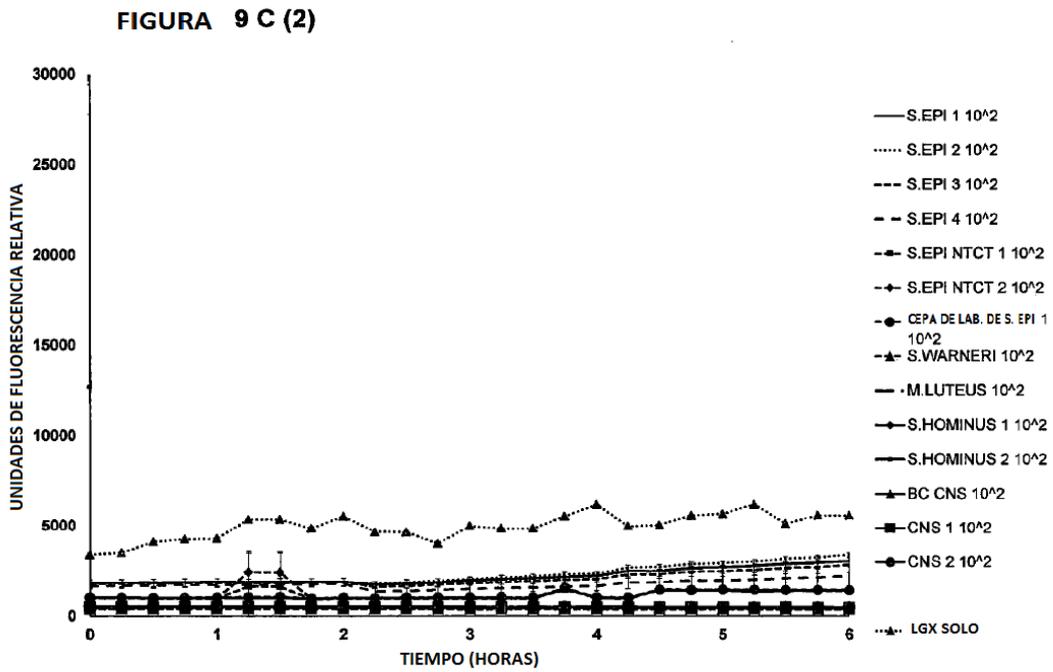
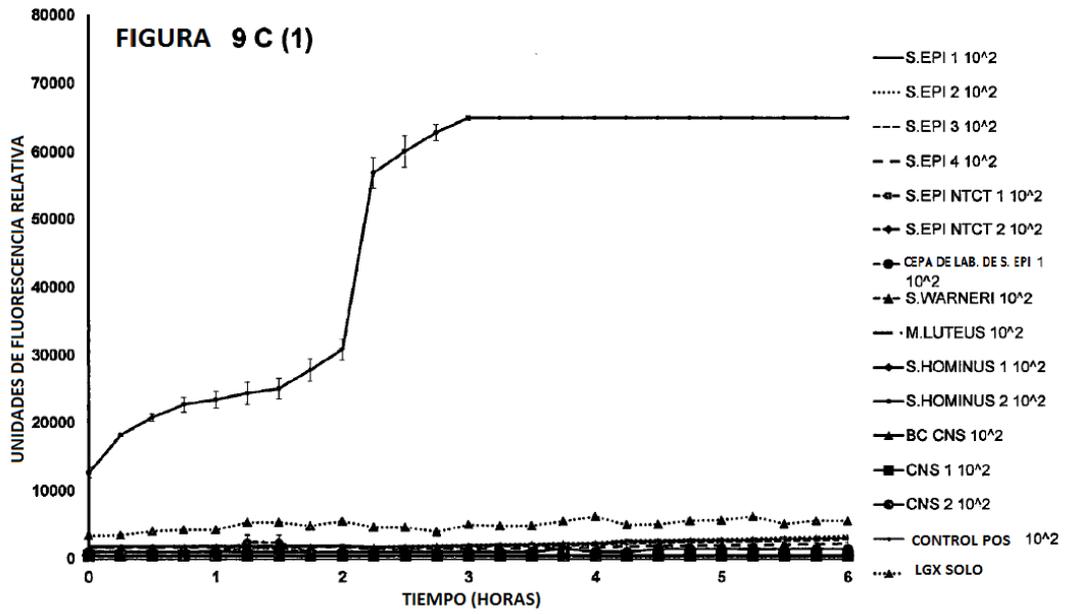


FIGURA 10

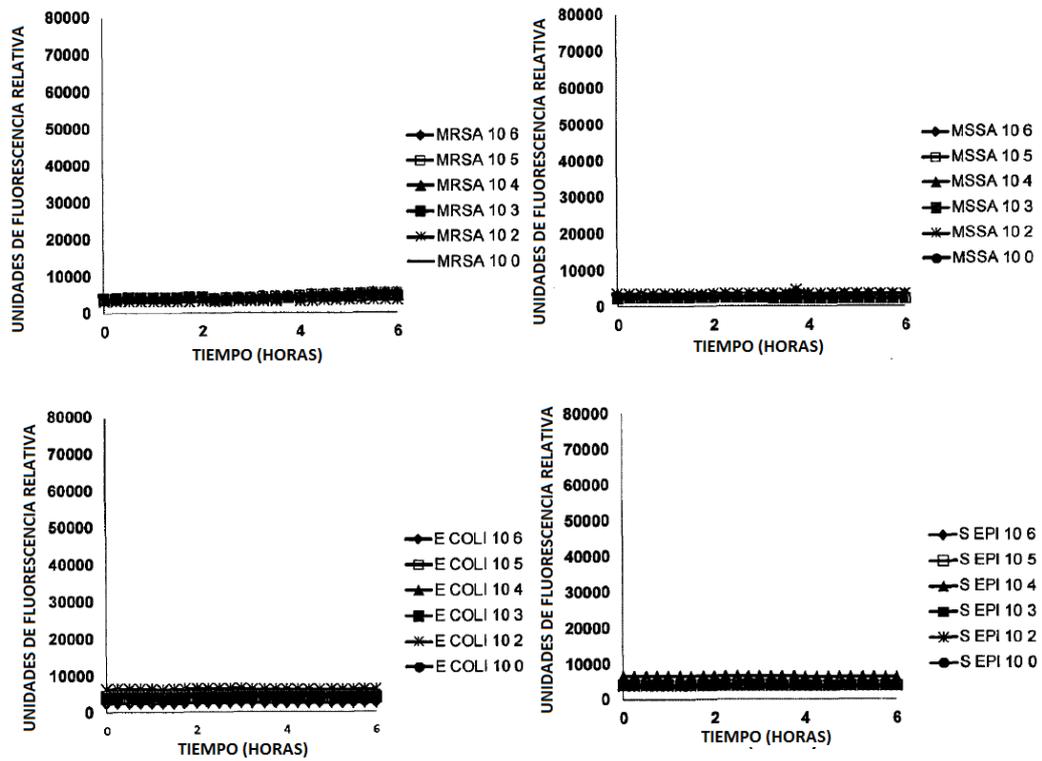


FIGURA 11

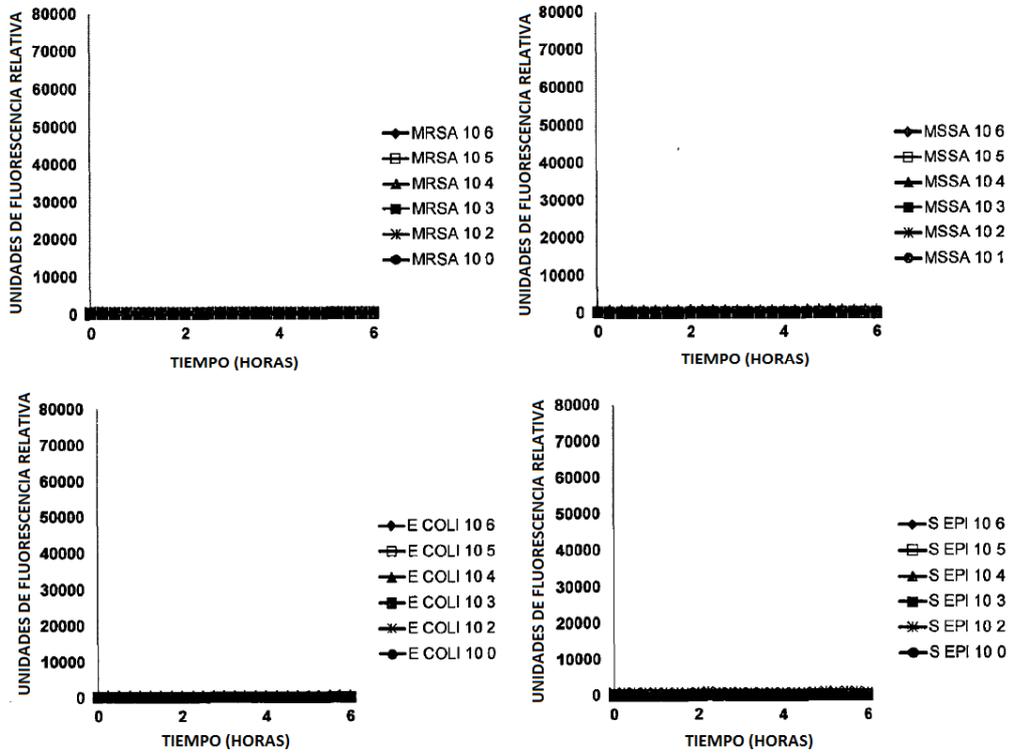


FIGURA 12

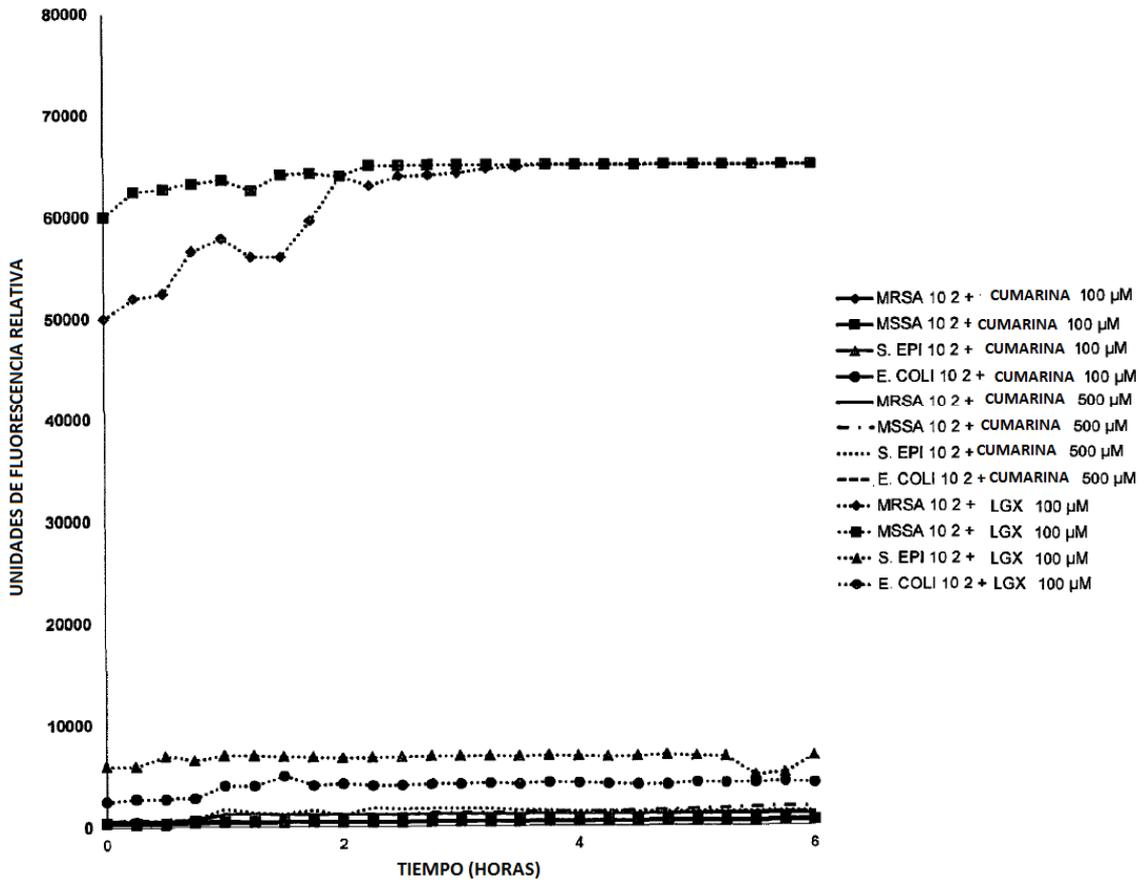


FIGURA 13

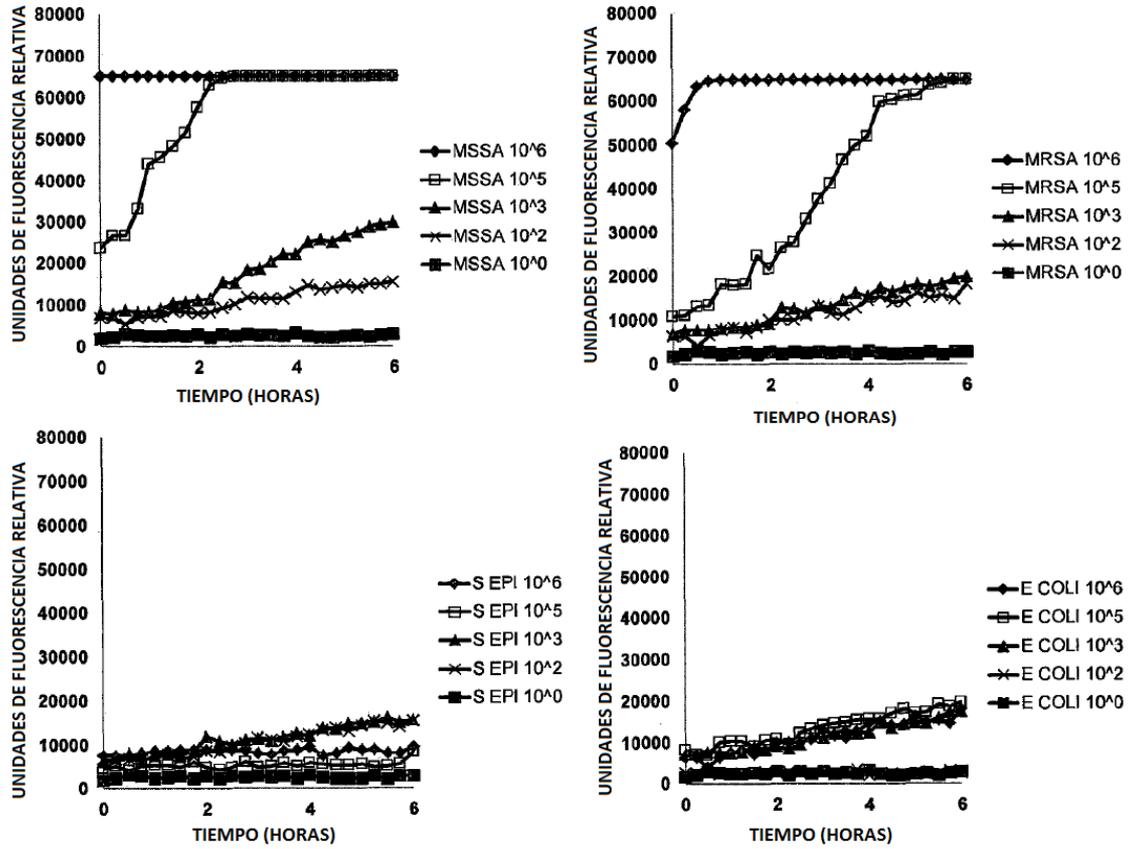


FIGURA 14

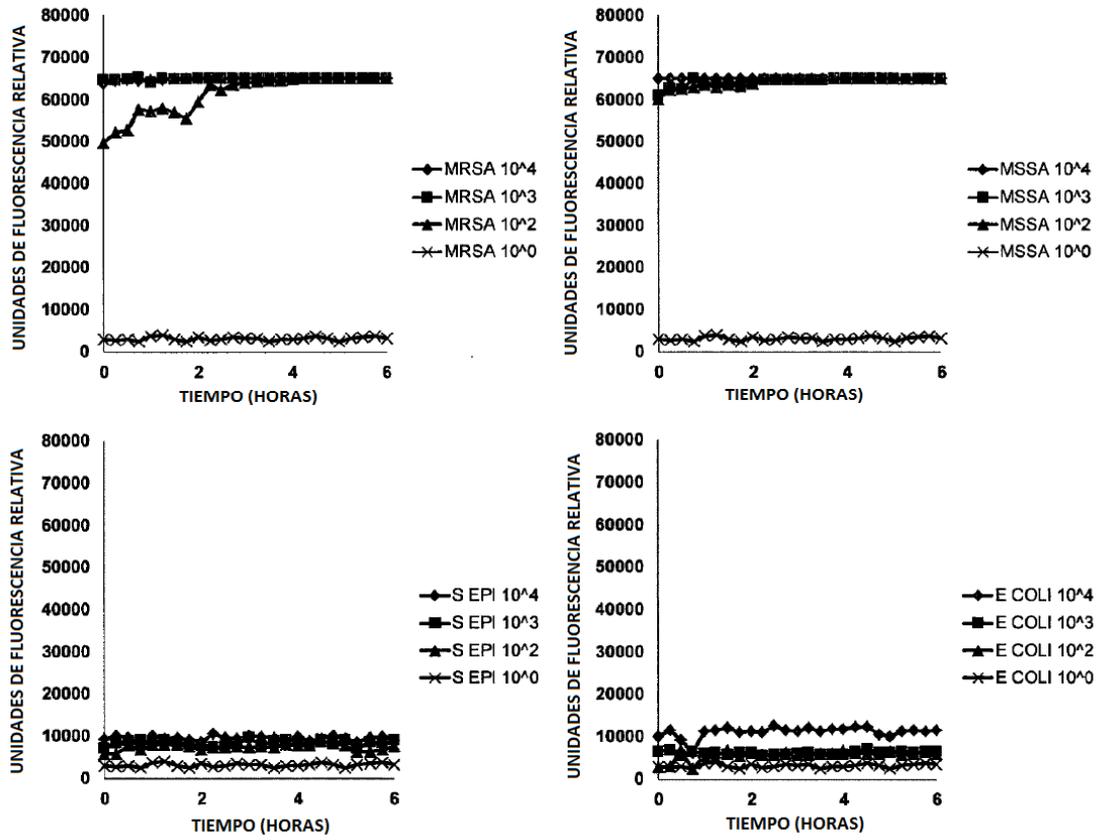
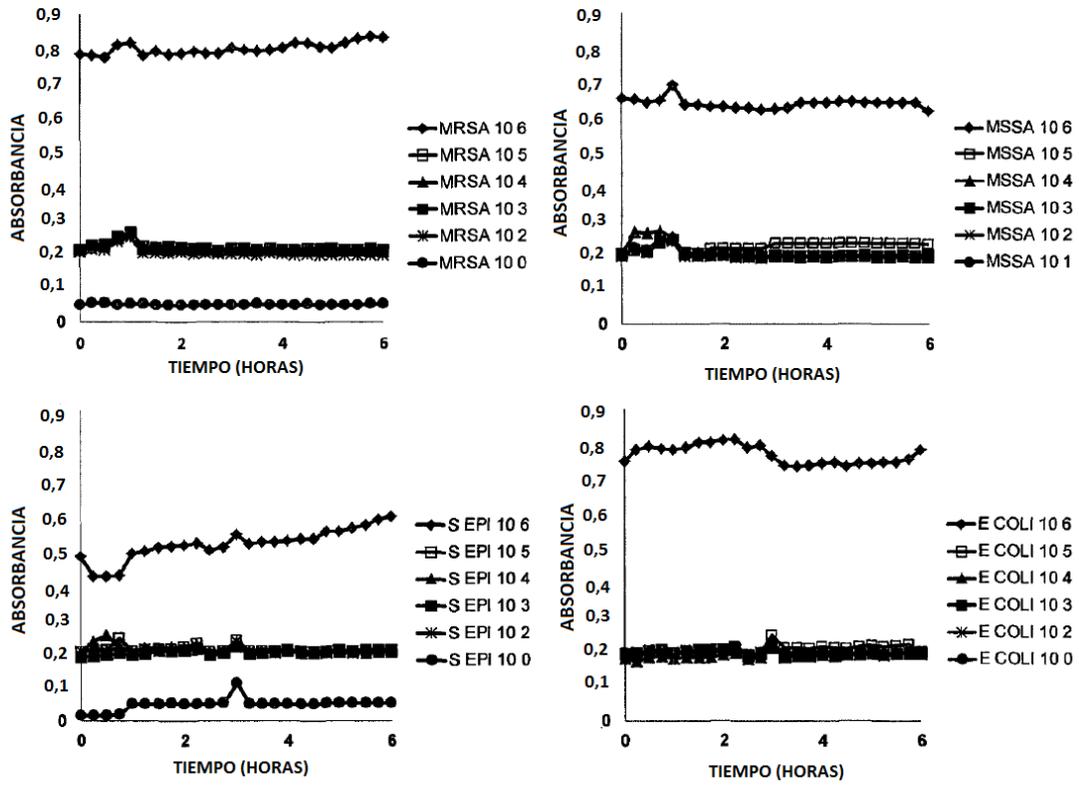
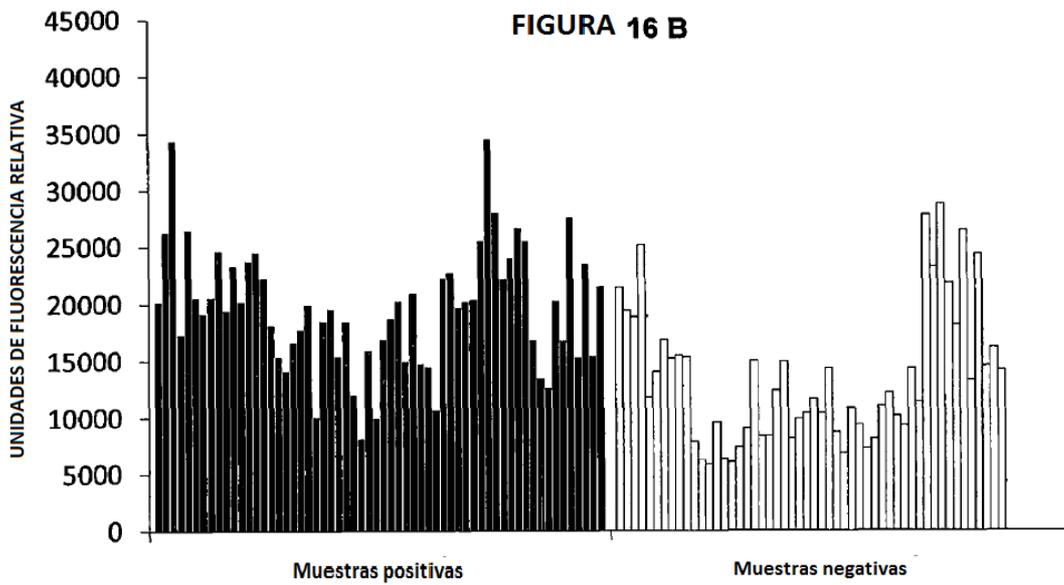
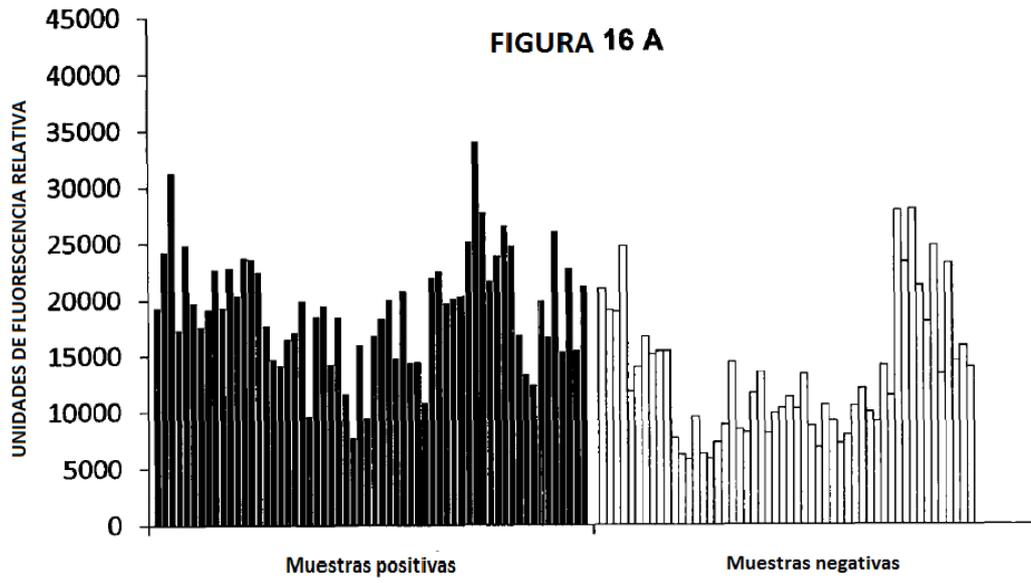
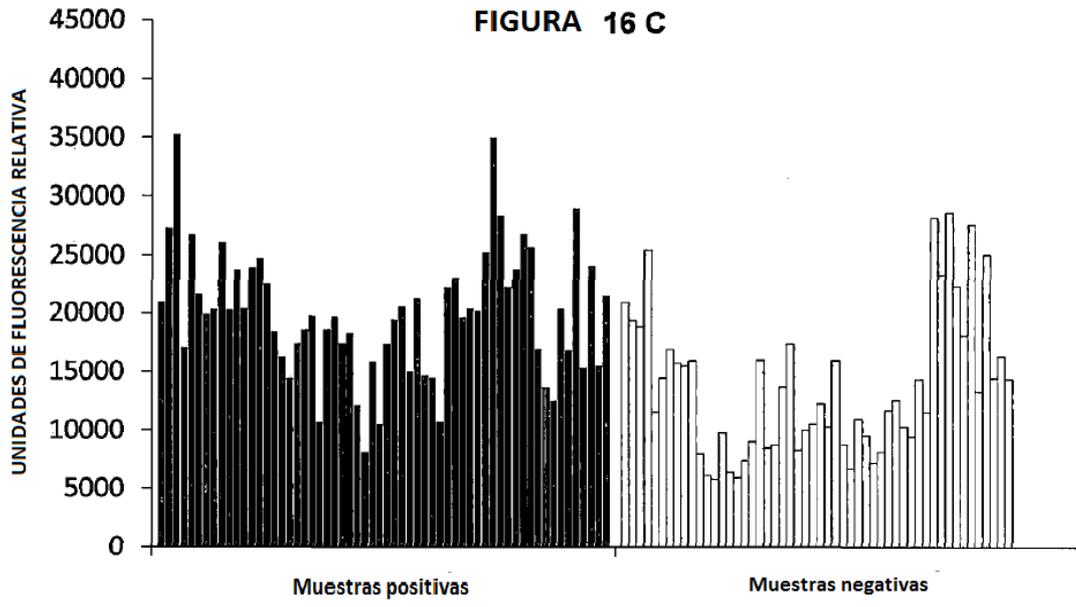
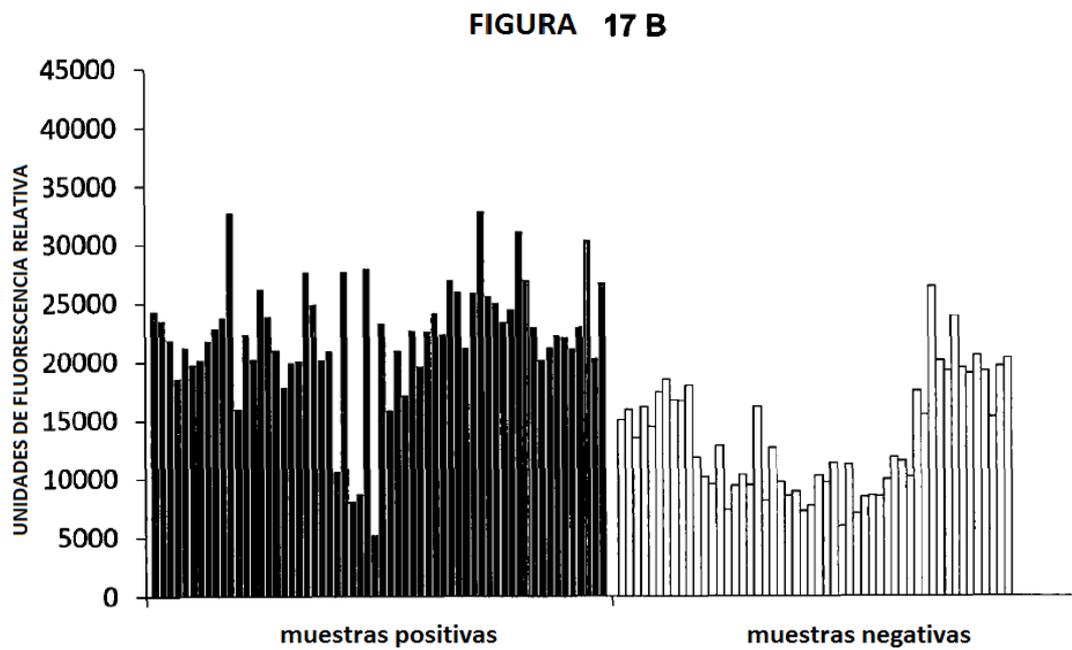
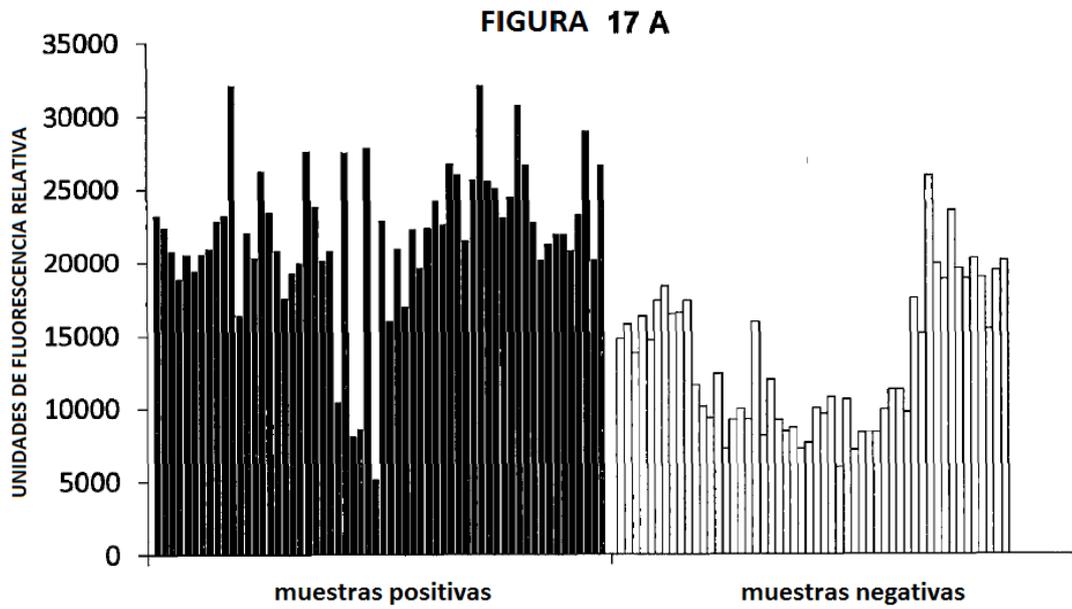


FIGURA 15









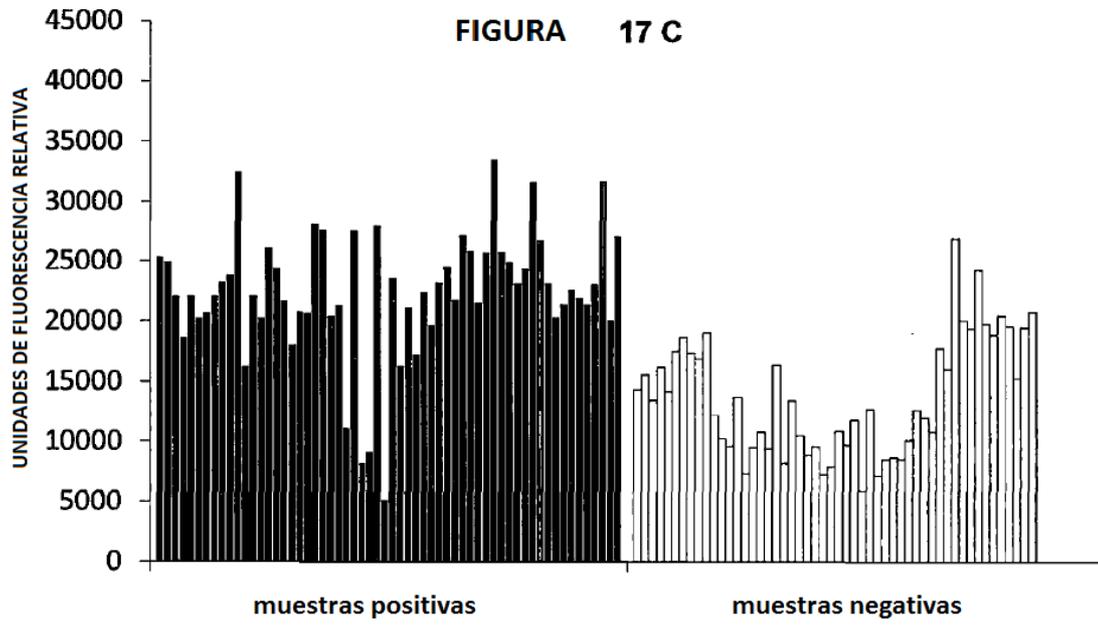


FIGURA 18

