

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 790**

51 Int. Cl.:

A61L 27/22	(2006.01) A61L 27/54	(2006.01)
A61L 27/34	(2006.01) A61L 29/06	(2006.01)
A61L 27/50	(2006.01) A61L 29/16	(2006.01)
A61L 29/04	(2006.01) A61L 31/06	(2006.01)
A61L 29/08	(2006.01) A61L 31/16	(2006.01)
A61L 29/14	(2006.01) C08L 71/02	(2006.01)
A61L 31/04	(2006.01) G01N 33/569	(2006.01)
A61L 31/10	(2006.01)	
A61L 31/14	(2006.01)	
A61L 27/18	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2015 PCT/NL2015/050771**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16076707**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2015 E 15830877 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3218024**

54 Título: **Recubrimiento desactivado**

30 Prioridad:

13.11.2014 NL 2013786

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

07.05.2019

73 Titular/es:

**ORIGINAL G B.V. (100.0%)
Verdilaan 1
9603 AP Hoogezand, NL**

72 Inventor/es:

GAZENDAM, JURJEN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 711 790 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

Recubrimiento desactivado

5 [0001] La presente invención se refiere a un recubrimiento de superficie de objeto, un método para preparar un recubrimiento de superficie de objeto, así como el uso de un recubrimiento de superficie de objeto para la detección de microorganismos.

10 [0002] El crecimiento de microorganismos patógenos en superficies, por ejemplo, dispositivos médicos y superficies de preparación de alimentos conduce al desarrollo de infecciones. Actualmente no hay medios para detectar de forma barata y rápida la presencia de microorganismos patógenos en dispositivos médicos y superficies de preparación de alimentos. El estándar actual para detectar la presencia de microorganismos en la superficie es a través de un cultivo microbiológico tomado de una muestra que se sospecha que está contaminada. Los dispositivos médicos implantados necesitan retirarse antes de recoger una muestra para cultivo. Las desventajas de tales ensayos son que son largos, costosos y trabajosos, y requieren la eliminación del implante.

15 [0003] Intentos de superar tales problemas respecto a los dispositivos médicos se conocen en el estado de la técnica. Por ejemplo, US6306422 describe un implante recubierto con una matriz de hidrogel, que incluye agentes activos embebidos liberables, tales como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico, debido a cambios ambientales. Mediante un cambio de pH en el huésped en la ubicación del implante, se liberan los agentes activos incluidos.

[0004] Un inconveniente de tales implantes es que el implante no es sensible a un microbio patógeno específico y, por tanto, son posibles los falsos positivos debido a causas puramente ambientales y no microbianas.

20 [0005] En el estado de la técnica se conocen recubrimientos de superficies de objetos para la detección de microorganismos. WO2014098603 describe la liberación de agentes terapéuticos y/o de diagnóstico de un recubrimiento de superficie de objeto en presencia de microbios patógenos específicos. Un inconveniente de tal recubrimiento es que un agente fluorescente se libera en la matriz o el área circundante. La detección del agente fluorescente liberado es por tanto dependiente de la difusión hacia afuera desde el recubrimiento de superficie. En
25 casos de una difusión lenta, puede producirse un falso negativo.

[0006] Es un objetivo de la presente invención resolver los problemas de recubrimientos de superficies de objetos en el estado de la técnica.

30 [0007] La presente invención proporciona un recubrimiento de superficie de objeto que incluye uno o más polímeros y un péptido unidos de manera covalente a al menos uno de dichos uno o más polímeros, incluyendo dicho péptido:

- 35 a) un primer sitio de escisión, donde dicho primer sitio de escisión es escindido por un primer compuesto específicamente proporcionado por un microbio perteneciente a un primer grupo que consiste en un número limitado de cepas, especies o géneros microbianos, y no escindido por cualquier compuesto proporcionado por cualquier microbio no perteneciente a dicho primer grupo,
b) un primer agente fluorescente con una longitud de onda de emisión de 650-900 nm,
c) un primer agente no fluorescente con una longitud de onda de absorción de 650-900 nm, para desactivar dicha emisión de dicho primer agente fluorescente,

40 donde la escisión de dicho primer sitio de escisión resulta en la liberación de dicho primer agente desactivador del recubrimiento, siendo la liberación de dicho primer agente indicativa de la presencia de un microbio perteneciente a dicho primer grupo.

[0008] La presente invención proporciona un recubrimiento de superficie de objeto que incluye:

- 45 a) uno o más polímeros,
b) un primer agente fluorescente con una longitud de onda de emisión de 650-900 nm,
c) un primer agente no fluorescente con una longitud de onda de absorción de 650-900 nm, para desactivar dicha emisión de dicho primer agente fluorescente,
d) un péptido unido de manera covalente a al menos uno de dichos uno o más polímeros, incluyendo dicho péptido el primer agente no fluorescente con una longitud de onda de absorción de 650-900 nm, para desactivar dicha emisión de dicho primer agente fluorescente y un primer sitio de escisión,

donde dicho primer sitio de escisión es escindido por un primer compuesto específicamente proporcionado por un microbio perteneciente a un primer grupo que consiste en un número limitado de cepas, especies o géneros microbianos, y no escindido por cualquier compuesto proporcionado por cualquier microbio no perteneciente a dicho primer grupo,

5 donde la escisión de dicho primer sitio de escisión resulta en la liberación de dicho primer agente no fluorescente del recubrimiento, siendo la liberación de dicho primer agente no fluorescente indicativa de la presencia de un microbio perteneciente a dicho primer grupo.

10 [0009] La invención proporciona un recubrimiento de superficie de objeto donde la escisión del primer sitio de escisión resulta simultáneamente en la escisión del primer agente no desactivador del recubrimiento de superficie de objeto de modo que la emisión del primer agente fluorescente se puede detectar.

[0010] En una forma de realización preferida, la escisión del primer sitio de escisión no resulta en la liberación del primer agente fluorescente del recubrimiento de superficie de objeto. En otras palabras, después de la escisión del primer sitio de escisión, el primer agente fluorescente permanece unido de manera covalente al recubrimiento de superficie de objeto.

15 [0011] El efecto de liberar solo el primer agente no fluorescente del recubrimiento de superficie de objeto es que el recubrimiento de superficie de objeto altera su estado de ser "oscuro", es decir, no emite ninguna luz de longitud de onda 650-900 nm, a un estado "iluminado", que emite luz de longitud de onda 650-900 nm, luz emitida que se puede registrar con un detector adecuado. Una ventaja de tal alteración de un estado "oscuro (apagado)" a un estado "iluminado (encendido)" es que se reduce la posibilidad de falsos positivos.

20 [0012] Por ejemplo, en los recubrimientos del estado de la técnica que no incluyen una fracción no fluorescente según la presente invención, un recubrimiento de superficie de objeto emite luz en ausencia de microorganismos, pero, en presencia de microorganismos, el agente fluorescente se libera del recubrimiento y el recubrimiento cambia a un estado oscuro en el que no se emite ninguna luz. Sin embargo, en este caso el recubrimiento de superficie de objeto podría todavía emitir luz si el primer agente fluorescente no se difunde hacia afuera desde el recubrimiento, de modo que se observaría un resultado falso. En el recubrimiento según la presente invención, la posibilidad de tales falsos positivos se reduce porque, tan pronto como se produce la escisión, la distancia entre el primer agente fluorescente y el primer agente no fluorescente aumenta de manera que la emisión ya no está desactivada.

30 [0013] Sin desear estar limitado por la teoría, la liberación del primer agente no fluorescente a partir de un recubrimiento de superficie de objeto significa que la desactivación de la luz emitida del primer agente fluorescente no depende de la difusión del primer agente fluorescente hacia afuera desde el recubrimiento de superficie de objeto como en los recubrimientos del estado de la técnica.

35 [0014] Esta escisión la efectúa un compuesto, proporcionado por un microbio, perteneciente a un grupo que consiste en un número limitado de cepas, especies o géneros microbianos. Los miembros de este grupo, por cuestión de facilidad indicado como el primer grupo, de cepas, especies o géneros microbianos son capaces de proporcionar específicamente un compuesto, que escinde el dicho sitio de escisión. El término "específicamente" significa que las cepas, especies o géneros microbianos no pertenecientes al dicho primer grupo no son capaces de proporcionar un compuesto que pueda reconocer y escindir el dicho sitio de escisión, a diferencia de los miembros de dicho primer grupo. El compuesto se puede proporcionar, por ejemplo, por liberación del dicho compuesto de un microbio o puede, por ejemplo, presentarse en la superficie externa del mismo. En este último caso, la escisión se efectuará tras el contacto del microbio con el recubrimiento, mientras que cuando se libera el compuesto del microbio, el microbio puede estar a una distancia del objeto recubierto, siempre y cuando el compuesto liberado sea capaz de llegar al recubrimiento después de la liberación desde el microbio.

45 [0015] También es posible para el microbio perteneciente a un cierto grupo, tras la infección de un huésped, inducir la liberación o producción de un compuesto particular por el huésped. En este último caso, el huésped no produce o libera este compuesto tras la infección de otro microbio, no perteneciente al dicho grupo. La escisión la puede efectuar el compuesto o puede, por ejemplo, inducirse por la unión del dicho compuesto que forma un complejo, complejo que es reconocido por un factor de escisión, presente en el entorno del recubrimiento, es decir, proporcionado por el microbio o un huésped infectado por el microbio y que incluye el objeto. Para que los microbios pertenezcan a un cierto grupo, tal como el primer grupo de cepas, especies, o géneros, la presencia de estos microbios debe inducir la escisión del sitio de escisión, mientras que la escisión no es inducida por los microbios de otro grupo. Esta escisión puede ocurrir por el mismo compuesto, pero también por una pluralidad de diferentes compuestos, siempre que estos compuestos induzcan la escisión del dicho mismo sitio de escisión. Por ejemplo, el primer grupo incluye tres especies bacterianas diferentes, la primera y la segunda especie proporcionan el mismo compuesto que escinde el sitio de escisión del recubrimiento, la tercera especie

proporciona un compuesto que difiere del compuesto de la primera y la segunda especie, pero también escinde específicamente el mismo sitio de escisión en el recubrimiento. El término "limitado" significa que tal grupo no incluirá todos los microbios, o todas las bacterias, sino menos, es decir, un número limitado, de modo que la liberación del primer agente es en efecto indicativa de uno o más microbios, pero no de todos o cualquier microbio o bacteria, etc.

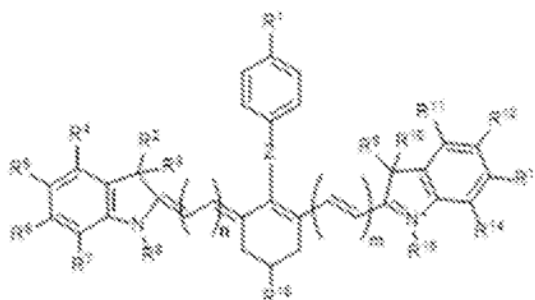
[0016] En una forma de realización, el primer agente fluorescente tiene una longitud de onda de emisión de 300-450 nm, preferiblemente 450-650 nm, aún más preferiblemente 650-900 nm.

[0017] El primer agente fluorescente con una longitud de onda de emisión de 650-900 nm puede ser cualquier compuesto que emita luz en la longitud de onda requerida de 650-900 nm y que tenga un solapamiento espectral con el primer agente no fluorescente de modo que, cuando el primer agente fluorescente y el primer agente no fluorescente están ambos presentes en el péptido no escindido en el recubrimiento de superficie de objeto, no se emite ninguna luz.

[0018] En una forma de realización, el primer agente fluorescente con una longitud de onda de emisión de 450-650 nm puede ser cualquier compuesto que emita luz en la longitud de onda requerida de 450-650 nm y que tenga un solapamiento espectral con el primer agente no fluorescente de modo que, cuando el primer agente fluorescente y el primer agente no fluorescente están ambos presentes en el péptido no escindido en el recubrimiento de superficie de objeto, no se emite ninguna luz.

[0019] En otra forma de realización, el primer agente fluorescente con una longitud de onda de emisión de 300-350 nm puede ser cualquier compuesto que emita luz en la longitud de onda requerida de 300-350 nm y que tenga un solapamiento espectral con el primer agente no fluorescente de modo que, cuando el primer agente fluorescente y el primer agente no fluorescente están ambos presentes en el péptido no escindido en el recubrimiento de superficie de objeto, no se emite ninguna luz.

[0020] El primer agente no fluorescente con una longitud de onda de absorción de 650-900 nm, es un compuesto que tiene poca o ninguna fluorescencia intrínseca y que puede desactivar eficazmente la fluorescencia de un fluoróforo NIR próximo con poco fondo, se necesita. En una forma de realización, el primer colorante no fluorescente es una molécula de cianina. Las moléculas de cianina, referidas también como colorantes de cianina, incluyen compuestos que tienen dos anillos heterocíclicos que contienen nitrógeno sustituidos o no sustituidos unidos por una cadena de polimetina (fórmula I):



Fórmula I

[0021] En una forma de realización, el primer agente fluorescente es un colorante de cianina con la fórmula general como se muestra en la fórmula I, donde R^1 se selecciona del grupo que consiste en H, hidrocarbilo, halo, carboxilo, amino y SO_3-Cat^+ donde Cat^+ es un catión, preferiblemente un metal alcalinotérreo, preferiblemente sodio, potasio o litio; Z se selecciona del grupo que consiste en H O, S, NH y N-hidrocarbilo; R^2, R^3, R^9, R^{10} se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H e hidrocarbilo, R^4, R^5, R^{11}, R^{12} se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, hidrocarbilo y sulfanato o forman un anillo aromático junto con los átomos a los que están unidos; R^6, R^7, R^{13}, R^{14} se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H e hidrocarbilo, o forman un anillo aromático junto con los átomos a los que están unidos; R^8 y R^{15} se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrocarbilo, $(CH_2)_qFG$ o $(CH_2)_pLN$ donde al menos uno de R^8 y R^{15} es $(CH_2)_qFG$, donde q es un número entero de 1 a 20 y FG es un grupo funcional que no reacciona directamente con grupos carboxilo, hidroxilo, amino o tiol, donde p es un número entero de 1 a 20 y LN es un grupo conector que reacciona con grupos carboxilo, hidroxilo, amino o tiol; R^{15} es H o hidrocarbilo.

[0022] El primer agente no fluorescente también puede ser, por ejemplo, BHQ3 (Biosearch), QC-1 (Li-COR.com) o partículas que incluyen tales compuestos, por ejemplo, nanopartículas de oro y nanopartículas de hierro.

[0023] En una forma de realización, el uno o más polímeros se seleccionan del grupo que consiste en polietilenglicol, diacrilato de polietilenglicol, polilactida, alcohol polivinílico, copolímero de poli DL-lactida-co-glicólido/polietilenglicol y combinaciones de los mismos.

5 [0024] Se ha descubierto que los polímeros a base de polietilenglicol son polímeros ventajosos para recubrimientos de superficies de objetos debido a la naturaleza biocompatible de los polímeros a base de polietilenglicol.

10 [0025] En una forma de realización, el péptido está unido de manera covalente a través del extremo N- o C-terminal o una cadena lateral con al menos uno de dicho uno o más polímeros mediante un conector de hidrocarbilo C4-C30, preferiblemente a través del extremo C-terminal o una cadena lateral, más preferiblemente a través del extremo C-terminal.

15 [0026] El término hidrocarbilo como se usa en la presente descripción significa un conector que contiene átomos de hidrógeno y carbono; es lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, tal como un alquilo, alquenilo y alquinilo; sustituyente alicíclico tal como cicloalquilo, cicloalquenilo; aromático. Se puede sustituir con uno o más grupos de sustituyente no hidrocarbilo, por ejemplo, un heteroátomo. Un conector preferido se selecciona del grupo que consiste en 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono.

[0027] Los inventores han descubierto que uniendo de manera covalente un péptido a través del extremo C terminal a uno o más polímeros del recubrimiento de superficie de objeto, el sitio de escisión se presenta en una orientación que facilita la escisión por un microorganismo.

20 [0028] En una forma de realización, el recubrimiento de superficie de objeto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el conector C4-C30 incluye un grupo hidrocarbilo cíclico o un grupo cíclico heterocíclico, preferiblemente dicho grupo heterocíclico es un grupo triazol.

25 [0029] En una forma de realización de la presente invención, el conector se puede instalar a través de la reacción de un grupo reactivo en el extremo N- o C-terminal o una cadena lateral del péptido con un grupo reactivo complementario en el polímero. Un grupo reactivo particularmente preferido es el grupo azida y un grupo reactivo complementario preferido es el grupo alquino. La reacción de la azida y el alquino procede en presencia de los primeros agentes fluorescente y no fluorescente sin que ocurran reacciones secundarias no deseadas.

[0030] Los ejemplos adicionales incluyen varias reacciones de acoplamiento catalizadas por Pd(0), reacción de Staudinger, reacciones de cicloadición (Diels-Alder, cicloadición 1,3-dipolar), alquilación reductora, formación de oxima e hidrazina, reacciones de adición de tiol y acoplamiento oxidativo.

30 [0031] En una forma de realización, el primer sitio de escisión es escindido por un compuesto proporcionado por bacterias gram-positivas o bacterias gram-negativas, preferiblemente bacterias gram-positivas, más preferiblemente de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Actinobacteria* y *Listeria*.

35 [0032] Una ventaja del recubrimiento de superficie de objeto según la invención es que el recubrimiento se puede diseñar de manera que el recubrimiento solo es sensible a un grupo determinado de microorganismos. Por ejemplo, en una forma de realización preferida, el primer sitio de escisión es escindido por un compuesto proporcionado por bacterias gram-positivas, tales como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Actinobacteria* y *Listeria*. En una forma de realización particularmente preferida, las bacterias gram-positivas se seleccionan de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, más preferiblemente *Staphylococcus*.

40

[0033] En una forma de realización, el primer sitio de escisión es escindido por un compuesto proporcionado por bacterias gram-negativas tales como *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* y *Campylobacter jejuni*.

[0034] En una forma de realización, el primer compuesto es una proteasa seleccionada del grupo que consiste en endoproteinasa Glu-C de *Staphylococcus aureus* V8, proteasa IgA1, aureolisina.

45 [0035] Un ejemplo de un compuesto que es específico para bacterias gram-positivas es la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*, también conocida como endoproteinasa Glu-C, proteasa Glu-C, serina proteinasa estafilocócica, serina endopeptidasa de *Staphylococcus* V8. Esta proteasa escinde específicamente en el lado carboxilo de residuos de aspartato y glutamato.

[0036] En una forma de realización, el primer sitio de escisión incluye un motivo de aminoácido específico que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en EFRIV, EFRIK, DFRIK, GIGEFRIK, GIGDFRIK.

5 [0037] En una forma de realización preferida, el sitio de escisión incluye un aminoácido seleccionado del grupo de serina, treonina, arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico, preferiblemente ácido aspártico y ácido glutámico, estando dicha escisión comprendida en un compuesto de al menos una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Actinobacteria* y *Listeria*.

10 [0038] En una forma de realización preferida, el sitio de escisión incluye un aminoácido seleccionado del grupo de alanina, leucina, valina, isoleucina y prolina, estando la escisión comprendida en un compuesto de al menos una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* y *Campylobacter jejuni*.

[0039] Se entiende por la presente que el sitio de escisión tiene su bien conocido significado, que es una parte de la estructura molecular del recubrimiento de superficie de objeto, que es escindido por un compuesto específico donde el sitio de escisión incluye uno o más enlaces amídicos.

15 [0040] El sitio de escisión puede tener la estructura XYZ, donde X es al menos un aminoácido, Y es una parte de la estructura molecular compuesta por al menos dos aminoácidos que representan el primer sitio de escisión y Z es al menos un aminoácido. Los aminoácidos usados pueden ser cualquier aminoácido, elegido preferiblemente del grupo de aminoácidos de origen natural o del grupo de aminoácidos sintéticos, en particular derivados de aminoácidos naturales. Los aminoácidos son preferiblemente aquellos que permiten la unión del compuesto que efectúa la escisión del primer sitio de escisión.

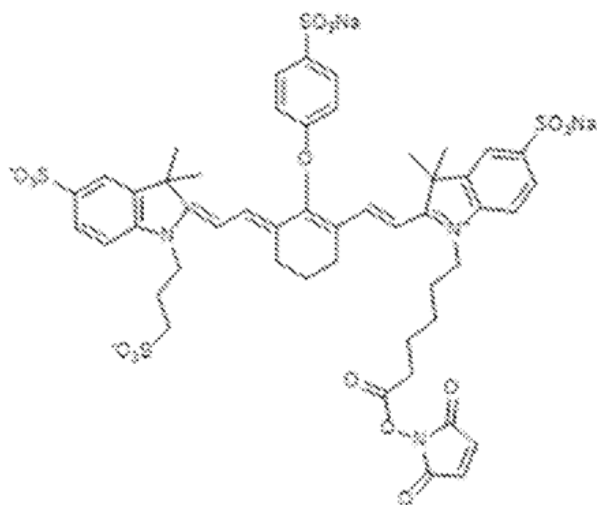
20 [0041] En una forma de realización, el primer sitio de escisión incluye aminoácidos que son sustratos y o sitios de unión para proteasas segregadas por microorganismos tales como bacterias gram-positivas tales como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Actinobacteria* y *Listeria*. En una forma de realización particularmente preferida, las bacterias gram-positivas se seleccionan de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, más preferiblemente *Staphylococcus*.

25 [0042] En una forma de realización, el primer sitio de escisión incluye aminoácidos que son sustratos y o sitios de unión para proteasas segregadas por microorganismos tales como bacterias gram-negativas tales como *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* y *Campylobacter jejuni*.

30 [0043] El péptido en el que el sitio de escisión está localizado puede incluir, por ejemplo, entre 4 y 14, por ejemplo, aminoácidos, por ejemplo, entre 5 y 12 aminoácidos, por ejemplo, entre 6 y 11 aminoácidos, por ejemplo, entre 7 y 10 aminoácidos y, por ejemplo, entre 8 y 9 aminoácidos. Preferiblemente, el péptido incluye 6 aminoácidos, 7 aminoácidos, 8 aminoácidos, 9 aminoácidos o 10 aminoácidos.

35 [0044] Un sitio de escisión incluye preferiblemente un número de aminoácidos, por ejemplo, al menos dos, preferiblemente al menos tres aminoácidos, más preferiblemente al menos cuatro aminoácidos, aún más preferiblemente al menos cinco aminoácidos, como se describe en el manual estándar Biochemistry, Ed. L Stryer, 7a edición, 2012, WH Freeman, parte 1, capítulo 2 Protein Composition and Structure. También se puede hacer referencia a la parte de la estructura molecular en un sitio de escisión como un "motivo de aminoácido". En la presente invención, el sitio de escisión se diseña de tal manera que es reconocido por un compuesto proporcionado por un microbio perteneciente a un grupo que consiste en un número limitado de cepas, especies o géneros microbianos.

40 [0045] En una forma de realización preferida, el primer agente fluorescente tiene la fórmula II:



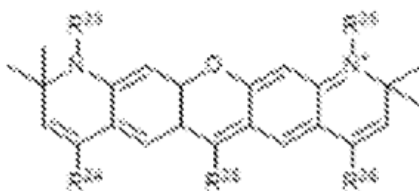
Fórmula II

donde Z es O, donde R¹ SO₃-Na⁺; R², R³, R⁹, R¹⁰ son hidrocarbilo, R⁴ y R¹¹ son H, R⁵ y R¹² sulfonato, R⁶, R⁷, R¹³, R¹⁴ son H, R⁸ (CH₃)_qSO₃⁻ y R¹⁵ éster de (CH₂)₅-H-hidroxisuccinimida, siendo el primer agente fluorescente 6-(2-
 5 (E)-2-[(3E)-3-[(2E)-2-[3,3-dimetil-5-sulfonato-1-(4-sulfonatobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]etilideno]-2-(4-sulfonatofenoxi)-1-ciclohexen-1-il]vinil]-3,3-dimetil-5-sulfonato-3H-indolio-1-il)hexanoato de tetrasodio y derivados de los mismos.

[0046] En una forma de realización, el derivado de 6-(2-((E)-2-[(3E)-3-[(2E)-2-[3,3-dimetil-5-sulfonato-1-(4-sulfonatobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno] etilideno)-2-(4-sulfonatofenoxi)-1-ciclohexen-1-il]vinil]-3,3-dimetil-5-sulfonato-3H-indolio-1-il)hexanoato de tetrasodio es una amida, ácido carboxílico o maleimida.

10 [0047] En una forma de realización, el primer agente fluorescente, por ejemplo, un colorante de cianina, y/o el primer agente no fluorescente está unido al péptido a través de un enlace amida, éster o un enlace con un producto de la adición de Michael.

[0048] En una forma de realización, el primer agente fluorescente es un compuesto según la fórmula III:



Fórmula III:

15 donde R²³ y R²⁵ son cada uno independientemente H o hidrocarbilo, R²⁴ y R²⁶ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, hidrocarbilo y (CH₂)_qFG, donde q es un número entero de 1 a 20 y FG es un grupo funcional que no reacciona directamente con grupos carboxilo, hidroxilo, amino o tiol; R²⁷ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, hidrocarbilo y arilo, donde el arilo se sustituye opcionalmente por grupos cloro, halo o acilo.

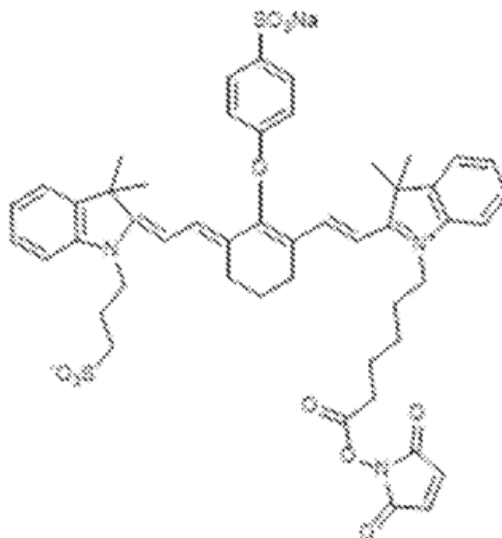
20 [0049] Los ejemplos de primeros agentes fluorescentes adecuados que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750 ATTO 680, ATTO 700, DY-647, DY-650, DY-673, DY-675, DY-676, DY-680, DY-681, DY-682, DY-690, DY-700, DY-701, DY-730, DY-731, DY-732, DY-734, DY-750, DY-751, DY-752, DY-776, DY-776, DY-781, DY-782, DY-831, La Jolla Blue, 25 Cy5, Cy5.5, Cy7, IRDye® 800CW, IRDye® 38, IRDye® 800RS, IRDye® 700DX, IRDye® 680, entre otros. Los

5 colorantes "Alexa Fluor" están disponibles en Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EE.UU. (www.probes.com). Los colorantes "ATTO" están disponibles en ATTO-tec GmbH, Siegen, Alemania (www.atto-tec.com). Los colorantes "DY" están disponibles en Dyomics GmbH, Jena, Alemania (www.dyomics.com). La Jolla Blue está disponible en Hyperion Inc. Los colorantes "Cy" están disponibles en Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE.UU., (www.amersham.com). Los colorantes "IRDye® infrared dyes" están disponibles en LI-COR® Bioscience, Inc., Lincoln, NE, EE.UU. (www.licor.com).

10 [0050] En una forma de realización, el primer agente no fluorescente es un colorante de cianina con una longitud de onda de absorción de 650-900 nm. Una ventaja de los colorantes de cianina en las longitudes de onda del infrarrojo cercano es que la detección del infrarrojo cercano reduce el fondo, la dispersión y la interferencia causadas por otros compuestos en la muestra que se está midiendo, mejorando la fiabilidad del método inventivo en sistemas tanto *ex vivo* como *in vivo*. Además, tales longitudes de onda son capaces de penetrar el tejido, lo que hace que tales colorantes sean especialmente adecuados para aplicaciones *in vivo*.

15 [0051] En una forma de realización preferida, el agente no fluorescente es - dietilamino-5-fenilfenazío-7-diazobenzeno-4"--(N-etil-2-O-(4,4'-dimetoxitritil))-N-etil-2-O (BHQ3) (Biosearch), QC-1, IRDye® 800RS (Li-COR.com), nanopartículas de oro y nanopartículas de hierro.

[0052] En una forma de realización, el primer agente no fluorescente es un compuesto de fórmula IV:



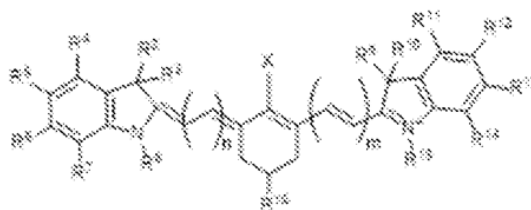
Fórmula IV

donde Z es O, donde R¹ SO₃-Na⁺; R², R³, R⁹, R¹⁰ son hidrocarbilo, R⁴ y R¹¹ son R⁵ y R¹² son H, R⁶, R⁷, R¹³, R¹⁴ son H, R⁸ (CH₃)qSO₃⁻ y R¹⁵ éster de (CH₂)₅-H-hidroxisuccinimida.

20 [0053] En una forma de realización preferida, cuando el primer agente fluorescente es el mismo que el primer agente no fluorescente, dicho primer agente fluorescente es el compuesto según la fórmula IV, IRDye® 800RS. En esta forma de realización, el IRDye® 800RS tiene la propiedad de autodesactivar la luz emitida en el recubrimiento. Cuando una proporción del IRDye® 800RS se elimina del recubrimiento, hay un aumento de la distancia entre las moléculas de IRDye® 800RS, de modo que se produce un grado inferior de autodesactivación y, por tanto, se emite luz desde el recubrimiento.

25

[0054] Alternativamente, el primer agente no fluorescente es un compuesto de fórmula V:

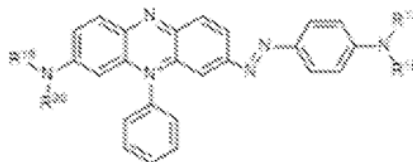


Fórmula V

donde X se selecciona del grupo que consiste en H, cloro, flúor, bromo, O-arilo donde el arilo se para-sustituye con un grupo seleccionado del grupo que consiste en sulfonato, halógeno, hidroxilo y amina; R², R³, R⁹, R¹⁰ son cada uno independientemente H o hidrocarbilo, R⁴, R⁵, R¹¹, R¹² se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, hidrocarbilo, sulfonato y N-hidrocarbilo o forman un anillo aromático junto con los átomos a los que están unidos; R⁶, R⁷, R¹³, R¹⁴ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, sulfonato, hidrocarbilo, o forman un anillo aromático junto con los átomos a los que están unidos; R⁸ y R¹⁵ son cada uno independientemente hidrocarbilo, (CH₂)_qFG o (CH₂)_pLN donde al menos uno de R⁸ y R¹⁵ es (CH₂)_qFG, donde q es un número entero de 1 a 20 y FG es un grupo funcional que no reacciona directamente con grupos carboxilo, hidroxilo, amino o tiol, donde p es un número entero de 1 a 20 y LN es un grupo conector que reacciona con grupos carboxilo, hidroxilo, amino o tiol; R¹⁵ es H o hidrocarbilo.

[0055] Preferiblemente, el compuesto de fórmula V es un compuesto donde X es cloro; R², R³, R⁹, R¹⁰ hidrocarbilo, R⁴, R⁶, R⁷, R¹¹, R¹²; R¹⁴ son H, R⁵ es N-hidrocarbilo; R¹³ es sulfonato, R⁸ (CH₂)₅SO₃⁻ y R¹⁵ éster de (CH₂)₅-H-hidroxisuccinimida, siendo dicho primer agente no fluorescente 4-((E)-6-((E)-2-[3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)-indolin-2-ilideno]etilideno)-2-((E)-2-(1-6-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-6-oxihexilo)-3,3-dimetil-3H-indolio-2il)vinil)ciclohex-1-eniloxi)bencenosulfonato de sodio.

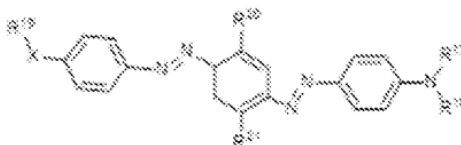
[0056] En otra forma de realización, el primer agente no fluorescente es un compuesto según la fórmula VI:



Fórmula VI

donde R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹ y R²⁰ son cada uno independientemente hidrocarbilo o hidrocarbilo sustituido donde el hidrocarbilo se sustituye por grupos hidroxilo, halo, fósforo o sulfonato.

[0057] En otra forma de realización, el primer agente no fluorescente es un compuesto según la fórmula VII:



Fórmula VII

donde R¹⁷, R¹⁸ y R¹⁹ se cada uno independientemente hidrocarbilo o hidrocarbilo sustituido donde el hidrocarbilo se sustituye por grupos hidroxilo, halo, fosfo o sulfonato; R²⁰ y R²¹ son grupos H, hidrocarbilo, alcoxi o halo.

[0058] En una forma de realización, el primer agente no fluorescente tiene una longitud de onda de absorción de 300-450 nm, preferiblemente 450-650 nm, aún más preferiblemente 650-900 nm. El primer agente no fluorescente se selecciona de manera que se obtenga un solapamiento espectral bueno con el primer agente fluorescente de modo que, cuando el dicho primer agente no fluorescente y dicho primer agente fluorescente están cerca, se desactiva la emisión de una señal de dicho primer agente fluorescente.

[0059] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un recubrimiento de superficie de objeto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye los pasos de:

- a) proporcionar un péptido que incluye el primer agente fluorescente, el primer agente no fluorescente, el primer sitio de escisión y un alquino reactivo
- b) poner en contacto el péptido obtenido en el paso a) con un diacrilato C5-C25 que incluye un grupo azida,
- c) reticulación del conjugado péptido-diacrilato obtenido en el paso b) con uno o más polímeros.

[0060] Los inventores han descubierto que la incorporación en el recubrimiento del primer agente fluorescente y el primer agente no fluorescente en un péptido modificado con diacrilato, la síntesis del recubrimiento de superficie de objeto es más eficiente que en los métodos del estado de la técnica. Se sabe que en el estado de la técnica se mezclan polímeros marcados con fluorescencia y luego se reticulan los polímeros mezclados. En el método según la invención, no es necesario marcar el polímero directamente. Esto resulta en una síntesis más eficiente en cuanto a átomos y eficiente en cuanto a tiempo que aquellos del estado de la técnica.

[0061] En un tercer aspecto, se proporciona un objeto que incluye un recubrimiento de superficie de objeto según la invención, en el que dicho objeto se selecciona del grupo que consiste en implantes médicos, instrumentos médicos, hisopos médicos, placas de micropocillos, superficies de preparación de alimentos, mobiliario.

[0062] El recubrimiento de superficie de objeto de la presente invención es adecuado para uso en una amplia variedad de sustratos. La ventaja de la presente invención es que se puede usar para detectar la presencia de infección bacteriana en un implante médico, instrumentos médicos y mobiliario. El mobiliario adecuado es, por ejemplo, camas de hospital, mesas de hospitales, mesas de operaciones, cuyas superficies es deseable que permanezcan limpias y, si una bacteria patógena está presente, se detecte rápidamente.

[0063] En una forma de realización, el objeto se selecciona del grupo de agujas, catéteres, guías de alambre, tornillos, placas para implantes y clavos para implantes.

[0064] El recubrimiento de superficie de objeto de la presente invención es particularmente adecuado para usarse en objetos que se deben implantar en el cuerpo. Usando implantes que están recubiertos con el recubrimiento de la presente invención, una infección bacteriana puede detectarse fácilmente y, así, el profesional médico puede decidir fácilmente el siguiente tratamiento.

[0065] En un cuarto aspecto, se proporciona un método de recubrimiento de un objeto que incluye los pasos de:

- a) proporcionar un recubrimiento de superficie de objeto según la invención,
- b) revestimiento por inmersión del objeto seleccionado del grupo que consiste en implantes médicos e instrumentos médicos que se van a recubrir con el recubrimiento de superficie del paso a),
- c) secar dicho objeto obtenido en el paso b).

[0066] Un objeto según la presente invención puede recubrirse con dicho recubrimiento polimérico usando técnicas tales como recubrimiento por inmersión, recubrimiento por pulverización, recubrimiento por rotación (spin coating) o fundición con disolvente. Las técnicas de recubrimiento que implican el injerto químico de moléculas sobre la superficie de biomateriales están también disponibles. Los recubrimientos nanofinos basados en monocapas autoensambladas (SAM), polímeros atados a la superficie (cepillos poliméricos) o recubrimientos multicapa basados en ensamblaje capa por capa ofrecen un control preciso de la ubicación y orientación de los grupos químicos y las biomoléculas en la superficie del recubrimiento se conocen comúnmente en la técnica para aplicar varios recubrimientos a componentes ortopédicos y otros dispositivos médicos para una variedad de razones, véase, Handbook of Materials for Medical Devices, Davis, J. R. (Ed.), capítulo 9, "Coatings" 2003.

[0067] En un quinto aspecto, se proporciona un método de recubrimiento de un objeto que incluye los pasos de:

- a) proporcionar un recubrimiento de superficie de objeto según la invención, y
- b) poner en contacto un objeto seleccionado del grupo que consiste en hisopos médicos, placas de micropocillos, superficies de preparación de alimentos, mobiliario con el recubrimiento de superficie del paso a).

[0068] En una forma de realización particularmente preferida, el recubrimiento de superficie de objeto se proporciona en un disolvente, por ejemplo, un disolvente acuoso u orgánico, que se puede aplicar a una superficie, por ejemplo, hisopos médicos, placas de micropocillos, superficies de preparación de alimentos, mobiliario. El recubrimiento se puede aplicar, por ejemplo, mediante pintura. Alternativamente, el recubrimiento puede estar comprendido en una cinta adhesiva. La ventaja de aplicar el recubrimiento mediante pintura o

mediante cinta adhesiva es que se proporciona un medio fácil y eficiente en el tiempo para proporcionar un objeto con un recubrimiento de superficie para la detección de microorganismos patógenos.

[0069] En un sexto aspecto, se proporciona un método para preparar un recubrimiento de superficie de objeto según la invención, que incluye los pasos de:

- 5 a) proporcionar una superficie de objeto que incluye dicho uno o más polímeros, dicho uno o más polímeros que incluyen un grupo reactivo A y
 b) poner en contacto la superficie de objeto según el paso a) con el péptido que incluye el primer agente fluorescente, el primer agente no fluorescente, el primer sitio de escisión y un grupo reactivo B complementario al grupo reactivo A,

10 para preparar dicho recubrimiento de superficie de objeto.

[0070] Los inventores han descubierto que las superficies recubiertas con grupos alquínico, por ejemplo, superficies de vidrio o placas de microtitulación recubiertas con polímeros alquínico PEG, pueden reaccionar con péptidos, péptido que incluye un grupo de azida, siendo dicho grupo de azida complementario al dicho grupo de alquínico. Sorprendentemente, este método permite la producción fácil de superficies recubiertas de péptidos,
 15 superficies que liberan un agente fluorescente o no fluorescente en presencia de bacterias.

[0071] En una forma de realización, dicho grupo reactivo A se elige del grupo que consiste en alcohol (OH), tiol (SH), amina (NH₂), ácido (CO₂H), alquino, alqueno, azida, preferiblemente alquino o azida, más preferiblemente alquino.

[0072] En una forma de realización, dicho grupo reactivo B se elige del grupo que consiste en alcohol (OH), tiol (SH), amina (NH₂), ácido (CO₂H), alquino, alqueno, azida, preferiblemente alquino o azida, más preferiblemente azida.
 20

[0073] En una forma de realización, el producto de la reacción de grupo reactivo A y grupo reactivo B es un grupo elegido del grupo que consiste en un éster, amida, carbamato, tioéster, maleimida y un enlace con un producto de la adición de Michael.

[0074] En una forma de realización, el péptido que incluye el primer sitio de escisión y el primer agente fluorescente y el primer agente no fluorescente incluye además un grupo reactivo A. Dicho grupo reactivo A se elige del grupo que consiste en alcohol, tiol, amina, ácido carboxílico, azida o grupo de hidrocarburo insaturado, por ejemplo, alquino o alqueno. Dicho péptido se pone en contacto con un recubrimiento de superficie de objeto que incluye el grupo reactivo B que es complementario al grupo reactivo A. El grupo reactivo B se elige del grupo
 30 de alcohol, tiol, amina, ácido carboxílico, azida y o grupo de hidrocarburo insaturado, por ejemplo, alquino o alqueno. Preferiblemente, el péptido incluye una azida y la superficie de objeto incluye un alquino. El grupo reactivo B puede estar unido de manera covalente a uno o más polímeros de la superficie de objeto. En la presente invención, el polímero puede ser orgánico o inorgánico. Ejemplos adecuados de polímeros orgánicos son polietilenglicol, diacrilato de polietilenglicol, polilactida, alcohol polivinílico, copolímero de poli DL-lactida-co-glicólido/polietilenglicol y combinaciones de los mismos. Ejemplos adecuados de polímeros inorgánicos son
 35 polímeros de sílice, por ejemplo, siloxanos, por ejemplo, siloxanos con una unidad de repetición (-O-SiR₂-O)_n, donde R es una cadena de hidrocarbilo, preferiblemente un hidrocarbilo C1-C20.

[0075] En una forma de realización, dicha superficie de objeto se somete a un pretratamiento. Dicho pretratamiento puede ser mecánico o químico. Dicho pretratamiento mejora la morfología de la superficie tal como
 40 rugosidad, textura y porosidad de, por ejemplo, superficies metálicas o plásticas, para mejorar la unión del recubrimiento de polímero.

[0076] En una forma de realización, se proporciona un método de detección de la emisión de fotones desde un objeto según la invención, que incluye el paso de irradiar el objeto con fotones con una longitud de onda de 650-900 nm y detectar los fotones emitidos.

[0077] Cuando el recubrimiento de superficie de objeto se ilumina con luz con una longitud de onda de 650-900 nm y está presente un microorganismo patógeno, microorganismo que libera un compuesto específico para el sitio de escisión en el recubrimiento de superficie de objeto, un detector adecuado detectará los fotones del recubrimiento. Tal método proporciona un medio fácil para determinar la presencia de un microorganismo patógeno. El método inventivo es ventajoso sobre los métodos del estado de la técnica, ya que no es necesario
 45 un cultivo microbiológico trabajoso, costoso y largo para establecer la presencia de, por ejemplo, una infección.
 50

[0078] En una forma de realización, se proporciona un método de detección de emisión de fotones desde un receptáculo recubierto con un recubrimiento de superficie de objeto según la invención, que incluye los pasos de poner en contacto el receptáculo con una muestra de fluido corporal y detectar los fotones emitidos.

5 [0079] Cuando el recubrimiento de superficie de objeto se pone en contacto con un fluido corporal, por ejemplo, saliva u orina o líquido extracelular en general, y se ilumina posteriormente con luz con una longitud de onda de 650-900 nm, y está presente un microorganismo patógeno, microorganismo que libera un compuesto específico para el sitio de escisión en el recubrimiento de superficie de objeto, un detector adecuado detectará los fotones del recubrimiento. Tal método proporciona un medio fácil para determinar la presencia de un microorganismo patógeno en la persona de la cual se tomó la muestra corporal. El método inventivo es ventajoso sobre los métodos del estado de la técnica, ya que no es necesario un cultivo microbiológico trabajoso, costoso y largo para establecer la presencia de, por ejemplo, una infección.

[0080] En otro aspecto, se proporciona un uso de un objeto según la invención para detectar la presencia de bacterias infecciosas.

15 [0081] El método inventivo es ventajoso sobre los métodos del estado de la técnica, ya que no es necesario un cultivo microbiológico trabajoso, costoso y largo para establecer la presencia de, por ejemplo, una infección.

Ejemplos

[0082] Los siguientes ejemplos no limitativos muestran formas de realización particulares de la presente invención en comparación con el estado de la técnica.

Síntesis de péptidos

20 [0083] Los péptidos 1 y 2 se obtuvieron de Cambridge Research Biochemicals (Reino Unido) y se usaron sin purificación adicional.

Péptido 1: Ac-X-[K(IRDye800RS)]-GLLEFRIVAK(IRDye800RS)-amida, donde X es δ-azido-norvalina

Péptido 2: Ac-X-GLLEFRIVAC(IRDye800CW)amida, donde X es δ-azido-L-norvalina, también denominada ácido (S)-5-azido-2-(Fmoc-amino) pentanoico).

25 Proteasa V8

[0084] La proteasa bacteriana se obtuvo de Sigma-Aldrich (endoproteinasa Glu-C de *Staphylococcus aureus* V8; P2922 SIGMA), también nombrada "proteasa V8" o "V8" en este documento.

Proteasa granzima B

30 [0085] La proteasa recombinante humana se obtuvo de Merck Millipore (368043 granzima B, humana, recombinante, *E. coli*).

Portaobjetos de vidrio funcionalizados con alquinos

35 [0086] Portaobjetos de microscopio de vidrio funcionalizados con alquinos (10^{13} - 10^{14} grupos de alquino/cm², 75 mm x 25 mm) se obtuvieron de Microsurfaces, Inc. y se cortaron a medida con un cortador de vidrio de diamante. Los portaobjetos se almacenaron en una bolsa sellada a oscuras a -20°C. Durante los experimentos, los portaobjetos se mantuvieron a oscuras en un desecador sobre P₂O₅.

Ejemplo 1

Fijación de péptidos a portaobjetos de vidrio

[0087] Los péptidos 1 y 2 se fijaron a superficies de vidrio.

Experimento de control negativo, sin CuSO₄ (no es posible la conjugación covalente)

[0088] Se mezclaron 10 µl de solución madre peptídica de péptido 1 (10 mg/ml; en DMSO) con 26,5 µl de solución de ascorbato de sodio (1 mg/ml; en DMSO/agua 1/1) y se añadió 13,5 µl de DMSO para aumentar la solubilidad del péptido. La proporción final de DMSO/agua fue 73:27. La concentración final de péptido fue 0,65 mM, la concentración final de ascorbato de sodio fue 2,7 mM.

5 Péptido 1; conjugación con CuSO₄

[0089] Se mezclaron 10 µl de solución madre peptídica de péptido 3 (10 mg/ml; en DMSO) con 12,5 µl de solución de CuSO₄ (1 mg/ml; en DMSO/agua 1/1) y 14 µl de solución de ascorbato de sodio (1 mg/ml; en DMSO/agua 1/1) y se añadió 13,5 µl de DMSO para aumentar la solubilidad del péptido. La proporción final de DMSO/agua fue 73:27. La concentración final de péptido fue 0,65 mM, la concentración final de CuSO₄ fue 1 mM, la concentración final de ascorbato de sodio fue 1,4 mM.

[0090] La solución resultante (50 µl) se pipeteó sobre el portaobjetos de vidrio y la diapositiva se mantuvo en un ambiente humidificado durante 1h. La gotita se lavó por aclarado 3x con 1 ml de DMSO:H₂O 80/20; luego, el portaobjetos se colocó en una solución de lavado de DMSO:H₂O 80/20 y se agitó suavemente durante 1 minuto. La solución de lavado se enjuagó con agua (5 x 1 ml) y el portaobjetos se secó con un flujo de nitrógeno.

15 [0091] Los portaobjetos de vidrio se caracterizaron usando espectroscopia UV-VIS, donde solo los portaobjetos que se han tratado con péptido y con CuSO₄ mostraron un máximo de absorción residual de típicamente 0,01-0,05 en la región de longitud de onda esperada 600-800 nm.

Ejemplo 2

Control de la digestión del péptido 1 por espectroscopia de luminiscencia

20 [0092] La escisión de péptido 1 en presencia de proteasa V8 y proteasa granzima B se controló en solución mediante espectroscopia de luminiscencia. Los espectros de fotoluminiscencia se midieron en un espectrómetro de luminiscencia LS50 B Perkin-Elmer. Los espectros se registraron de 250 a 900 nm, usando una longitud de onda de excitación de 720 nm y aplicando un ancho de ranura de 15 nm.

25 [0093] La digestión en solución se realizó en un frasco de vidrio. Se diluyeron 100 µl de solución madre de péptido 1 (10 mg/ml) con 625 µl de H₂O y 250 µl de 100 mM de solución de tampón fosfato (pH = 7,8). Una muestra de 10 µl se tomó en t = 0. Luego, se añadieron 50 µl de solución madre de proteasa V8 o granzima B (25 unidades, ± 25 µg), la mezcla se agitó y se mantuvo a temperatura ambiente. Durante el período de tiempo del experimento, la solución de incubación permaneció clara (sin precipitación de péptido colorante). En varios puntos de tiempo (30 s, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 y 180 min, y a las 18h) se tomaron 10 µl de una muestra de incubación y se diluyó con 3 ml de agua. Las muestras diluidas preparadas se midieron por espectroscopia de luminiscencia, para controlar la escisión digestiva del péptido 1. Como blancos, se usaron cubetas con agua y la misma cantidad de DMSO como la solución de muestra.

35 [0094] En ausencia de proteasa V8, se observó una fluorescencia de fondo de alrededor de 1 AU. Después de 30 s desde la adición de la proteasa V8, la intensidad de fluorescencia aumenta a 4 AU y, en 6 minutos, la intensidad de fluorescencia es de 6 AU. Esto muestra que el péptido según la invención es capaz de detectar bacterias en minutos, que es una mejora considerable sobre los métodos del estado de la técnica, tal como el ensayo basado en ATP para materia orgánica (típicamente 4-8 horas) o cultivos bacterianos (24 horas).

40 [0095] En presencia de granzima B, el péptido 1 no se corta y la fluorescencia de fondo de 1 AU se mantuvo a lo largo de todo el experimento. La granzima B es una proteasa serínica presente en una concentración normal de 20-4 pg/ml en el plasma sanguíneo. Los resultados muestran que el péptido es selectivo para la presencia de proteasas bacterianas y no se escinde en presencia de proteasas liberadas por el cuerpo humano como parte de las respuestas autoinmunitarias.

Ejemplo 3

Control de la digestión de péptido 1 unido a la superficie por espectroscopia de luminiscencia

45 [0096] El equipo Li-Cor Odyssey CLX se usó *in situ* en Westburg (Leusden, NL; Timo Kreike, Moniek Kors). Todas las mediciones de Odyssey CLX se tomaron excitando a 800 nm.

[0097] En presencia de proteasa V8, la intensidad aumentó de aproximadamente 6000 unidades a 25000 unidades, lo que indica que la V8 desencadena la liberación del grupo desactivador del péptido 1.

5 [0098] En presencia de proteasa V8, no se observó ningún cambio en la intensidad para el péptido 2. La intensidad observada permanece en 8000 unidades, lo que indica que, aunque el grupo fluorescente puede ser escindido, el grupo fluorescente no difunde hacia afuera desde la superficie, por lo tanto, no se observa ninguna reducción en la señal y se obtiene así un resultado falso negativo.

[0099] Los resultados muestran que el recubrimiento según la invención es capaz de detectar la presencia de bacterias y no es propenso a resultados falsos negativos.

Ejemplo 4

10 Recubrimiento de catéter

[0100] Los recubrimientos de objeto están compuestos por un polímero de PEG (MeO-PEG-alquino, IRIS biotech) y un péptido que lleva un sitio de escisión y un primer agente fluorescente y un primer agente no fluorescente. El ejemplo comparativo no contiene el primer agente no fluorescente.

15 [0101] Los péptidos se sintetizaron por síntesis de péptidos en fase sólida estándar (SPPS) usando reactivos estándar, técnicas de acoplamiento y purificación.

[0102] El acoplamiento del péptido al primer agente fluorescente y el primer agente no fluorescente se realizó después de la purificación del péptido y se facilitó por el acoplamiento de maleimida a cisteína o el acoplamiento de amida a lisina.

20 [0103] El acoplamiento del péptido que lleva un sitio de escisión y el primer agente fluorescente y un primer agente no fluorescente se realizó utilizando condiciones de reacción estándares de cicloadición de Huisgen de azida y alquino.

25 [0104] El catéter usado fue un catéter de Foley de silicona 14F que se proporcionó en longitudes de 6 mm y con un diámetro de 4,2 mm. Se preparó una suspensión acuosa de cada recubrimiento de polímero y se sumergió cada pieza de catéter en la mezcla de suspensión. Los catéteres recubiertos se almacenaron a 20°C a oscuras durante 15 minutos antes de repetir el procedimiento de inmersión. El proceso se repitió cuatro veces en total. Después del recubrimiento final, los catéteres recubiertos se almacenaron a 35°C durante 48 horas para facilitar el secado del recubrimiento.

Ejemplo 5

30 [0105] Cada catéter recubierto y un catéter no recubierto como control, se incubaron en presencia de 2×10^6 unidades formadoras de colonias (ufc) ml^{-1} de *S. aureus* durante 4 horas. Después, se retiraron los catéteres recubiertos de la incubadora y se expusieron a una cámara de fluorescencia multiespectral clínica (sistema de imágenes T3, SurgOptix BV, Groningen, Países Bajos) con un espectro IVIS (excitación: 710 nm, emisión: 800 nm, tiempo de adquisición 5 s, binning 4, F-stop 2, FOV 21,2).

35 [0106] Los resultados obtenidos del espectro IVIS e IVIS Lumina II se analizaron con Living Image 4.2. (Caliper LS, Hopkinton MA, EE.UU.). Los límites de detección óptimos se establecieron en la señal más baja a la cual la señal positiva se discriminó fácilmente de los controles negativos. La intensidad de señal se determinó dibujando regiones de interés (ROI) y midiendo los recuentos promedio en estas regiones. La señal se corrigió para el fondo restando la señal de fondo de la señal de interés, referida en el texto como recuentos netos. Una fuerte señal de infrarrojo cercano se atribuyó al primer agente fluorescente.

40 [0107] Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Ejemplo	Recubrimiento	Objeto	Respuesta del recubrimiento a la exposición a <i>S. aureus</i>
5.1	NINGUNO	Catéter de Foley de	++ (evaluado mediante cultivo)

		silicona (14F, 4,6 mm)	microbiano - 24 horas)
5.2	G-(Pol)-X-LLEFRIVAC-IRDye800CW		-
5.3	(I RDye800RS)-KG-(Pol)-X-LLEFRIVAK (IRDye800RS)		+
5.4	Ac-(IRDye800CW)CG-(Pol)-X-LLEFRIVAK (IRDyeQC-1)		++
<i>donde Pol es MeO-PEG-alquino y X es ácido (S)-5-Azido-2-(Fmoc-amino) pentanoico</i>			

5 [0108] Los resultados muestran que los recubrimientos según la invención que incluyen un agente no fluorescente con un espectro de absorción solapado con el espectro de emisión del primer agente fluorescente (ejemplo 5.4) conducen a la detección óptima de la presencia de microorganismos patógenos, por ejemplo, en este caso *S. aureus*. La desactivación por el primer agente no fluorescente es estrictamente dependiente de la distancia desde el primer agente fluorescente, por lo que tan pronto como el primer agente no fluorescente se escinde, se detecta la luz emitida.

[0109] El ejemplo 5.4 muestra también que se puede obtener el mismo nivel de detección usando los recubrimientos según la invención que como mediante cultivo microbiano convencional (ejemplo 5.1), pero los resultados se obtienen mucho más rápido, en 4 horas en lugar de 24-36 horas como con los cultivos microbianos.

10 [0110] El ejemplo 5.3 muestra un primer agente fluorescente que funciona también como un primer agente no fluorescente que proporciona también medios adecuados para detectar microorganismos. Sin embargo, debido a la difusión limitada del primer agente fluorescente escindido, solo se detecta una señal débil.

15 [0111] Los recubrimientos que solo incluyen un primer agente fluorescente no proporcionan una buena detección de microorganismos (ejemplo comparativo 5.2). Esto se atribuye a la lenta velocidad de difusión del primer agente fluorescente hacia afuera desde la superficie, de modo que solo se detecta un pequeño cambio en la intensidad de la luz emitida.

REIVINDICACIONES

1. Recubrimiento de superficie de objeto que incluye uno o más polímeros y un péptido unidos de manera covalente a al menos uno de dichos uno o más polímeros, incluyendo dicho péptido:
- 5 a) un primer sitio de escisión, donde dicho primer sitio de escisión es escindido por un primer compuesto específicamente proporcionado por un microbio perteneciente a un primer grupo que consiste en un número limitado de cepas, especies o géneros microbianos, y no escindido por cualquier compuesto proporcionado por cualquier microbio no perteneciente a dicho primer grupo,
- b) un primer agente fluorescente con una longitud de onda de emisión de 650-900 nm,
- 10 c) un primer agente no fluorescente con una longitud de onda de absorción de 650-900 nm, para la desactivación de dicha emisión de dicho primer agente fluorescente,
- donde la escisión de dicho primer sitio de escisión resulta en la liberación de dicho primer agente no fluorescente del recubrimiento, siendo la liberación de dicho primer agente no fluorescente indicativa de la presencia de un microbio perteneciente a dicho primer grupo.
- 15 2. Recubrimiento de superficie de objeto según la reivindicación 1, donde tras la liberación de dicho primer agente no fluorescente del recubrimiento, el primer agente fluorescente permanece unido de manera covalente al recubrimiento de superficie de objeto.
3. Recubrimiento de superficie de objeto según las reivindicaciones 1 o 2, donde dicho uno o más polímeros se seleccionan del grupo que consiste en polietilenglicol, diacrilato de polietilenglicol, polilactida, alcohol polivinílico, copolímero de poli DL-lactida-co-glicólido/polietilenglicol y combinaciones de los mismos.
- 20 4. Recubrimiento de superficie de objeto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho péptido está unido de manera covalente a través del extremo N- o C-terminal o una cadena lateral a al menos uno de dicho unos o más polímeros por un conector de hidrocarbilo C₄-C₃₀, preferiblemente a través del extremo C-terminal o una cadena lateral, más preferiblemente a través de la cadena lateral,
- 25 donde el conector C₄-C₃₀ incluye un grupo de hidrocarbilo cíclico o un grupo heterocíclico cíclico, preferiblemente dicho grupo heterocíclico es un grupo triazol.
5. Recubrimiento de superficie de objeto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el primer sitio de escisión es escindido por un compuesto proporcionado por bacterias gram-positivas o bacterias gram-negativas, preferiblemente bacterias gram-positivas, más preferiblemente de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Actinobacteria* y *Listeria*.
- 30 6. Recubrimiento de superficie de objeto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el primer sitio de escisión es escindido por un primer compuesto, que es una proteasa seleccionada del grupo que consiste en proteasa V8, proteasa IgA1, aureolisina.
7. Recubrimiento de superficie de objeto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el primer sitio de escisión incluye un motivo de aminoácido específico, seleccionado del grupo que consiste en EFRIK (SEQ ID N.º: 1), DFRIK (SEQ ID N.º: 2), GIGEFRIK (SEQ ID N.º: 4), GIGDFRI K (SEQ ID N.º: 5).
- 35 8. Recubrimiento de superficie de objeto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho primer agente fluorescente es una cianina con una longitud de onda de emisión de 650-900 nm, y donde dicho primer agente no fluorescente es un colorante de cianina con una longitud de onda de absorción de 650-900 nm.
- 40 9. Objeto que incluye un recubrimiento de superficie según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, siendo seleccionado dicho objeto del grupo que consiste en implantes médicos, instrumentos médicos, hisopos médicos, placas de micropocillos, superficies de preparación de alimentos y mobiliario o siendo seleccionado dicho objeto del grupo de agujas, catéteres, guías de alambre, tornillos, placas para implantes y clavos para implantes.
- 45 10. Método de preparación de un recubrimiento de superficie de objeto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que incluye los pasos de
- a) proporcionar un péptido que incluye el primer agente fluorescente, el primer agente no fluorescente, el primer sitio de escisión y un grupo azida,

- b) poner en contacto el péptido obtenido en el paso a) con un diacrilato C_5-C_{25} que incluye un grupo alquino,
- c) reticular el conjugado péptido-diacrilato obtenido en el paso b) con uno o más polímeros.

11. Método de recubrimiento de un objeto, que incluye los pasos de:

- 5 a) proporcionar un recubrimiento de superficie de objeto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o
- b) revestir por inmersión el objeto seleccionado del grupo que consiste en implantes médicos e instrumentos médicos que van a recubrirse con el recubrimiento de superficie del paso a),
- c) secar dicho objeto obtenido en el paso b), o

- 10 a) proporcionar un recubrimiento de superficie de objeto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y
- b) poner en contacto un objeto seleccionado del grupo que consiste en hisopos médicos, placas de micropocillos, superficies de preparación de alimentos y mobiliario con el recubrimiento de superficie del paso a).

12. Método de preparación de un recubrimiento de superficie de objeto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que incluye los pasos de:

- 15 a) proporcionar una superficie de objeto que incluye uno o más polímeros, dichos uno o más polímeros incluyen además un grupo reactivo A y
- b) poner en contacto la superficie de objeto según el paso a) con el péptido que incluye el primer agente fluorescente, el primer agente no fluorescente, el primer sitio de escisión y un grupo reactivo B complementario al grupo reactivo A de modo que grupo reactivo A y el grupo reactivo B forman un enlace covalente para preparar dicho recubrimiento de superficie de objeto,
- 20

dicho grupo reactivo A se elige del grupo que consiste en alcohol (OH), tiol (SH), amina (NH_2), ácido (CO_2H), alquino, alqueno, azida, preferiblemente alquino o azida, más preferiblemente alquino, dicho grupo reactivo B se elige del grupo que consiste en alcohol (OH), tiol (SH), amina (NH_2), ácido (CO_2H), alquino, alqueno, azida, preferiblemente alquino o azida, más preferiblemente azida.

- 25 13. Método de detección de emisión de fotones de un objeto según la reivindicación 9, que incluye el paso de irradiar el objeto con fotones con una longitud de onda de 650-900 nm y detectar los fotones emitidos.

14. Método de detección de emisión de fotones a partir de un objeto recubierto con un recubrimiento de superficie según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que incluye los pasos de poner en contacto el objeto con una muestra de fluido corporal y detectar los fotones emitidos.

- 30 15. Uso de un objeto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para detectar la presencia de bacterias infecciosas.