

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 376**

51 Int. Cl.:

C07D 501/52 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2009** **E 15200112 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018** **EP 3056497**

54 Título: **Métodos para usar sustratos enzimáticos marcados con bodipy**

30 Prioridad:

05.05.2008 US 50453 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.02.2019

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
55 Fruit Stret
Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**HASAN, TAYYABA;
SALLUM, ULYSSES W.;
VERMA, SARIKA y
NAU, GERARD**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 699 376 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

Métodos para usar sustratos enzimáticos marcados con bodipy

5 Antecedentes de la invención

El uso amplio de composiciones quimioterapéuticas antimicrobianas ha tenido la consecuencia inevitable de la emergencia de patógenos resistentes a antibióticos, que ha impulsado continuamente además el desarrollo y diseño de nuevos fármacos para combatir dichos organismos. En la actualidad, más del 70 % de las bacterias asociadas con infecciones nosocomiales en los Estados Unidos son resistentes a uno o más de los fármacos anteriormente utilizados para tratarlos. La resistencia a fármacos en bacterias que no están limitadas a los Estados Unidos, pero que se extiende a lo largo del mundo incluye, por ejemplo, la emergencia en todo el mundo de *Haemophilus* y gonococos que son resistentes a los antibióticos de β -lactama (por ejemplo, penicilina), *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, *S. aureus* resistente a múltiples fármacos con un alto nivel de resistencia a la vancomicina, diversas cepas aisladas de *Pseudomonas* y *Enterobacter* que son resistentes a todos los antibióticos disponibles, y cepas resistentes a múltiples fármacos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Aunque la sociedad ha reconocido de forma creciente las consecuencias negativas del uso incorrecto de antibióticos, la sobreutilización y la sobreprescripción de antibióticos progresando en todo el mundo, impulsada por incertidumbres diagnósticas, demandas de pacientes, y de médicos que carecen de tiempo para evaluar eficazmente a los pacientes. Aunque reducir el uso inadecuado de antibióticos se piensa que es la mejor manera de frenar la resistencia, los médicos deben generalmente ser más selectivos y prudentes en su uso y prescribir antibióticos de tal manera que no se pierdan los avances en la lucha contra las enfermedades infecciosas en el último siglo. La propagación desenfrenada de las resistencias a los antibióticos exige una estrategia más responsable y flexible al uso de antibióticos.

Los antibióticos de β -lactama (por ejemplo, antibióticos que contienen anillos de β -lactama, tales como, penicilinas, cefalosporinas, o carbapenemos, que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana) son particularmente prevalentes y una clase importante de antibióticos que se han prescrito ampliamente para una gran variedad de infecciones producidas por bacterias gram-negativas y gram-positivas. Por consiguiente, ha emergido una amplia resistencia. Un mecanismo particularmente importante de resistencia microbiana a los antibióticos de β -lactama proviene en general de la producción de enzimas conocidas como β -lactamasas o cefaloesporinasas, que escinden enzimáticamente los antibióticos de β -lactama produciendo su inactivación. Este tipo de resistencia puede estar codificada en el cromosoma o en los elementos extracromosómicos (por ejemplo, plásmidos bacterianos), que se pueden transferir horizontalmente a otras bacterias. Otros modos de resistencia a los antibióticos de β -lactama incluyen también la adquisición de proteínas de unión a penicilina y una entrada disminuida y/o una salida activa de fármacos a través de sistemas de bombeo de salida de membrana.

La detección clínica de las β -lactamasas representa una etapa clave en la gestión del tratamiento con antibióticos de las infecciones bacterianas. En particular, la cantidad de actividad de la beta-lactamasa y la especificidad por el sustrato de esta actividad son consideraciones importantes en la determinación del tratamiento con antibióticos adecuado para pacientes que padecen de infecciones bacterianas resistentes a fármacos.

La susceptibilidad y la resistencia a la β -lactama pueden detectarse y/o medirse de varias maneras. Por ejemplo, El ensayo de antibióticos de Kirby-Bauer utiliza discos impregnados en antibióticos para ensayar si bacterias concretas son susceptibles a antibióticos específicos. Una cantidad conocida de bacterias se hace crecer en placas de agar en presencia de obleas delgadas que contienen antibióticos relevantes, tales como penicilina o ampicilina. Si las bacterias son susceptibles a los antibióticos, se forma una zona de inhibición alrededor de la zona de difusión de las obleas. El tamaño de la zona está correlacionado con la concentración inhibidora mínima ("CIM") de antibiótico para estas bacterias. De esta manera, los proveedores de asistencia sanitaria son capaces de seleccionar antibióticos adecuados para combatir una infección concreta.

Además, se pueden usar métodos de dilución en agar y métodos de microdilución en caldo. Muchos de estos métodos requieren mucha mano de obra y requieren mucho tiempo fracasan a menudo en detectar resistencia a fármacos en bacterias gram negativas y requerirán una etapa de crecimiento previo en la que la cepa se hace crecer en caldo o en una placa bajo condiciones en las que el organismo se expone solo al antibiótico inductor. Esta etapa es seguida por un estímulo en presencia de un antibiótico indicador o ensayo directo de la actividad enzimática. Estas estrategias requieren la inoculación y el crecimiento de cultivos puros, e implican hasta 24 horas de incubación.

Se han usado también sustratos cromógenos, que, cuando se escinden por beta-lactamasas bacterianas, producen un cambio colorimétrico que se puede detectar o medir. Los Ejemplos de dichos sustratos incluyen, por ejemplo, nitrocefina y centa, que se conocen en la técnica. Nitrocefina se comercializa en la forma de discos de papel impregnados, que, cuando se colocan en la proximidad de un cultivo bacteriano productor de β -lactamasa, dan como resultado el desarrollo de un color rosado. Aunque este método proporciona una rápida detección cualitativa (es decir, sí/no), no proporciona ninguna información con respecto a la cantidad relativa de actividad enzimática o cualquier percepción en el tipo de actividad de la beta lactamasa y, por lo tanto, no se puede usar solo para determinar el curso adecuado de tratamiento en un escenario clínico.

Tal como se puede observar, los métodos actualmente disponibles para detectar y evaluar la actividad y la resistencia de la beta-lactamasa a los antibióticos de beta-lactama adolecen de numerosos inconvenientes. En particular, dichos métodos, aunque proporcionan información cualitativa (sí/no) acerca de la resistencia al fármaco, son laboriosos y no facilitan fácilmente la medición cuantitativa de la actividad enzimática o la determinación del tipo de enzima o sustrato característicos que constituyen una información muy valiosa para determinar una estrategia adecuada para el tratamiento antimicrobiano.

En consecuencia, nuevos métodos y composiciones para detectar y evaluar la actividad de la beta-lactamasa, que son más sensibles, rápidos y más fáciles de llevar a cabo, y que proporcionan de forma fiable y conveniente información cualitativa y cuantitativa en cuanto a la actividad y/o especificidad del sustrato de una beta-lactamasa, representarían un avance en la técnica.

El documento WO 2005/071096 A2 describe sustratos enzimáticos ópticamente detectables y su método de uso, por ejemplo, compuestos útiles para detectar la β -lactamasa.

El documento WO 2007/059226 A2 proporciona compuestos antimicrobianos fotoactivables y métodos para el uso de los mismos en el tratamiento de infecciones.

Papanicolaou et al. describen un ensayo competitivo de nitrocefina para determinar los perfiles de infección como un complemento útil para la discriminación de beta-lactamasas (Antimicrob Agents Chemotherapy, vol.34, n.º 11, 1990, páginas 2184-2192).

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos que se pueden utilizar ventajosamente para la detección cualitativa y/o cuantitativa de la actividad de la beta-lactamasa, que son más sensibles, rápidos y más fáciles de llevar a cabo que los métodos anteriores. Los métodos y composiciones de la invención pueden también utilizarse para evaluar la especificidad del sustrato de la actividad de una beta-lactamasa de cualquier muestra que contiene una enzima beta-lactamasa, incluyendo, por ejemplo, fluidos corporales, células o tejidos que transportan una infección con una bacteria patógena productora de beta-lactamasa. La invención proporciona ventajosamente un método para determinar estrategias eficaces y adecuadas para el tratamiento de infecciones bacterianas utilizando regímenes adecuados de antibióticos, que son eficaces contra los organismos diana.

La presente invención proporciona un método para detectar la actividad de una enzima beta-lactamasa en una muestra, que comprende:

poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende fotosensibilizante que se conjugan con un enlazador, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión de la enzima beta-lactamasa, en el que los fotosensibilizantes, cuando se acoplan juntos mediante el enlazador, están en estado inactivado, y en el que los fotosensibilizantes incluyen una pluralidad de fotosensibilizantes del colorante bodipy; y fotoactivar la muestra para inducir una señal que se va a liberar de los fotosensibilizantes sin inactivar y detectar la señal.

La presente invención proporciona también un método para determinar la especificidad del sustrato de una enzima beta-lactamasa en una muestra, que comprende:

poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende dos fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que los fotosensibilizantes incluyen una pluralidad de fotosensibilizantes del colorante bodipy, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión para una enzima beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes se inactivan cuando el sitio de escisión está intacto pero no se inactivan cuando el sitio de escisión está escindido; y determinar si el enlazador está escindido, en el que la escisión del enlazador indica que el enlazador es un sustrato de la enzima beta-lactamasa.

La presente invención proporciona también un método de tipación de una enzima beta-lactamasa en una muestra, que comprende:

llevar a cabo una reacción competitiva que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende dos fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que los fotosensibilizantes incluyen una pluralidad de fotosensibilizantes del colorante bodipy, en el que el enlazador incluye un sitio de escisión para una beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes están en un estado inactivado; (b) escindir el enlazador para activar los fotosensibilizantes; (c) activar con luz la composición para producir una señal de fluorescencia; y (d) cuantificar la señal de fluorescencia con un detector para obtener un resultado, llevándose a cabo la reacción competitiva en presencia de un antibiótico de beta-lactama competidor; y comparar el resultado de la reacción competitiva con un patrón para tipar la beta-lactamasa.

En un aspecto, se proporciona una composición fotosensibilizante, en la que la reacción comprende al menos un fotosensibilizante de cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS) conjugado con un enlazador de cefalosporina o un fragmento del mismo. La composición puede incluir dos fotosensibilizantes de cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS) conjugados con un enlazador de cefalosporina (L) o un fragmento del mismo. El fotosensibilizante puede unirse en la posición 3' de una cefalosporina. En un aspecto, los fotosensibilizantes se inactivan cuando el enlazador no se escinde.

En otro aspecto, se proporciona una composición fotosensibilizante de acuerdo con la fórmula I:



en la que L es un enlazador de cefalosporina o un fragmento del mismo, X es cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS) y X' es cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS), en el que los fotosensibilizantes están en un estado inactivado cuando L no se escinde.

La composición fotosensibilizante puede incluir además un resto director, que puede dirigir la composición a un patógeno o una célula hospedadora, por ejemplo, un macrófago, infectado con un patógeno. El resto director puede incluir un liposoma, un péptido, o un péptido antimicrobiano pequeño o un fragmento activo o un análogo del mismo.

La composición fotosensibilizante puede incluir también uno o más aglutinantes eficaces para inactivar la fotoactivación del cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS). El aglutinante puede ser un fluoróforo o un fotosensibilizante en diversos aspectos.

En otro aspecto más, la composición fotosensibilizante puede incluir además una estructura principal acoplada a los dos cloruros de benzofenotiazinio (EtNBS) y uno o más aglutinantes eficaces para inactivar la fotoactivación, en el que los aglutinantes se conectan a la estructura principal a través del enlazador. La estructura principal puede incluir un resto director y puede ser un poliaminoácido (por ejemplo, polilisina) en un aspecto.

El L (o enlazador) puede incluir una penicilina, tales como, penicilina benzatina, bencilpenicilina (penicilina G), fenoximetilpenicilina (penicilina V), penicilina procaína, oxacilina, metilpenicilina, dicloxacilina, flucloxacilina, temocilina, amoxicilina, ampicilina, co-amoxiclav, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, azlocilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina, o cualquier fragmento o derivado de los anteriores. El L puede incluir también una cefalosporina, tales como, (cefacetrilo), Cefadroxilo (cefadroxilo; Duricef®), Cefalexina (cefalexina; Keflex®), Cefaloglicina, Cefalonio (cefalonio), Cefaloridina (cefaloradina), Cefalotina (cefalotina; Keflin®), Cefapirina (cefapirina; Cefadryl®), Cefatrizina, Cefazafur, Cefazedona, Cefazolina (cefazolina; Ancef®, Kefzol®), Cefradina (cefradina; Velosef®), Cefroxadina, Ceftezol, Cefaclor (por ejemplo, Ceclor®, Distaclor®, Keflor®, Raniclór®), Cefonicid (por ejemplo, Monocid®), Cefprozilo (por ejemplo, cefprozilo; Cefzil®), Cefuroxima (por ejemplo, Zinnat®, Zinacef®, Ceftin®, Biofuroksym®), Cefuzonam, Cefmetazol, Cefotetan, Cefoxitina, Carbacefemos (por ejemplo, loracarbef (Lorabid®)), Cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol (Zefazone®), cefminox, cefotetan (Cefotan®), cefoxitina (Mefoxin®)), cefotetan o cefoxitina, Cefcapeno, Cefdaloxima, Cefdinir (Omnicef®), Cefditoreno, Cefetamet, Cefixima (Suprax®), Cefmenoxima, Cefodizima, Cefotaxima (Claforan®), Cefpimizol, Cefpodoxima (Vantin®, PECEF), Cefteram, Cefibuteno (Cedax), Ceftiofur, Ceftioleño, Ceftizoxima (Ceftizax®), Ceftriaxona (Rocephin®), Cefoperazona (Cefobid), Ceftazidima (Fortum®, Fortaz®), u Oxacefemos (por ejemplo, latamoxef), cefepima (Maxipime®), cefclidina, ceftuprenam, cefoselis, cefozopran, cefpiroma, ceftinoma, cefpiroma, o un fragmento de derivado de cualquiera de las anteriores composiciones comprende además un resto director.

En otro aspecto, se proporciona un método para detectar la actividad de una beta-lactamasa, que comprende las etapas de: poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende dos o más fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión para una beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes se inactivan cuando el sitio de escisión está intacto pero no se inactivan cuando el sitio de escisión está hidrolizado; y detectar la escisión de dicho enlazador, en el que la escisión de dicho enlazador es indicativo de la actividad de una beta-lactamasa en la muestra.

En otro aspecto adicional más, se proporciona un método para determinar la especificidad del sustrato de una enzima beta-lactamasa en una muestra, que comprende: poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende dos fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión para una enzima beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes se inactivan cuando el sitio de escisión está intacto pero no se inactivan cuando el sitio de escisión está escindido; y determinar si el enlazador está escindido, en el que la escisión del enlazador indica que el enlazador es un sustrato de la enzima beta-lactamasa.

En otro aspecto, se proporciona un método de tipación de una enzima beta-lactamasa, que comprende: llevar a cabo una reacción competitiva que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende dos fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión para una beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes están en un estado inactivado; (b) escindir el enlazador para activar los fotosensibilizantes; (c) activar con luz la composición para producir una señal de fluorescencia; y (d) cuantificar la señal de fluorescencia con un detector para obtener un resultado, llevándose a cabo dicha reacción competitiva en presencia de un antibiótico de beta-lactama competidor; y comparar

el resultado de la reacción competitiva con un patrón para tipar la beta-lactamasa. Se puede determinar el patrón llevando a cabo una reacción no competitiva que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende dos fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión para una beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes están en un estado inactivado; (b) escindir el enlazador para activar los fotosensibilizantes; (c) activar con luz la composición para producir una señal de fluorescencia; y (d) cuantificar la señal de fluorescencia con un detector para obtener un patrón.

En determinados aspectos, la etapa de detectar un fotosensibilizante sin inactivar puede incluir detectar una señal producida por el fotosensibilizante sin inactivar. La señal puede ser una emisión de fluorescencia inducida por la eliminación del fotosensibilizante sin inactivar con una longitud de onda de excitación.

En otros aspectos, la muestra puede ser una muestra biológica aislada a partir de una infección en un sujeto, tal como un mamífero, incluyendo un ser humano. La infección puede estar producida por un patógeno resistente a antibiótico, que puede ser una bacteria Gram (-) o un patógeno bacteriano Gram (+).

En algunos aspectos, el patógeno resistente a antibiótico puede ser un *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptophomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Serratia*, o *Salmonella* spp.

El patógeno resistente a antibiótico puede ser también un *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhea*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, o *Salmonella typhimurium*.

En un aspecto determinado, el fotosensibilizante puede ser una porfirina, incluyendo un porfímero de sodio, hematoporfirina IX, éster de hematoporfirina, éster de dihematoporfirina, diporfirina sintética, tetrafenil porfirina sustituida por O, 3,1-meso tetraquis porfirina, hidroporfirina, derivado de benzoporfirina, derivado de benzoporfirina monoácido, derivado de anillo monoácido, aducto tetracianoetilenado de benzoporfirina, aducto dimetil acetilnodicarboxilato de benzoporfirina, ácido δ -aminolevulínico, benzonaftoporfirazina, porfirina que se produce naturalmente, protoporfirina IX inducida por ALA, dicloro sintético, bacterioclorintetra(hidroxifenil) porfirina, purpurina, derivado de octaetilpurpurina, etiopurpurina, estaño-etiopurpurina, porfíceno, cloro, cloro e₆, mono-1-aspartil derivado de cloro e₆, di-1-aspartil derivado de cloro e₆, estaño(IV) cloro e₆, meta-tetrahidroxifenilcloro, cloro e₆ monoetilendiamina monoamida, verdina, cinc metil piroverdina, copro II verdina trimetil éster, deuteroverdina metil éster, derivado de feofórbido, pirofeofórbido, texafirina, lutecio (III) texafirina, o gadolinio(III) texafirina.

Otros aspectos, el fotosensibilizador puede ser un colorante fotoactivo, incluyendo una merocianina, ftalocianina, cloroaluminio ftalocianina, aluminio PC sulfonado, PC catiónico con sustitución en el anillo, AlPc sulfonado, derivado disulfonado o tetrasulfonado, naftalocianina sulfonada de aluminio, naftalocianina, aducto de tetracianoetileno, cristal violeta, cloruro β azul, benzofenotiazinio, cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS), derivado de fenotiazina, rosa Bengala, derivados de azul de toluidina, azul de O toluidina (TBO), azul de metileno (MB), nuevo azul de metileno N (NMMB), nuevo azul de metileno BB, nuevo azul de metileno FR, cloruro de azul de 1,9-dimetilmetileno (DMMB), derivados de azul de metileno, verde de metileno, violeta Bernthsen de metileno, violet 3RAX de metileno, azul Nilo, derivados de azul Nilo, verde malaquita, Azul celeste A, Azul celeste B, Azul celeste C, safranina O, rojo neutro, cloruro de 5-etilamino-9-dietilaminobenzo[a]fenotiazinio, cloruro de 5-etilamino-9-dietilaminobenzo[a]fenoselenazinio, tiopironina, o tionina.

En un aspecto particular, la composición fotosensibilizante incluye dos fotosensibilizantes de cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS) conjugados con un enlazador de cefalosporina o un fragmento del mismo.

En otros determinados aspectos, los métodos de la invención incluyen la etapa de cuantificar la señal producida por el fotosensibilizante sin inactivar. La etapa de cuantificar la señal puede incluir medir la cantidad de la señal con un detector.

En otro aspecto más, se proporciona un kit para detectar la actividad de una beta-lactamasa en una muestra que comprende una composición fotosensibilizante de la invención e instrucciones para utilizar la composición fotosensibilizante para detectar la actividad de una beta-lactamasa en una muestra.

En otro aspecto, se proporciona un kit para determinar la especificidad del sustrato de la actividad de una beta-lactamasa en una muestra que comprende la composición fotosensibilizante de la invención e instrucciones para utilizar la composición fotosensibilizante para tipar la actividad beta-lactamasa en una muestra.

En otro aspecto más, se proporciona un método para tratar una infección bacteriana en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico, en el que el antibiótico no tiene la misma estructura que el enlazador escindible detectado mediante cualquiera de los métodos de la invención.

En un aspecto, se proporciona una composición fotosensibilizante, que comprende una pluralidad de fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que el enlazador incluye un sitio de escisión para una

beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes están en un estado inactivado. En un aspecto, el enlazador incluye una cefalosporina, una penicilina, un penemo, un carbapenemo, una monobactama monocíclica, un polipéptido escindible por una enzima de *Leishmania*, o un fragmento del mismo. En otro aspecto, el enlazador comprende un anillo de beta-lactama o un derivado funcional del mismo. En otro aspecto más, el enlazador se conjuga con dos

5

El sitio de escisión del enlazador puede ser un sustrato de una beta-lactamasa de un patógeno. El patógeno puede ser una bacteria Gram (-) o una bacteria Gram (+). En determinados aspectos, el patógeno puede ser un *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptophomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Serratia*, o *Salmonella* spp. el patógeno puede ser particularmente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, y *Salmonella typhimurium*.

10

15

Los fotosensibilizantes de las composiciones fotosensibilizantes, en determinados aspectos, pueden ser una porfirina, que puede incluir porfímero de sodio, hematoporfirina IX, éster de hematoporfirina, éster de dihematoporfirina, diporfirina sintética, tetrafenil porfirina sustituida por O, 3,1-meso tetraquis porfirina, hidroporfirina, derivado de benzoporfirina, derivado de benzoporfirina monoácido, derivado de anillo monoácido, aducto tetracianoetilenado de benzoporfirina, aducto dimetil acetilnodicarboxilato de benzoporfirina, ácido δ -aminolevulínico, benzonaftoporfirazina, porfirina que se produce naturalmente, protoporfirina IX inducida por ALA, dicloro sintético, bacterioclorintetra(hidroxifenil) porfirina, purpurina, derivado de octaetilpurpurina, etiopurpurina, estaño-etio- purpurina, porficeno, cloro, cloro e_6 , mono-1-aspartil derivado de cloro e_6 , di-1-aspartil derivado de cloro e_6 , estaño(IV) cloro e_6 , meta-tetrahidroxifenilcloro, cloro e_6 monoetilendiamina monoamida, verdina, cinc metil piroverdina, copro II verdina trimetil éster, deuteroverdina metil éster, derivado de feofórbido, pirofeofórbido, texafirina, lutecio (III) texafirina, o gadolinio(III) texafirina.

20

25

En otros aspectos, el fotosensibilizador puede ser un colorante fotoactivo, tales como, una merocianina, ftalocianina, cloroaluminio ftalocianina, aluminio PC sulfonado, PC catiónico con sustitución en el anillo, AlPc sulfonado, derivado disulfonado o tetrasulfonado, naftalocianina sulfonada de aluminio, naftalocianina, aducto de tetracianoetileno, cristal violeta, cloruro β azul, benzofenotiazinio, cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS), derivado de fenotiazina, rosa Bengala, derivados de azul de toluidina, azul de O toluidina (TBO), azul de metileno (MB), nuevo azul de metileno N (NMMB), nuevo azul de metileno BB, nuevo azul de metileno FR, cloruro de azul de 1,9-dimetilmetileno (DMMB), derivados de azul de metileno, verde de metileno, violeta Bernthsen de metileno, violet 3RAX de metileno, azul Nilo, derivados de azul Nilo, verde malaquita, Azul celeste A, Azul celeste B, Azul celeste C, safranina O, rojo neutro, cloruro de 5-etilamino-9-dietilaminobenzo[a]fenotiazinio, cloruro de 5-etilamino-9-dietilaminobenzo[a]fenoselenazinio, tiopironina, o tionina.

35

En otros aspectos más, el fotosensibilizante puede ser un aducto de Dies-Alder, aducto de dicarboxilato de dimetil acetileno, antracenodiona, antrapirazol, aminoantraquinona, colorante de fenoxazina, colorante de calcogenapirilio, seleno catiónico, derivado de teluropirilio, sal de iminio catiónica o tetraciclina.

40

En un aspecto particular, las composiciones fotosensibilizantes incluye dos fotosensibilizantes de cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS) conjugados con un enlazador de cefalosporina o un fragmento del mismo.

45

En otros determinados aspectos, La composición fotosensibilizante descrita en el presente documento puede incluir además un resto director, que puede dirigir una composición a un patógeno o una célula hospedadora infectada con un patógeno, o a un liposoma o a una proteína (por ejemplo, proteína superficial celular).

50

En aspectos adicionales, las composiciones fotosensibilizantes descritas en el presente documento pueden incluir uno o más aglutinantes, que son eficaces para inactivar la fotoactivación del uno o más fotosensibilizantes de la invención. Un aglutinante, que se puede denominar también un inactivador, puede ser un fluoróforo, otro fotosensibilizante o compuesto similar.

55

En otros determinados aspectos, las composiciones fotosensibilizantes pueden incluir una estructura principal que está acoplada al uno o más fotosensibilizantes, uno o más aglutinantes (si están presentes), o uno o más restos directores (si están presentes). La estructura principal puede ser, por ejemplo, un poliaminoácido o polilisina.

En otro aspecto, se proporciona una composición fotosensibilizante de acuerdo con la fórmula I:

X-L-X',

- 5 en la que L es un enlazador que comprende un sitio de escisión de una beta-lactamasa, X es un primer fotosensibilizante y X' es un segundo fotosensibilizante, en el que los fotosensibilizantes están en un estado inactivado.

En un aspecto, el enlazador puede ser una cefalosporina, una penicilina, un penemo, un carbapenemo, una monobactama monocíclica, un polipéptido escindible por una enzima de *Leishmania*, o un fragmento del mismo, o un compuesto que contiene un anillo de beta-lactama.

El sitio de escisión del enlazador puede ser un sustrato de una beta-lactamasa de un patógeno. El patógeno puede ser una bacteria Gram (-) o una bacteria Gram (+). El patógeno puede ser también *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptophomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Serratia*, o *Salmonella* spp, o más concretamente, puede ser *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhea*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, o *Salmonella typhimurium*.

En otro aspecto, uno o ambos de los fotosensibilizantes, X y X', puede ser una porfirina. una porfirina puede ser un porfímero de sodio, hematoporfirina IX, éster de hematoporfirina, éster de dihematoporfirina, diporfirina sintética, tetrafenil porfirina sustituida por O, 3,1-meso tetraquis porfirina, hidroporfirina, derivado de benzoporfirina, derivado de benzoporfirina monoácido, derivado de anillo monoácido, aducto tetracianoetilenado de benzoporfirina, aducto dimetil acetilnodicarboxilato de benzoporfirina, ácido δ-aminolevulínico, benzonaftoporfirazina, porfirina que se produce naturalmente, protoporfirina IX inducida por ALA, dicloro sintético, bacterioclorintetra(hidroxifenil) porfirina, purpurina, derivado de octaetilpurpurina, etiopurpurina, estaño-etio- purpurina, porfícono, cloro, cloro e₆, mono-1-aspartil derivado de cloro e₆, di-1-aspartil derivado de cloro e₆, estaño(IV) cloro e₆, meta-tetrahidroxifenilcloro, cloro e₆ monoetilendiamina monoamida, verdina, cinc metil piroverdina, copro II verdina trimetil éster, deuteroverdina metil éster, derivado de feofórbido, pirofeofórbido, texafirina, lutecio (III) texafirina, o gadolinio(III) texafirina.

En otro aspecto, uno o ambos sensibilizantes, X y X', pueden ser un colorante fotoactivo, incluyendo merocianina, ftalocianina, cloroaluminio ftalocianina, aluminio PC sulfonado, PC catiónico con sustitución en el anillo, AlPc sulfonado, derivado disulfonado o tetrasulfonado, naftalocianina sulfonada de aluminio, naftalocianina, aducto de tetracianoetileno, cristal violeta, cloruro β azul, benzofenotiazinio, cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS), derivado de fenotiazina, rosa Bengala, derivados de azul de toluidina, azul de O toluidina (TBO), azul de metileno (MB), nuevo azul de metileno N (NMMB), nuevo azul de metileno BB, nuevo azul de metileno FR, cloruro de azul de 1,9-dimetilmetileno (DMMB), derivados de azul de metileno, verde de metileno, violeta Bernthsen de metileno, violet 3RAX de metileno, azul Nilo, derivados de azul Nilo, verde malaquita, Azul celeste A, Azul celeste B, Azul celeste C, safranina O, rojo neutro, cloruro de 5-etilamino-9-dietilaminobenzo[a]fenotiazinio, cloruro de 5-etilamino-9-dietilaminobenzo[a]fenoselenazinio, tiopironina, o tionina.

En un aspecto particular, X y X' de fórmula I pueden ser cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS) y el enlazador (L) puede ser una cefalosporina o un fragmento de la misma.

En otro aspecto más, la fórmula I puede incluir un resto director, que se dirige a una célula o tejido, tal como un patógeno o una célula hospedadora infectada con un patógeno, o un macrófago, o una célula o tejido o componente corporal, tal como un liposoma o péptido.

La fórmula I puede incluir además un aglutinante eficaz para inactivar la fotoactivación, tal como un fluoróforo u otro fotosensibilizante.

Además, determinados aspectos proporcionan a la fórmula I una estructura principal, que se puede utilizar para acoplar uno o más sensibilizantes, aglutinantes eficaces para inactivar la fotoactivación, y restos directores.

En otro aspecto, se proporciona un método para detectar la actividad de una beta-lactamasa en una muestra, que comprende las etapas de: poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende una pluralidad de fotoensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión para una beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes están en un estado inactivado; escindir el enlazador para activar los fotosensibilizantes; activar con luz la composición para producir señal de fluorescencia; y detectar la señal la señal de fluorescencia con un detector, detectando por tanto la actividad de una beta-lactamasa.

La muestra puede ser una muestra biológica aislada a partir de una infección en un sujeto, tal como de un mamífero o un ser humano. En un aspecto, la infección está producida por un patógeno resistente a antibiótico, tal como cualquiera de aquellos relacionados anteriormente.

El método para detectar la actividad de una beta-lactamasa en una muestra puede incluir también la etapa de

cuantificar la señal de la fluorescencia detectada.

Se proporciona también un método para tipar la actividad de una beta-lactamasa en una muestra, que comprende: llevar a cabo una reacción no competitiva que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende una pluralidad de fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión para una beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes están en un estado inactivado; (b) escindir el enlazador para activar los fotosensibilizantes; (c) activar con luz a los sustratos para producir una señal de fluorescencia; y (d) cuantificar la señal de fluorescencia con un detector.

Se proporciona un método para determinar un régimen de antibióticos adecuado que se va a administrar a un sujeto que lo necesita, que comprende las etapas de: tipar la actividad de una beta lactamasa de una muestra de acuerdo con la invención basándose en uno o más sustratos de beta-lactama competidores; y administrar al sujeto que lo necesita un régimen de antibióticos que excluya cualquier antibiótico que tenga una estructura que sea la misma o que sea similar a los sustratos de beta-lactama competidores que se muestra que son escindibles por la actividad beta-lactamasa de la muestra.

Los métodos para tipar las beta-lactamasas y para detectar y/o cuantificar las actividades beta-lactamasas pueden llevarse a cabo en cualquier muestra adecuada que contenga una enzima beta-lactamasa. En un aspecto, la muestra se obtiene de células o tejidos infectados de un sujeto que tiene una infección bacteriana, tal como una infección por un patógeno bacteriano Gram (-) o Gram (+). Las células y/o tejidos de la muestra pueden infectarse con o contienen *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptophomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Serratia*, y *Salmonella* spp., así como, más concretamente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhea*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, y *Salmonella typhimurium*.

Se proporciona un Kit para detectar la actividad de una beta-lactamasa en una muestra, que contiene una composición fotosensibilizante descrita en el presente documento e instrucciones para utilizar la composición fotosensibilizante para detectar la actividad de una beta-lactamasa en una muestra.

Un kit para tipar la actividad de una beta-lactamasa en una muestra, que comprende una composición fotosensibilizante descrita en el presente documento e instrucciones para utilizar la composición fotosensibilizante para tipar la actividad de una beta-lactamasa en una muestra.

Se describen otros aspectos en la siguiente divulgación, y están comprendidos en el ámbito de la invención y/o la divulgación adicional.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente Descripción Detallada, dada a modo de ejemplo, puede entenderse junto con los dibujos acompañantes. Se describirán ahora diversas características y aspectos de la presente invención por medio de ejemplos no limitantes y con referencia a los dibujos acompañantes, en los que:

La **Figura 1** representa esquemáticamente el desarrollo de un fotosensibilizante unido a carbamato (PS) que es inactivo (con o sin luz) mientras está unido y es activable *solo* cuando se libera mediante escisión mediada por la enzima β -lactamasa.

La **Figura 2a** muestra los espectros de RMN ^1H obtenidos para el ácido 7-[(2-fenilacetil)amino]cefalosporánico en CDCl_3 como un disolvente.

La **Figura 2b** muestra el espectro de RMN ^1H obtenido para el ácido 7-[(2-fenilacetil)amino] 3-hidroximeti cefalosporánico en DMSO- d_6 como un disolvente. Se marcaron los picos de protones principales en los espectros.

La **Figura 3** muestra los espectros MS obtenidos para (a) el ácido 7-[(2-fenilacetil)amino] 3-hidroximeti cefalosporánico; y (b) el profármaco ácido defalosporánico-azul de O toluidina.

La **Figura 4** muestra los espectros visibles en el UV obtenidos para el fotosensibilizante (TBO) frente al profármaco fotosensibilizante de ácido cefalosporánico en etanol a una concentración de $2,0 \times 10^{-5}$ M.

La **Figura 5** muestra los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos para el fotosensibilizante (TBO) frente al profármaco fotosensibilizante del ácido cefalosporánico en etanol a una excitación de 635 nm.

La **Figura 6** muestra los gráficos de (a) la emisión de fluorescencia frente a la longitud de onda y (b) la emisión de fluorescencia frente al tiempo para el profármaco senisibilizante del ácido cefalosporánico, que representa la escisión mediada por la enzima del profármaco.

La **Figura 7** representa el mecanismo específico para la activación del profármaco fotosensibilizante mediado por la enzima beta-lactamasa bacteriana (β -LEAPP) en la demostración del principio del uso de las enzimas hidrolíticas de virulencia bacteriana para la liberación específica del fotosensibilizante activo a partir de un estado inactivado.

La **Figura 8** representa la síntesis de β -LEAPP.

La **Figura 9** muestra la emisión de la fluorescencia de β -LEAPP incubado con diferentes concentraciones de

penicilinas de *B. cereus* expresada como una función del tiempo. Los valores relacionados en la leyenda del diagrama son las concentraciones de penicilinas en unidades de enzima por mililitro. Los datos son representativos de tres repeticiones experimentales.

La **Figura 10** muestra el gráfico doble recíproco de la velocidad instantánea del aumento en la fluorescencia de β -LEAPP como una función de la concentración de la penicilinas de *B. cereus*. Se determinó la velocidad instantánea sobre el intervalo de las primeras 20 lecturas tomadas durante los primeros 20 minutos. Los datos consisten en repeticiones experimentales.

La **Figura 11** muestra la emisión de la fluorescencia de β -LEAPP producida en incubación con diversas cepas de bacterias como una función del tiempo. El gráfico A muestra el *S. aureus* ATCC 29213 no productor de betalactamasa, MRSA 8150, 8179, 9307 (todos los aislados clínicos y productores de beta-lactamasa), y un control sin células. El gráfico B muestra *E. coli* ATCC 25922 no productor de betalactamasa, *E. coli* ATCC BAA196 productor de ESBL, un control sin células.

La **Figura 12** muestra una placa ópticamente transparente multipocillo adecuada, es decir, una placa de cultivo de 96 pocillos que se puede usar de acuerdo con estos ejemplos descritos en el presente documento para llevar a cabo las reacciones para determinar la especificidad del sustrato enzimático.

La **Figura 13** muestra una comparación de las constantes de inhibición de la β -lactamasa pura y las suspensiones bacterianas, con los perfiles de inhibición y las concentraciones inhibitorias mínimas de *Bacillus cereus* 5/ β . (a.) las constantes de inhibición de un panel de β -lactamas para la inhibición competitiva del sustrato de la hidrólisis de β -LEAP por la β -lactamasa de *B. cereus*, (b.) las constantes de inhibición para la hidrólisis de β -LEAP por suspensiones bacterianas, (c.) los perfiles de inhibición del panel de β -lactamas para *B. cereus*, (d.) los MIC del panel de β -lactamas para *B. cereus*. Amoxicilina, ácido clavulánico y ampicilina no inhiben el crecimiento de *B. cereus* y no se incluyeron en (c.) y (d.). Se determinó la significancia estadística mediante el ensayo comparativo múltiple de Tukey utilizando Graphpad Prism 5. Las barras horizontales conectadas por intersecciones sólidas indican diferencias significativas.

Descripción detallada de la invención

Realizaciones de la invención:

1. Un método para detectar la actividad de una enzima beta-lactamasa en una muestra, que comprende: poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende fotosensibilizante que se conjugan con un enlazador, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión de la enzima beta-lactamasa, en el que los fotosensibilizantes, cuando se acoplan juntos mediante el enlazador, están en estado inactivado, y en el que los fotosensibilizantes incluyen una pluralidad de fotosensibilizantes del colorante bodipy; y fotoactivar la muestra para inducir una señal que se va a liberar de los fotosensibilizantes sin inactivar y detectar la señal.

2. El método de la realización 1, en el que la muestra es una muestra biológica aislada de una infección en un sujeto.

3. El método de la realización 2, en el que la infección está producida por un patógeno resistente a antibiótico.

4. Un método para determinar la especificidad del sustrato de una enzima beta-lactamasa en una muestra, que comprende:

poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende dos fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que los fotosensibilizantes incluyen una pluralidad de fotosensibilizantes del colorante bodipy, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión para una enzima beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes se inactivan cuando el sitio de escisión está intacto pero no se inactivan cuando el sitio de escisión está escindido; y determinar si el enlazador está escindido, en el que la escisión del enlazador indica que el enlazador es un sustrato de la enzima beta-lactamasa.

5. El método de la realización 4, en el que la etapa de determinar si el enlazador está escindido comprende además detectar una primera señal producida por el fotosensibilizante sin inactivar.

6. El método de la realización 5, que comprende además llevar a cabo una segunda reacción que comprende: poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante y un antibiótico de beta-lactama; detectar una segunda señal producida por el fotosensibilizante sin inactivar de la segunda reacción; y comparar la primera y la segunda señales, en el que el antibiótico de beta-lactama se identifica como un sustrato de la enzima beta-lactamasa cuando la primera señal es más grande que la segunda señal.

7. Un método de tipación de una enzima beta-lactamasa en una muestra, que comprende:

llevar a cabo una reacción competitiva que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende dos fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que los fotosensibilizantes incluyen una pluralidad de fotosensibilizantes del colorante bodipy, en el que el enlazador incluye un sitio de escisión para una beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes están en un estado inactivado; (b) escindir el enlazador para activar los fotosensibilizantes; (c) activar con luz la composición

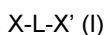
para producir una señal de fluorescencia; y (d) cuantificar la señal de fluorescencia con un detector para obtener un resultado, llevándose a cabo la reacción competitiva en presencia de un antibiótico de beta-lactama competidor; y

5 comparar el resultado de la reacción competitiva con un patrón para tipar la beta-lactamasa.

8. El método de la realización 7, en el que el patrón se determina llevando a cabo una reacción no competitiva que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante; (b) escindir el enlazador para activar los fotosensibilizantes; (c) activar con luz la composición para producir una señal de fluorescencia; y (d) cuantificar la señal de fluorescencia con un detector para obtener un patrón.

9. El método de cualquiera de las realizaciones 2 a 4 o 6 a 8, en el que la señal es una emisión de fluorescencia inducida por la iluminación del fotosensibilizante del colorante bodipy sin inactivar sin inactivar con una longitud de onda de excitación.

10 10. El método de cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la composición fotosensibilizante está representada por la fórmula (I):



20 en la que X y X' son fotosensibilizantes del colorante bodipy y L es el enlazador.

11. El método de cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el enlazador comprende una cefalosporina.

25 12. El método de la realización 1, 10 u 11, en el que la composición comprende además un resto director, que puede dirigir la composición a un patógeno o una célula hospedadora infectada con un patógeno.

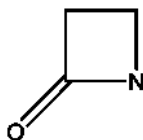
La presente divulgación se refiere a composiciones fotosensibilizantes, y a métodos y kits que utilizan las composiciones fotosensibilizantes para la detección, la cuantificación y la caracterización de las enzimas beta-lactamasas para fines de investigación y diagnóstico clínico. Las composiciones fotosensibilizantes comprenden sustratos para beta-lactamasas como enlazadores para una pluralidad de moléculas fotosensibilizantes. Antes de la escisión del resto enlazador, la pluralidad de moléculas fotosensibilizantes se inactivan de tal manera que no están en estado activable. Cuando se escinde el marco de escisión de la beta-lactamasa en el enlazador, las moléculas fotosensibilizantes llegan a estar físicamente separadas, momento en el cual, se vuelven activables y pueden producir una señal (por ejemplo fluorescencia) simultánea con la activación (por ejemplo, activación por la luz). Esta característica se puede utilizar de acuerdo con la invención en varios métodos, incluyendo la detección cuantitativa de la actividad beta-lactamasa en diversas muestras, la determinación de la especificidad del sustrato de diferentes enzimas beta-lactamasas, y la caracterización de patógenos resistentes al antibiótico de beta-lactama para la selección de tratamientos antimicrobianos adecuados.

40 Se apreciará que la determinación y el inicio del curso adecuado de antibióticos de una manera conveniente es crítica para el resultado del paciente así como para la reducción de la frecuencia de incidencias de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos, especialmente en el caso de organismos productores de beta-lactamasa. Los protocolos actuales para la identificación clínica definitiva de un fenotipo y/o un genotipo de beta-lactamasa requiere de aproximadamente 1 a 3 días de cultivo con el ensayo de susceptibilidad *in vitro* y/o las técnicas relacionadas con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), respectivamente, para la detección de la actividad beta-lactamasa. Estos métodos pueden ser engañosos y son laboriosos.

50 En parte para responder a las deficiencias conocidas en la técnica relacionadas con los métodos para detectar la actividad beta-lactamasa, la presente invención proporciona nuevos métodos para detectar y evaluar la actividad beta-lactamasa que son más sensibles y rápidos y más fáciles de llevar a cabo y que proporcionan de forma fiable y conveniente información cualitativa y cuantitativa con respecto a la actividad de la enzima y/o la especificidad del sustrato.

55 Definiciones

60 El término "beta-lactama", o como alternativa, "β-lactama" o "resto β-lactama", y similares, se refiere a una estructura del anillo de beta-lactama de cuatro átomos característica del sitio de escisión de los sustratos de beta-lactamasas, tales como penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y carbapenemos. Un anillo de beta-lactama tiene la siguiente estructura:



Un "derivado de beta-lactama", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que se asemeja a un resto de anillo de beta-lactama que es capaz de escindir-se por una enzima beta-lactamasa o fragmento catalítico de la misma. Un derivado de beta-lactama puede derivarse de una beta-lactama a través de una modificación química o puede sintetizarse de forma independiente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "beta-lactamasa" o como alternativa, " β -lactamasa" denota una proteína capaz de catalizar la escisión de un sustrato de beta-lactamasa, tales como, una molécula que contiene beta-lactama (por ejemplo, un antibiótico de beta-lactama) o fragmentos o derivados del mismo. Las beta-lactamasas de la invención puede obtenerse de cualquier fuente natural (por ejemplo, tejido infeccioso o una cepa patógena aislada), comercial, o académica. Las beta-lactamasas son generalmente conocidas en la técnica y se describen además en Waley, The Chemistry of beta-Lactamase, Page Ed., Chapman & Hall, Londres, (1992) 198-228 (cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia).

Se conocen en la técnica los fragmentos y/o derivados de beta-lactamasas y su preparación. Un experto en la materia reconocerá que las sustituciones, eliminaciones o adicionales individuales que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (normalmente menos del 5 %, más normalmente menos del 1 %) en una secuencia codificada son "sustituciones conservativas" o "variaciones modificadas conservativamente" donde las alteraciones dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los cinco grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas ilustrativas entre sí:

Alifáticos: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I);
 Aromáticos: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
 Que contienen azufre: Metionina (M), Cisteína (C);
 Básicos: Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); y
 Ácidos: Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E), Asparagina (N), Glutamina (Q). Véase también, Creighton, Proteins, W.H. Freeman and Company, 1984, para agrupamiento adicionales de sustituciones de aminoácidos.

Además, las sustituciones, eliminaciones o adicionales individuales que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada son también "variaciones conservativas". Las variantes de un péptido se caracterizan normalmente por la posesión de al menos un 50 % de identidad de la secuencia contada sobre la alineación de longitud completa con la secuencia de aminoácidos del péptido que utiliza el NCBI Blast 2.0, blastp con huecos configurado con parámetros por defecto, más preferentemente aproximadamente 60 % o 70 %, incluso más preferentemente aproximadamente 80 % o 90 %, o incluso 95 % o 99 % de identidad de la secuencia.

El término "fotosensibilizante se refiere a un compuesto activable que produce una señal cuando se activa con luz. Los fotosensibilizantes pueden producir un efecto fotoquímico o fototóxico sobre una célula cuando se activan con luz, es decir, producen una especie reactiva cuando se activan con luz.

Los fotosensibilizantes pueden incluir fragmentos de fotosensibilizantes y/o derivados de fotosensibilizantes conocidos, que tienen la misma o sustancialmente la misma función que los fotosensibilizantes conocidos, lo que significa que la función que es al menos aproximadamente un 50 % de la función de un fotosensibilizante original, más preferentemente aproximadamente 60 % o 70 %, o aún más preferentemente aproximadamente 80 % o 90 %, o incluso más preferentemente aproximadamente 95 % o 99 % de la función del compuesto fotosensibilizante conocido.

Los fotosensibilizantes pueden incluir "colorantes fotoactivos", que, tal como se usa en el presente documento, se refieren a aquellos fotosensibilizantes que producen una señal fluorescente cuando se activan, pero no necesariamente una especie reactiva en cantidades fototóxicas (es decir, una especie fototóxica). Las señales que se pueden medir procedentes de un colorante fotoactivo incluyen: (i) fosforescencia, (ii) fluorescencia, (iii) especies moleculares reactivas. Las dos primeras son un componente de la propia luz y la última es una consecuencia fisicoquímica de la absorción de la luz por el colorante fotoactivo. Los colorantes fotoactivos pueden ser también fragmentos y/o derivados de colorantes fotoactivos conocidos que tienen la misma o sustancialmente la misma función que un colorante fotoactivo conocido, lo que significa una función que es al menos aproximadamente un 50 % de la función de un colorante fotoactivo conocido, más preferentemente aproximadamente 60 % o 70 %, o aún más preferentemente aproximadamente 80 % o 90 % o incluso más preferentemente aproximadamente 95 % o 99 % de la función del colorante fotoactivo conocido.

Dependiendo de la longitud de onda y de la intensidad de la luz administrada, se puede activar un fotosensibilizante

para emitir fluorescencia, por lo tanto, actúa como un colorante fotoactivo, pero no produce una especie fototóxica. La longitud de onda y la intensidad de la luz pueden adaptarse por métodos conocidos para los expertos en la materia para provocar un efecto fototóxico cuando se desee.

5 La expresión "composición fotosensibilizante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a construcciones químicas que tienen uno o más fotosensibilizantes (o fragmentos y/o derivados de los mismos), así como otros materiales, tales como enlazadores, estructuras principales, restos directores y aglutinantes, que se pueden acoplar a las anteriores.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "colorante fluorescente" se refiere a colorantes que son fluorescentes cuando se iluminan con luz, pero no producen especies reactivas que sean fototóxicas.

Cualquier compuesto o resto que es sea fluorescente en uno o más estados puede contener uno o más "fluoróforos", que se refieren a un compuesto o parte del mismo que presenta fluorescencia. El término fluorogénico se refiere a un
15 compuesto o composición que se vuelve fluorescente o demuestra un cambio en su fluorescencia (tal como un aumento o disminución en la intensidad de la fluorescencia o un cambio en su espectro de fluorescencia) tras interactuar con otra sustancia, por ejemplo, tras unirse a un compuesto biológico o ion metálico, tras la reacción con otra molécula o tras el metabolismo por una enzima. Se pueden sustituir los fluoróforos para alterar su solubilidad, las propiedades espectrales y/o las propiedades físicas. Los expertos en la materia conocen numerosos fluoróforos y
20 compuestos y composiciones fluorogénicas e incluyen, aunque no de forma limitativa, benzofuranos, quinolinas, quinazolininas, quinazolinonas, indoles, benzazoles, indodicarbocianinas, borapoliázaindacenos y xantenos, incluyendo los últimos, fluoresceínas, rodaminas y rodolinas así como otros fluoróforos descritos en Haugland, Molecular Probes, Inc. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, (9ª ed., incluido el CD-ROM, septiembre de 2002), e incluyen los fotosensibilizantes, colorantes fotoactivos, y compuestos y restos fluorescentes de la invención.

25 El término "conjugado", tal como se usa en el presente documento, se refiere al acoplamiento o asociación de dos o más moléculas (por ejemplo, un fotosensibilizante y un enlazador), normalmente mediante enlace covalente.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "detectable" o "directamente detectable", o similares, se refiere a la presencia de una señal detectable generada a partir de un compuesto, por ejemplo, un fotosensibilizante, que es detectable mediante observación, instrumentación, o película sin requerir modificaciones químicas o sustancias adicionales.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "enlazador" se refiere a un agente capaz de unirse a dos o tres componentes (por ejemplo, compuestos o restos) de la composición fotosensibilizante juntos (por ejemplo, un fotosensibilizante a otro fotosensibilizante, un fotosensibilizante a un aglutinante, un fotosensibilizante a una estructura principal, un aglutinante a una estructura principal, un fotosensibilizante a un resto director, o un aglutinante a un resto director). Un enlazador es un resto relativamente pequeño con solo dos o tres grupos terminales conjugables para unir entre dos o tres moléculas/restos directores. El "enlazador" puede ser escindible. Se describen en el presente
40 documento ejemplos de enlazadores.

Además de grupos enzimáticamente escindibles, por ejemplo, restos de beta-lactamas, se pueden incluir uno o más sitios en un enlazador que se escindan mediante la acción de un agente diferente de una enzima. Los agentes de escisión no enzimáticos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, ácidos, bases, luz (por ejemplo, derivados de nitrobenzilo, grupos fenacilo, ésteres de benzoína), y calor. Se conocen en la técnica muchos grupos escindibles. Véase, por ejemplo, Jung et al., Biochem. Biophys. Acta, 761: 152-162 (1983); Joshi et al., J. Biol. Chem., 265: 14518-14525 (1990); Zarling et al., J. Immunol., 124: 913-920 (1980); Bouizar et al., Eur. J. Biochem., 155: 141-147 (1986); Park y col., J. Biol. Chem., 261: 205-210 (1986); Browning et al., J. Immunol., 143: 1859-1867 (1989), cada uno de los cuales se incorpora por referencia.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "estructura principal" se refiere a un agente que funciona para acoplar uno o más componentes de una composición fotosensibilizante, tales como, por ejemplo, un poliaminoácido o agente similar que se une a uno o más fotosensibilizantes y/o uno o más aglutinantes y/o uno o más restos directores. La propia estructura principal puede ser adicionalmente un resto director, por ejemplo, polilisina. Una "estructura principal" como se usa en el presente documento es un resto con un peso molecular superior y capaz de cargar más moléculas fotoactivas que un 'enlazador'. La estructura principal puede ser una estructura polimérica que proporciona una base para añadir múltiples unidades (más de tres). Los ejemplos de estructuras principales que se pueden usar de acuerdo con la invención, incluyen, aunque no de forma limitativa polietilenglicol y poliprolina.

60 El término "muestra", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material que pueda contener una beta-lactamasa o una secuencia de nucleótidos que codifica una beta lactamasa, o un material al cual se añade una beta-lactamasa o una secuencia de nucleótidos que codifica una beta-lactamasa. Normalmente, la muestra puede obtenerse de y/o contener un tejido corporal, célula, o fluido de un sujeto, y puede comprender proteínas endógenas de células hospedadoras, polímeros de ácidos nucleicos, nucleótidos, proteínas o péptidos de oligonucleótidos
65 aislados u obtenidos de los anteriores. La muestra puede presentarse en cualquier forma física adecuada, tales como, por ejemplo, una dispersión fluida, tal como una solución acuosa, un cultivo celular (viable o de otra forma) o

inmovilizado sobre una superficie sólida o semisólida tal como un gel de poliacrilamida, bloque o micromatriz de membranas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aglutinante" se refiere a un agente que absorbe energía de un fotosensibilizante activado adyacente o inactiva de otra forma el fotosensibilizante, y, por lo tanto, inactiva el fotosensibilizante. Se puede utilizar un "aglutinante" de forma sinónima con el término "inactivador", que se puede referir también a un compuesto o resto que absorbe energía de un compuesto o resto donante excitado. Un inactivador puede absorber los fotones fluorescentes emitidos por un compuesto donante, enmascarando por tanto la fluorescencia del compuesto donante. Un aglutinante puede participar en la inactivación estática (estado fundamental) y dinámica (estado excitado). Es decir, en el contexto de una configuración EtNBS-enlazador-EtNBS (un ejemplo de inactivación estática), se puede considerar que cualquiera de los restos EtNBS es el aglutinante, mientras que se puede considerar a los otros EtNBS como el fluoróforo. Como alternativa, se proporciona un profármaco fotoactivable como se divulga en el presente documento, donde el profármaco tiene la configuración EtNBS-Enlazador-Aglutinante. Esta configuración representaría un ejemplo de inactivación de tipo dinámica en la que el aglutinante (por ejemplo, fluoresceína) funciona para inactivar la señal generada por EtNBS hasta que los dos restos se separan por escisión del enlazador.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína", salvo que se especifique otra cosa, se usan de forma indistinta. Los péptidos, polipéptidos, y proteínas utilizados en los métodos y composiciones descritas en el presente documento pueden ser recombinantes, purificados a partir de fuentes naturales, o sintetizados químicamente. Por ejemplo, la referencia al uso de una proteína bacteriana o una proteína procedente de bacterias, incluye el uso de moléculas producidas recombinantemente, moléculas purificadas a partir de fuentes naturales, o moléculas sintetizadas químicamente.

El término "sujeto" se usa en el presente documento para referirse a un animal vivo, incluyendo un ser humano.

El sujeto puede estar infectado con o transportar un organismo no deseado, por ejemplo, una infección bacteriana.

Tal como se usa en el presente documento, "patógeno" u "organismo diana" significa un organismo que produce o agrava un trastorno, tal como una infección, granuloma, u otra respuesta inmunitaria adversa.

El término "obtener", como en "obtener" la "composición sensibilizante", "enlazador" o "aglutinante", se pretende que incluya adquirir, sintetizar o adquirir de otra forma los elementos de la invención.

En la presente divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado atribuido a los mismos en la ley de patentes de Estados Unidos y pueden significar "incluye", "que incluye", y similares; "que consiste esencialmente de" o "consiste esencialmente" análogamente tiene el significado atribuido en la ley de patentes de Estados Unidos y la expresión es abierta, permitiendo la presencia de más de lo que se enumera siempre que las características básicas o novedosas de lo que se enumera no se cambien por la presencia de más de lo que se enumera, pero excluye las realizaciones de la técnica anterior.

Otras definiciones aparecen en contexto a lo largo de esta divulgación.

Antibióticos, resistencia y beta-lactamasa

Aunque no se pretende limitar la presente invención, se proporciona la siguiente descripción general de antibióticos, resistencia y beta-lactamasa.

En general, los quimioterapéuticos antimicrobianos se clasifican basándose en la estructura química y el modo de acción. En particular, los antibióticos se pueden clasificar como (a) agentes que inhiben la síntesis de las paredes de las células bacterianas, incluyendo la clase β -lactama de antibióticos (por ejemplo, penicilinas, cefalosporinas, o carbapenemos) u otros agentes diferentes tales como vancomicina y bacitracina, (b) agentes que actúan para permeabilizar la membrana celular produciendo una liberación tóxica de material intracelular (por ejemplo, detergentes tales como polimixina), (c) agentes que alteran la función de las subunidades ribosómicas 30S o 50S para interrumpir la síntesis de proteínas (por ejemplo, cloranfenicol, tetraciclinas, o eritromicina), (d) agentes que inhiben o bloquean la síntesis o el metabolismo del ácido nucleico bacteriano (por ejemplo, rifampina, rifabutina, o quinolonas), y (e) agentes que bloquean o inhiben el metabolismo bacteriano (por ejemplo, trimetoprim o sulfonamidas). Con respecto a los antibióticos de beta-lactama, en particular, la resistencia a dichos compuestos es debida principalmente a la capacidad de las bacterias resistentes a expresar las enzimas beta-lactamasas, que se liberan de la célula y que hidrolizan los anillos de beta-lactama de los antibióticos, inactivándolos por tanto.

La clase β -lactama de los antibióticos representa una clase grande e importante de antibióticos cuya eficacia global está amenazada por la aparición de la resistencia, que está en concreto, producida por la aparición continuada de enzimas beta-lactamasas en diversas bacterias. Las beta-lactamasas representan un mecanismo eficaz establecido por las bacterias para escapar a la acción letal de los antibióticos de beta-lactama. Pueden estar codificadas por cromosomas o plásmidos, producidos de una manera constitutiva o inducible, y pueden secretarse en el espacio

periplásmico de cepas Gram negativas o en el medio externo por sus homólogas Gram-positivas. La incidencia ubicua de beta-lactamasas en bacterias y su asociación con la resistencia clínica ha sustentado un fuerte interés en estas enzimas. Solo unos pocos años después del debut clínico de la penicilina en 1944, han emergido los primeros informes de resistencia a los antibióticos de beta-lactama. En la actualidad, existen aproximadamente 500 beta-lactamasas diferentes conocidas, de las cuales 200 de las mismas son beta-lactamasas con un espectro extendido (ESBL) (Paterson et al., Clin. Microbio. Rev. 2005, 18:657-686).

Como se ha mencionado de forma breve anteriormente, las β -lactamasas se organizan bajo un esquema de clasificación en cuatro clases moleculares (A, B, C y D) basadas en sus secuencias de aminoácidos. Las enzimas de clase A tienen un peso molecular de aproximadamente 29 kDa e hidrolizan preferentemente las penicilinas. Los ejemplos de enzimas de clase A incluyen la β -lactamasa de *Staphylococcus aureus*. Las enzimas de clase B incluyen metaloenzimas que tienen un perfil de sustrato más amplio que las otras clases de β -lactamasas. Las enzimas de clase C tienen pesos moleculares de aproximadamente 39 kDa e incluyen las cefalosporinasas cromosómicas de bacterias gram-negativas, que son responsables de la resistencia de las bacterias gram-negativas a varios antibióticos tradicionales y diseñados recientemente. Además, las enzimas de clase C incluyen también la lactamasa de *Enterobacter cloacae* P99, que es la responsable de hacer que esta especie de *Enterobacter* sea uno de los agentes bacterianos de más amplia diseminación en los hospitales de Estados Unidos. Las enzimas de la clase D actualmente reconocidas son las serina hidrolasas, que presentan un único perfil de sustrato.

Las cuatro clases de beta-lactamasas A, B, C y D pueden clasificarse adicionalmente en agrupaciones funcionales mediante el sistema de clasificación Bush-Jacoby-Medeiros (Philippon et al., 1998). En la consideración de dos de las cuatro clases, A y C, se puede demostrar que existe un alto nivel de ambigüedad entre la secuencia del aminoácido principal de las enzimas y los fenotipos funcionales que confieren su expresión. Las beta-lactamasas de clase C incluyen miembros transportados por cromosomas y plásmidos cuya actividad es muy similar, con motivos conservados, pero cuya identidad de la secuencia total puede variar como mucho un 40 % (Philippon et al., 1998). El fenotipo funcional asociado con su expresión se caracteriza por resistencia a las aminopenicilinas, cefalosporinas de primera generación, cefoxitina, y tratamiento combinado de amoxicilina/clavulanato (Philippon et al., 1998). Por el contrario, la clase A de beta-lactamasas, que abarca las ESBL, puede compartir un alto grado de identidad de la secuencia, pero son las más funcionalmente diversas de las cuatro clases ámbas. El intervalo de fenotipo en la clase A incluye solo la resistencia a las penicilinas, a las penicilinas y algunas cefalosporinas, a las cefalosporinas y cefuroxima, a la tercera generación de cefalosporinas, a los inactivadores de beta-lactamasas, o a imipenemo (Philippon et al., 1998). Algunas enzimas de clase A, aunque un 97 % son similares en la estructura primaria, presentan grandes diferencias en la cinética por diversos sustratos. Esta relación se ilustra por las enzimas TEM1 y TEM12 (ESBL) donde la diferencia en un único aminoácido en la secuencia principal de 286 aminoácidos cambia la resistencia al fenotipo de la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro a la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación de espectro extendido (Philippon et al., 1998).

Las personas normalmente expertas en la materia apreciarán bien otros detalles con respecto a la naturaleza de los antibióticos, los mecanismos de resistencia y las enzimas beta-lactamasas.

Composiciones

Composiciones fotosensibilizantes

En un aspecto, se proporciona una composición fotosensibilizante, que comprende uno o más fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión (por ejemplo, un sitio de escisión de una enzima beta-lactamasa) y en el que el uno o más fotosensibilizantes, cuando se acoplan juntos mediante un enlazador, están en un estado inactivado. Tras la escisión del enlazador (por ejemplo, mediante una enzima capaz de escindir el sitio de escisión), el uno o más fotosensibilizantes llegan a no inactivarse y son fotoactivables. Los fotosensibilizantes sin inactivar pueden a continuación activarse para producir una señal (por ejemplo, una emisión de luz), que se puede detectar a continuación mediante medios de detección (por ejemplo, un fluorímetro). El enlazador puede comprender uno o más sitios de escisión de la beta-lactamasa, comprendiendo cada sitio al menos un resto de beta-lactama o un derivado funcional del mismo.

Se contempla cualquier disposición física adecuada del uno o más fotosensibilizantes y el enlazador, siempre que la escisión del enlazador de como resultado, tanto directa como indirectamente, la desinactivación del uno o más fotosensibilizantes. Se apreciará por aquellas personas normalmente expertas en la técnica que la inactivación es una reducción de la intensidad del estado excitado de un fotosensibilizante. Se puede lograr la inactivación de muchas maneras diferentes. Por ejemplo, dos mecanismos incluyen: (i) la inactivación estática producida por dimerización en un estado fundamental y (ii) la inactivación dinámica producida mediante FRET (transferencia de energía de resonancia fluorescente), que representa la transferencia de energía entre un donante excitado y una molécula aceptora en estado fundamental. La inactivación se puede lograr también por otros métodos, incluyendo, por ejemplo, transferencia de electrones fotoinducidos, potenciación paramagnética de cruce intersistema, Acoplamiento por intercambio Dexter, y acoplamiento de excitones tales como la formación de complejos oscuros. El estado inactivado depende de la distancia entre dos moléculas fotoactivas. Esta distancia puede definirse mediante la elección de la molécula enlazadora. Por ejemplo, se puede usar un enlazador flexible para alterar la distancia entre dos moléculas

con respecto a la temperatura y a las condiciones del disolvente y analizar la distancia mejor para la inactivación. De otro modo, se puede emplear un enlazador rígido para observar la eficacia de la inactivación a una distancia fijada. La inactivación se refiere a cualquier proceso que disminuye la intensidad de la fluorescencia de una muestra e incluye reacciones en un estado excitado, redistribuciones moleculares, transferencia de energía, formación del complejo en estado fundamental, e inactivación por colisión.

En un aspecto particular, la composición fotosensibilizante está representada por la fórmula general I:



en el que al menos uno de X o X' es un fotosensibilizante de acuerdo con la invención y en el que L representa un enlazador sin escindir. En otro aspecto, X y X' pueden ser fotosensibilizantes iguales o diferentes. En otro aspecto más, X puede ser un fotosensibilizante y X' puede ser un aglutinante o inactivador cuando se inactiva el fotosensibilizante. En otros determinados aspectos, X y/o X' pueden ser un colorante fotoactivo, tales como, por ejemplo, una fenotiazina (por ejemplo, cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS)) o un derivado o fragmento funcional del mismo. El enlazador (L) puede ser cualquier enlazador adecuado divulgado en el presente documento, que como mínimo contiene al menos un sitio escindible por enzima (por ejemplo, un resto de beta-lactama).

En un aspecto particular, X y X' son cada uno cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS) y L comprende un resto de beta-lactama o un derivado del mismo, tales como, por ejemplo, una penicilina o una cefalosporina, o un derivado de la misma. X y X' pueden ser cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS) y L puede comprender una cefalosporina.

En otros aspectos, las composiciones fotosensibilizantes pueden incluir uno o más restos directores, que se pueden acoplar al enlazador (L) o a uno o más de los fotosensibilizantes X o X'. Las composiciones fotosensibilizantes en otras realizaciones se pueden acoplar también a una estructura principal. Los restos directores útiles en la presente invención incluyen anticuerpos, aptámeros, proteínas, y péptidos. Los restos directores incluyen macromoléculas biológicas; proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, y carbohidratos, así como moléculas pequeñas y grupos funcionales químicos.

La siguiente descripción proporciona directrices adicionales con respecto a la naturaleza de los componentes de las composiciones fotosensibilizantes.

Fotosensibilizantes

Cualquier fotosensibilizante o combinación de fotosensibilizantes adecuada se puede unir a cualquier enlazador adecuado para formar las composiciones fotosensibilizantes, con la condición que los fotosensibilizantes se inactiven cuando el enlazador no se escinde, pero que lleguen a no inactivarse cuando el enlazador se escinda. Los fotosensibilizantes pueden tener las siguientes características generales: Un rendimiento cuántico de fluorescencia razonable para los diagnósticos, una fototoxicidad significativa para el tratamiento, toxicidad mínima en oscuridad, absorción en la región de la luz del espectro (400-800 nm), y un radio Forster entre pares de FRET de 2-8 nm.

Los fotosensibilizantes pueden ser anfífilos, lo que significa que comparten las propiedades opuestas de ser solubles en agua, además de hidrófobos. El fotosensibilizante debe ser soluble en agua a fin de pasar a través del torrente sanguíneo sistémicamente, sin embargo, debe ser también suficientemente hidrófobo para pasar a través de las membranas celulares. Las modificaciones, tales como la unión a restos polares (aminoácidos, azúcares, y nucleósidos) en el anillo de porfirina hidrófobo, pueden alterar la polaridad y los coeficientes de reparto hasta niveles deseados. Dichos métodos de modificación son bien conocidos en la materia.

En realizaciones específicas, los fotosensibilizantes absorben luz en una longitud de onda relativamente larga, absorbiendo por tanto a baja energía. La luz a baja energía puede viajar a través de tejido a diferencia de la luz de alta energía, que se convierte en dispersa. La penetración óptima del tejido por la luz se produce entre aproximadamente 650 y aproximadamente 800 nm. Las porfirinas que se encuentran en los glóbulos rojos absorben normalmente a aproximadamente 630 nm, y las porfirinas nuevas modificadas tienen un espectro óptico que se ha "desplazado al rojo", en otras palabras, absorben luz de energía más baja. Otros compuestos que se producen naturalmente tienen un espectro óptico que se ha desplazado al rojo con respecto a la porfirina, tales como las clorinas que se encuentran en la clorofila (aproximadamente 640 a aproximadamente 670 nm) o las bacterioclorinas que se encuentran en las bacterias fotosintéticas (aproximadamente 750 a aproximadamente 820 nm).

En determinadas realizaciones, los fotosensibilizantes pueden incluir porfirinas y/o hidroporfirinas. Las porfirinas e hidroporfirinas pueden incluir, aunque no de forma limitativa, Photofrin® RTM (porfímero de sodio), hematoporfirina IX, ésteres de hematoporfirina, éster de dihematoporfirina, diporfirinas sintéticas, tetrafenil porfirinas sustituidas con O (porfirinas picket fence), 3,1-meso tetraquis (o-propionamido fenil) porfirina, hidroporfirinas, derivados de benzoporfirinas, derivados monoácidos de benzoporfirinas (BPD-MA), derivados de anillos "a" monoácidos, aductos tetracianoetilenados de benzoporfirinas, aductos de dimetil acetilenodicarboxilato de benzoporfirina, precursores metabólicos endógenos, ácido δ-aminolevulínico, benzonaftoporfirinas, porfirinas que se producen naturalmente, protoporfirina IX inducida por ALA, diclorinas sintéticas, bacterioclorinas de la serie de tetra(hidroxifenil) porfirinas,

purpurinas, derivados de estaño y cinc de octaetilpurpurina, etiopurpurina, estaño-etio- purpurina, porfíricos, clorinas, cloro _{e6}, mono-1-aspartil derivado de cloro _{e6}, di-1-aspartil derivado de cloro _{e6}, estaño(IV) cloro _{e6}, meta-tetrahidroxifenilcloro, cloro _{e6} monoetilendiamina monoamida, verdinas tales como, pero sin limitarse a metil piroverdina de cinc (ZNMPV), trimetil éster de copro II verdina (CVTME) y metil éster de deuteroverdina (DVME),
 5 derivados de feoforbido, y compuestos de pirofeoforbido, texafirinas con o sin lantánidos o metales sustituidos, texafirina de lutecio (III), y texafirina de gadolinio (III), o un derivado o fragmento funcional del mismo, es decir, compuestos que son químicamente similares y/o son porciones pequeñas del compuesto original que llevan a cabo la misma o sustancialmente la misma función. Donde cualquier resto, fragmento o derivado de un compuesto lleva a cabo "sustancialmente la misma función" que el compuesto original, este resto, fragmento o derivado lleva a cabo al
 10 menos aproximadamente un 50 % de la actividad del compuesto original, más preferentemente aproximadamente 60 % o 70 %, o aún más preferentemente aproximadamente 80 % o 90 %, o incluso más preferentemente aproximadamente 95 % o 99 % de la actividad del compuesto original.

Porfirinas, hidroporfirinas, benzoporfirinas, y los derivados están relacionados en la estructura con la hematoporfirina, una molécula que es un precursor biosintético de hemo, que es el constituyente principal de la hemoglobina, que se encuentra en los eritrocitos. La primera generación y las porfirinas que se producen naturalmente se excitan a aproximadamente 630 nm y tienen un rendimiento cuántico fluorescente bajo global y una eficacia baja en la generación de especies reactivas de oxígeno. La luz a aproximadamente 630 nm puede solo penetrar tejidos a una profundidad de aproximadamente 3 mm, sin embargo, existen derivados que se han 'desplazado al rojo' para absorber a longitudes de onda más largas, tales como las benzoporfirinas BPD-ertoporfina). Por tanto, estos derivados 'desplazados al rojo' tienen menos toxicidad colateral en comparación con las porfirinas de primera generación.

Los derivados de porfirinas incluyen también clorinas y bacterioclorinas, sin embargo, estas tienen la propiedad única de dobles enlaces de exo-pirrol hidrogenados en la estructura principal del anillo de porfirina, que permite la absorción a longitudes de onda mayores de aproximadamente 650 nm. Las clorinas se derivan de la clorofila, y las clorinas modificadas tales como *meta*-tetrahidroxifenilclorina (mTHPC) tienen grupos funcionales para aumentar la solubilidad. Las bacterioclorinas se derivan de bacterias fotosintéticas y se desplazan al rojo además a aproximadamente 740 nm. Una realización específica utiliza clorina_{e6}.

Los derivados de porfirina incluyen también purpurinas, porfíricos, y verdinas, que tienen eficacias similares a o que exceden a las de la hematoporfirina. Las purpurinas contienen la porfirina macrocíclica básica, pero están desplazadas al rojo a aproximadamente 715 nm. Los porfíricos tienen similares longitudes de onda de activación a la hematoporfirina (aproximadamente 635 nm), pero tienen rendimientos cuánticos fluorescentes mayores. Las verdinas contienen un anillo de ciclohexano fusionado con uno de los pirroles del anillo de porfirina. Los fórbidos y los feofórbidos se derivan de clorofilas y tienen 20 veces la eficacia de la hematoporfirina. Las texafirinas son nuevas porfirinas expandidas de coordinación con metales. La única característica de las texafirinas es la presencia de cinco, en vez de cuatro, nitrógenos de coordinación en los anillos de pirrol. Esto permite la coordinación de cationes metálicos más grandes, tales como lantánidos trivalentes. Gadolinio y lutecio se usan como los metales de coordinación. En una realización específica, el fotosensibilizante puede ser Antrin®, conocido de otra forma como motexafin lutecio.

El ácido 5-aminolevulínico (ALA) es un precursor en la ruta biosintética de hemo, y la administración exógena de este compuesto produce un desplazamiento en el equilibrio de las reacciones posteriores en la ruta. En otras palabras, la formación del precursor inmediato a hemo, protoporfirina IX, es dependiente de la velocidad de síntesis del ácido 5-aminolevulínico, gobernada como una retroalimentación negativa por la concentración del grupo hemo. La conversión de la protoporfirina IX es lenta, y cuando se desea, la administración del ALA exógeno puede derivar el mecanismo de retroalimentación negativa y dar como resultado la acumulación de niveles fototóxicos de protoporfirina IX inducida por ALA. ALA se elimina rápidamente del cuerpo, pero al igual que la hematoporfirina, tiene una longitud de onda de absorción de aproximadamente 630 nm.

Los fotosensibilizantes de primera generación se ilustran por el derivado de porfirina Photofrin®, conocido también como porfímero de sodio. Photofrin® se deriva de hematoporfirina-IX mediante tratamiento ácido y se ha homologado por la Food and Drug Administration para su uso en PDT. Photofrin® se caracteriza como un complejo y una mezcla inseparable de monómeros, dímeros, y oligómeros superiores. Se ha hecho un sustancial esfuerzo en el campo para desarrollar sustancias puras que se puedan utilizar como fotosensibilizantes satisfactorios. Por tanto, en una realización específica, el fotosensibilizante es un derivado de benzoporfirina ("BPD"), tal como BPD-MA, conocido comercialmente también como Verteporfirina. la patente de Estados Unidos n.º 4.883.790 describe varios BPD. Verteporfirina se ha caracterizado vigorosamente (Richter et al., 1987; Aveline et al., 1994; Levy, 1994) y se ha encontrado que es un fotosensibilizante muy potente para PDT. Verteporfirina se ha usado en el tratamiento de PDT de determinados tipos de degeneración macular, y se cree que se dirige específicamente a sitios de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, o angiogénesis, tal como los observados en la degeneración macular "húmeda". Verteporfirina se administra normalmente por vía intravenosa, con un intervalo óptimo en el tiempo de incubación de 1,5 a 6 horas. Verteporfirina absorbe a 690 nm, y se activa con fuentes de luz comúnmente disponibles. Un fotosensibilizante basado en tetrapirrol que tiene un éxito reciente en el uso clínico es MV0633 (Miravant).

Los fotosensibilizantes pueden tener una estructura química que incluye múltiples anillos conjugados que permiten la absorción y la fotoactivación por la luz. Dichos compuestos específicos incluyen motexafin lutecio (Antrin®) y clorina_{e6}.

Los fotosensibilizantes incluyen también cianinas y otros colorantes fotoactivos. Las cianinas y otros colorantes incluyen, aunque no de forma limitativa merocianina, ftalocianina, cloroaluminio ftalocianina, aluminio PC sulfonado, PC catiónico con sustitución en el anillo, AIPc sulfonado, derivado disulfonado o tetrasulfonado, naftalocianina sulfonada de aluminio, naftalocianina, aducto de tetracianoetileno, cristal violeta, cloruro β azul, benzofenotiazinio, cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS), derivado de fenotiazina, fenotiazinios tales como rosa Bengala, derivados de azul de toluidina, azul de O toluidina (TBO), azul de metileno (MB), nuevo azul de metileno N (NMMB), nuevo azul de metileno BB, nuevo azul de metileno FR, cloruro de azul de 1,9-dimetilmetileno (DMMB), derivados de azul de metileno, verde de metileno, violeta Bernthsen de metileno, violet 3RAX de metileno, azul Nilo, derivados de azul Nilo, verde malaquita, Azul celeste A, Azul celeste B, Azul celeste C, safranina O, rojo neutro, cloruro de 5-etilamino-9-dietilaminobenzo[a]fenotiazinio, cloruro de 5-etilamino-9-dietilaminobenzo[a]fenoselenazinio, tiopironina, o tionina.

Las cianinas son compuestos de color azul oscuro o púrpura que son similares en estructura a las porfirinas. Sin embargo, estos colorantes son mucho más estables al calor, la luz, y a los ácidos y bases fuertes que las moléculas de porfirina. Las cianinas, ftalocianinas, y naftalocianinas son compuestos químicamente puros que absorben la luz de longitudes de onda más largas que los derivados de hematoporfirina con una absorción máxima a aproximadamente 680 nm. Las ftalocianinas, que pertenecen a una nueva generación de sustancias para PDT están queladas con varios metales diamagnéticos, principalmente aluminio y cinc, que potencian su fototoxicidad. Una sustitución en el anillo de las ftalocianinas con grupos sulfonados aumentará la solubilidad y alterará la captación celular. Menos los compuestos sulfonados, que son más lipófilos, muestran mejores propiedades de penetración de las membranas y una actividad biológica más elevada. Las cinéticas son mucho más rápidas que las de HPD, donde, por ejemplo, se observaron relaciones elevadas de tumor a tejido (8.1) después de 1-3 horas. Las cianinas se eliminan rápidamente y casi no se puede observar fluorescencia en el tejido de interés después de 24 horas.

Se utilizan también otros colorantes fotoactivos tales como azul de metileno y rosa bengala, para el tratamiento fotodinámico. El azul de metileno es un colorante catiónico de fenotiazina que se ilustra por su capacidad de dirigirse específicamente al potencial de membrana mitocondrial. Rosa bengala y fluoresceína son colorantes de xanteno que están bien documentados en la técnica para usar en el tratamiento fotodinámico. Diacetato de rosa bengala es un eficaz, generador de oxígeno singlete permeante de la célula. Es un derivado de xanteno yodado que se ha modificado químicamente mediante la introducción de grupos acetato. Estas modificaciones inactivan sus propiedades de fluorescencia y fotosensibilización, aumentando a la vez su capacidad de cruzar membranas celulares. Una vez dentro de la célula, las esterasas eliminan los grupos acetato y restauran el rosa bengala a su estructura nativa. Esta localización intracelular permite al diacetato de rosa bengala ser un fotosensibilizante muy eficaz.

En otros aspectos, los fotosensibilizantes pueden ser aductos de Diels-Alder, aductos de dicarboxilato de dimetil acetileno, antracenodionas, antrapirazoles, aminoantraquinona, colorantes de fenoxazina, colorantes de calcógeno pirilio tales como seleno catiónico y derivados de telurio pirilio, sales catiónicas de iminio, y tetraciclinas son otros compuestos que presentan también propiedades fotoactivas y se pueden usar de forma ventajosa en el tratamiento fotodinámicos. Otros fotosensibilizantes que no se encuentran en cualquiera de las categorías anteriormente mencionadas tienen otros usos además del tratamiento fotodinámico, pero son también fotoactivos. Por ejemplo, antracenodionas, antrapirazoles, los compuestos de aminoantraquinonas se utilizan a menudo como tratamientos anticancerosos (es decir, mitoxantrona, doxorubicina). Se ha descubierto también que los colorantes de calcógeno pirilio tales como los derivados de seleno y telurio pirilio catiónicos presentan propiedades fotoactivas en el intervalo de aproximadamente 600 a aproximadamente 900 nm de intervalo, más preferentemente de aproximadamente 775 a aproximadamente 850 nm. Además, antibióticos tales como tetraciclinas y compuestos de fluoroquinolona han demostrado propiedades fotoactivas.

Enlazadores/sitios de escisión de enzimas

Los enlazadores son capaces de unir dos o más componentes de la composición fotosensibilizante juntos (por ejemplo, un fotosensibilizante a otro fotosensibilizante, un fotosensibilizante a un aglutinante, un fotosensibilizante a una estructura principal, un aglutinante a una estructura principal, un fotosensibilizante a un resto director, o un aglutinante a un resto director). Es adecuado cualquier enlace que sea capaz de unir los componentes de tal manera que sean estables en condiciones fisiológicas durante el tiempo necesario para la administración y tratamiento, pero los enlaces covalentes son ventajosos. la unión entre dos componentes puede ser directa, por ejemplo, donde un fotosensibilizante se une directamente a otro fotosensibilizante, o indirecta, por ejemplo, donde un fotosensibilizante se une a un intermedio, por ejemplo, se une a la estructura principal, y este intermedio se une a otro fotosensibilizante. Un enlazador debe funcionar en condiciones de temperatura, pH, sal, sistema disolvente, y otros reactivos que retienen sustancialmente la estabilidad química del fotosensibilizante, la estructura principal (si está presente), y el resto director.

Los enlazadores pueden comprender un sitio de escisión de la enzima para una enzima bacteriana. En un aspecto de la invención, la escisión del enlazador por una enzima de un patógeno da lugar a la reducción de la inactivación que es el resultado de la conformación adoptada por los múltiples sensibilizantes unidos entre sí. En otro aspecto, la escisión del enlazador por una enzima de un patógeno da lugar a la reducción de la inactivación que es el resultado de la inclusión de un enlazador (por ejemplo, un inactivador, véase anteriormente). Sin quedar ligado a teoría alguna,

las células diana dan lugar a la reducción de la inactivación mediante la producción endógena de una enzima que escinde el enlazador. El sitio de escisión de la enzima enlazadora puede ser un sitio de escisión de una beta-lactamasa que comprende uno o más restos de anillos de beta lactama. En una realización más, el enlazador comprende una penicilina o una cefalosporina o un derivado funcional o fragmento del mismo.

Uno de los mecanismos utilizados por las bacterias para volverse resistentes a un antibiótico implica la producción de una enzima que inactiva el antibiótico. Un ejemplo de este tipo de resistencia lo constituyen las enzimas beta-lactamasas, tal como se ha descrito anteriormente. Las enzimas beta-lactamasa escinden el anillo de β -lactama (2-azetidionona) de cuatro miembros (tres carbonos, un nitrógeno que constituye la única característica estructural compartida por los antibióticos de β -lactama. Esta familia de antibióticos incluyen las penicilinas, cefalosporinas, penemos, carbapenemos, y monobactamas monocíclicas, entre otros. En consecuencia, en realizaciones específicas, el enlazador comprende una penicilina, una cefalosporina, un carbapenemo, o una monobactama monocíclica o un fragmento de la misma (por ejemplo, que comprende un anillo de beta monobactamas). Dichos enlazadores pueden incluir derivados de cefalosporina u otros antibióticos, en los que dicho derivado se escinde por una beta-lactamasa en igual o similar extensión que el enlazador progenitor. Los ejemplos de derivados de enlazadores incluyen un enlazador como se describe en el presente documento, tal como cefalosporina, que se conjuga con un resto adicional, tales como, por ejemplo, cefalosporina conjugada con aminotiofenol.

Otro ejemplo de este tipo de resistencia lo constituye VanX, una dipeptidasa que escinde D-Ala-D-Ala y cataliza la hidrólisis del dipéptido D-alanil-D-alanina utilizado normalmente en la biosíntesis del peptidoglicano natural. Las proteínas relacionadas con VanX están implicadas en la producción de una variante de peptidoglicano (D-alanina-D-lactato) que da como resultado la resistencia de las bacterias patógenas al antibiótico vancomicina. Se ha encontrado que la peptidasa D-ala-D-ala está contenida en el operón que codifica la resistencia a la vancomicina en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

Los enlazadores pueden ser también agentes de reticulación que son homo- o heterobifuncionales.

Muchos enlazadores reaccionan con una amina y un carboxilato, para formar una amida, o un alcohol y un carboxilato para formar un éster. Los enlazadores son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, M. Bodansky, "Principles of Peptide Synthesis", 2ª ed., al que se hace referencia en el presente documento, y T. Greene y P. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 2ª Ed., 1991, John Wiley, NY. Los enlazadores deben unir restos de componentes de forma estable, pero de tal manera que exista solo una mínima o ninguna desnaturalización o desactivación del fotosensibilizante u otro componente unido.

Las composiciones de fotosensibilizantes pueden prepararse uniendo los fotosensibilizantes entre sí o a otros componentes utilizando métodos conocidos en la técnica. Se pueden usar varios enlazadores, incluyendo agentes de reticulación, para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), ortofenilendimaleimida (o-PDM), y 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (Karpovsky *et al.* (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos por Paulus y Behring (1985) Ins. Mitt., 78:118-132; Brennan *et al.* (1985) Science 229:81-83 y Glennie *et al.*, (1987) J. Immunol, 139:2367-2375. Un gran número de enlazadores para péptidos y proteínas, junto con tampones, disolventes, y métodos de uso, se describen en el catálogo de Pierce Chemical Co., páginas T-155 a T-200, 1994 (3747 N. Meridian Rd., Rockford IL, 61105, EE.UU.; Pierce Europe B.V., P.O. Box 1512, 3260 BA Beijerland, Países Bajos), cuyo contenido se incorpora al presente documento por referencia.

DCC es un enlazador útil (Pierce n.º 20320; Rockland, IL). DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) es un reticulante reactivo con carboxi habitualmente utilizado como enlazador en la síntesis de péptidos. Otro agente de reticulación útil es SPDP (Pierce n.º 21557), un reticulador heterobifuncional para su uso con aminas primarias y grupos sulfhidrilo. SPDP produce una reticulación escindible de tal manera que, tras reacción adicional, el agente se elimina, de tal manera que el fotosensibilizador puede unirse directamente a una estructura principal o transportador molecular. Otros agentes de unión útiles son SATA (Pierce n.º 26102), para la introducción de grupos SH bloqueados para la reticulación en dos etapas (Pierce n.º 26103), y sulfo-SMCC (Pierce n.º 22322), reactivo hacia aminas y sulfhidrilos. Otros agentes de reticulación y acoplamiento están también disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Los agentes de unión útiles adicionales son las hidrazinas o los derivados de hidrazinas, compuestos que son muy solubles en agua y solubles en alcohol. Las hidrazinas son agentes reductores corrosivos y fuertes, aunque constituyen bases más débiles que el amoníaco. Las hidrazinas son dibásicas y forman muchas sales, por ejemplo, monoclorhidratos y diclorhidratos, mononitratos y dinitratos, y dos sulfatos. Se ha encontrado que la resina de hidrazina es una plataforma novedosa y muy útil para la síntesis de poliamidas. La resina de hidrazina es estable a temperaturas de acoplamiento elevadas, además se escinde rápidamente a temperaturas moderadas por una amplia gama de nucleófilos tras un protocolo de oxidación suave y selectiva.

Se divulgan compuestos y procesos adicionales, particularmente aquellos que implican una base de Schiff como un intermedio, para la conjugación de proteínas con otras proteínas o con otras composiciones, por ejemplo, a grupos indicadores o a quelantes para el marcado de iones metálicos de una proteína, en el documento EP 243.929 A2

(publicado el 4 de nov. de 1987).

Los fotosensibilizantes que contienen grupos carboxilo pueden unirse a grupo lisina α -amino en polipéptidos diana tanto mediante ésteres reactivos preformados (tales como éster de N-hidroxi succinimida) como ésteres conjugados *in situ* mediante una reacción mediada por carbodiimida. Se aplica lo mismo a los fotosensibilizantes que contienen grupos de ácido sulfónico, que se pueden transformar en cloruros de sulfonilo, que reaccionan con grupos amino. Los fotosensibilizantes que tienen grupos carboxilo pueden unirse a grupos amino en el polipéptido mediante un método de la carbodiimida *in situ* o mediante hidrazina o derivados de hidrazina. Los fotosensibilizantes pueden también unirse a grupos hidroxilo, de restos de serina o treonina o a grupos sulfhidrilo, de restos de serina o treonina o a grupos sulfhidrilo de restos de cisteína.

Los métodos de unir componentes de una composición pueden utilizar reactivos de reticulación bifuncionales. Estos agentes se unen a un grupo funcional en una cadena y a diferentes grupos funcionales en una segunda cadena. Estos grupos funcionales son normalmente amino, carboxilo, sulfhidrilo, y aldehído. Existen muchas permutaciones de restos adecuados que reaccionarán con estos grupos y con estructuras formuladas de forma diferente, para unirlos juntos (se describe en el Pierce Catalog and Merrifield *et al.* (1994) Ciba Found Symp. 186:5-20).

En general, se pueden preparar las composiciones fotosensibilizantes uniendo el fotosensibilizante con otro fotosensibilizante, un aglutinante, un resto director, y/o una estructura principal utilizando los métodos descritos en los siguientes Ejemplos o por los métodos conocidos en la técnica. Se puede usar varios enlazadores para la conjugación covalente.

Se puede evaluar el rendimiento de las reacciones de unión mediante la espectroscopía del producto eluyendo a partir de un fraccionamiento cromatográfico en la etapa final de purificación utilizando métodos conocidos. La presencia de fotosensibilizantes y productos de reacción sin unir que contienen el fotosensibilizante puede ser seguida por la propiedad física de que el fotosensibilizante absorbe luz a una longitud de onda característica y el coeficiente de extinción, de tal manera que puede controlarse la incorporación en productos mediante la absorbancia a esta longitud de onda o a una longitud de onda similar. La unión de una o más moléculas de fotosensibilizante con otro fotosensibilizante, un aglutinante, un resto director o una estructura principal, desplaza el pico de absorbancia en el perfil de elución en fracciones eluidas utilizando la cromatografía de extrusión molecular, por ejemplo, con la elección adecuada de Sephadex G50, G100, o G200 u otras de las mencionadas matrices (Pharmacia-Biotech, Piscataway N.J.). La elección del gel de extrusión adecuado, por ejemplo, gel Sephadex, puede determinarse por este gel en el que el fotosensibilizante se eluye en una fracción más allá del volumen excluido de material demasiado grande para interactuar con la perla, es decir, la composición fotosensibilizante de partida sin acoplar interactúa en alguna extensión con la perla de fraccionamiento y se retarda simultáneamente en alguna extensión.

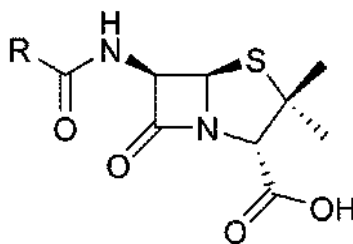
Determinar qué gel usar puede predecirse a partir del peso molecular del fotosensibilizante sin acoplar. Los productos de reacción satisfactorios de las composiciones fotosensibilizantes acoplados a restos adicionales tienen generalmente pesos moleculares superiores característicos, haciendo que interactúen con la perla cromatográfica en una menor extensión, y por tanto aparecen en fracciones que eluyen más pronto que las fracciones que contienen el sustrato fotosensibilizante sin acoplar. El sustrato fotosensibilizante sin reaccionar aparece generalmente en fracciones características del material de partida, y puede por tanto evaluarse el rendimiento de cada reacción a partir del tamaño del pico del material de peso molecular más grande, y la disminución en el pico del material de partida característico. El área bajo el pico de las fracciones de producto se convierte en la cantidad de rendimiento utilizando el coeficiente de extinción molar.

El producto puede analizarse utilizando RMN, integrando áreas de picos de producto adecuados, para determinar los rendimientos relativos con diferentes enlazadores. Se ha observado a menudo un desplazamiento al rojo en la absorción de un fotosensibilizante de algunos nm tras el acoplamiento con un poliaminoácido. La unión con un resto más grande, tal como una proteína puede producir un desplazamiento comparable, dado que la unión a un anticuerpo dio como resultado un cambio de aproximadamente 3-5 nm en esta dirección en comparación con la absorción del fotosensibilizante libre. La absorción máxima y los coeficientes de extinción relevantes en NaOH 0,1 M/SDS al 1 % son, para la clorina *e6*, 400 nm y $150.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y para el derivado de benzoporfirina, 430 nm y $61.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

El enlazador (L) puede comprender al menos un resto de anillo de beta-lactama o un fragmento o derivado del mismo que forma un sitio escindible por la beta-lactamasa.

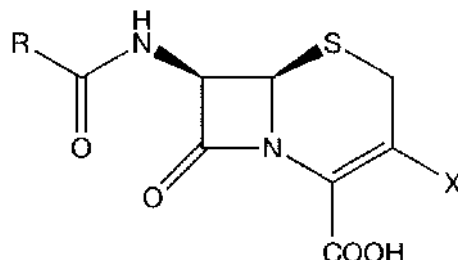
En aspectos particulares, el enlazador (L) comprende un antibiótico de beta-lactama, o un derivado o fragmento funcional del mismo que es escindible por una enzima beta-lactamasa o un fragmento de la misma. El antibiótico de beta lactama (o el derivado o fragmento funcional del mismo) puede ser cualquier antibiótico de beta-lactama que se obtiene de cualquier fuente natural, comercial o sintética.

En un aspecto, el enlazador (L) comprende una penicilina o un fragmento de la misma que tiene la estructura nuclear conocida general:



y que se selecciona entre: una penicilina de espectro estrecho, tales como, penicilina benzatina, bencilpenicilina (penicilina G), fenoximetilpenicilina (penicilina V), penicilina procaína, y oxacilina; una penicilina resistente a penicilinasas de espectro estrecho, tales como, meticilina, dicloxacilina, y flucloxacilina; una penicilina resistente a beta-lactamasa de espectro estrecho, tales como, temocilina; una penicilina de espectro moderado, tales como, amoxicilina y ampicilina; una penicilina de espectro amplio, tales como, co-amoxiclav; y una penicilina de espectro extendido, tales como, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, azlocilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina y piperacilina, o cualquier fragmento o derivado de una penicilina, y en el que R corresponde a los diferentes restos de las penicilinas anteriormente indicadas.

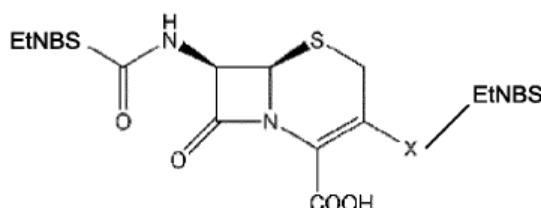
En otro aspecto, el enlazador (L) comprende una cefalosporina que tiene la estructura nuclear general conocida:



y que se selecciona entre: una cefalosporina de primera generación, tales como, Cefacetilo (cefacetilo), Cefadroxilo (cefadroxilo; Duricef®), Cefalexina (cefalexina; Keflex®), Cefaloglicina, Cefalonio (cefalonio), Cefaloridina (cefaloradina), Cefalotina (cefalotina; Keflin®), Cefapirina (cefapirina; Cefadryl®), Cefatrizina, Cefazaflur, Cefazedona, Cefazolina (cefazolina; Ancef®, Kefzol®), Cefradina (cefradina; Velosef®), Cefroxadina, Ceftezol; una cefalosporina de segunda generación, tales como, Cefaclor (por ejemplo, Ceclor®, Distaclor®, Keflor®, Raniclur®), Cefonicid (por ejemplo, Monocid®), Cefprozilo (por ejemplo, cefprozilo; Cefzil®), Cefuroxima (por ejemplo, Zinnat®, Zinacef®, Cefin®, Biofuroksym®), Cefuzonam, Cefmetazol, Cefotetan, Cefoxitina, Carbacefemos (por ejemplo, loracarbef (Lorabid®)), Cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol (Zefazone®), cefminox, cefotetan (Cefotan®), cefoxitina (Mefoxin®)); una cefamicina de segunda generación, tales como, cefotetan o cefoxitina; una cefalosporina de tercera generación, tales como, Cefcapeno, Cefdaloxima, Cefdinir (Omnicef®), Cefditoreno, Cefetamet, Cefixima (Suprax®), Cefmenoxima, Cefodizima, Cefotaxima (Claforan®), Cefpimizol, Cefpodoxima (Vantin®, PECEF), Cefteteram, Ceftibuteno (Cedax), Ceftiofur, Ceftioleño, Ceftizoxima (Ceftizax®), Ceftriaxona (Rocephin®), Cefoperazona (Cefobid), Ceftazidima (Fortum®, Fortaz®), u Oxacefemos (por ejemplo, latamoxef); una cefalosporina de cuarta generación, tales como, cefepima (Maxipime®), cefclidina, cefluprenam, cefoselis, cefozoprano, cefpiroma, o cefquinoma, o cefpiroma, o cualquier fragmento o derivado de una cefalosporina, en el que el R y el X corresponden a diferentes restos de las cefalosporinas anteriormente indicadas.

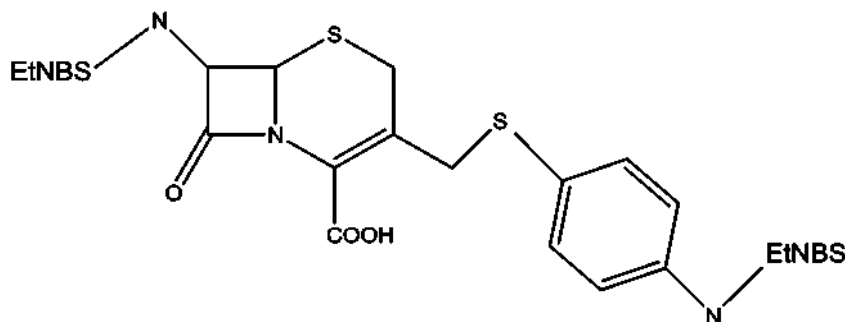
En otro aspecto, el enlazador (L) puede ser un carbapenemo, tales como, imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem, o doripenem, o cualquier fragmento o derivado de un carbapenemo.

En un aspecto particular, el enlazador (L) de la invención comprende una cefalosporina, o un fragmento o derivado de la misma. Las composiciones fotosensibilizantes pueden comprender un enlazador de cefalosporina (o un fragmento y/o derivado o derivado del mismo) que se acopla a dos fotosensibilizadores de acuerdo con la siguiente estructura:



en el que X puede ser un sustituyente de cefalosporina conocido o un derivado del mismo, y en el que EtNBS es cloruro de benzofenotiazinio.

En otra realización particular, se proporciona una composición fotosensibilizante, que comprende un enlazador de cefalosporina (o un fragmento y/o derivado del mismo) que se acopla a dos fotosensibilizantes de cloruro de benzofenotiazinio (EtNBS) de acuerdo con la siguientes estructura:



El enlazador de cefalosporina puede ser cualquier cefalosporina conocida en la técnica, tal como las relacionadas anteriormente, o cualquier derivado funcional o fragmento de la misma. Una persona normalmente experta en la materia apreciará que existen numerosos métodos y estrategias químicas conocidas para preparar y obtener fragmentos y derivados de cefalosporinas, algunos de los cuales se divulgan en las patentes de Estados Unidos números 6.599.893 (de Glinka), 6.093.712 (de Matiskella), 5.827.845 (de Shiokawa et al.) y 6.329.363 (de Dahnke), cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia.

Las combinaciones específicas de enlazador y fotosensibilizante incluyen, aunque no de forma limitativa cefalosporina con dos fotosensibilizantes EtNBS; cefalosporina con EtNBS y un inactivador de agujeros negros (por ejemplo, tal como BHQ-3); cefalosporina con Cy3 y Cy5; cefalosporina con Cy5 y un inactivador de agujeros negros; y cefalosporina con verde Oregón y rojo Texas.

Esta combinación específica de fotosensibilizante y enlazador puede prepararse fácilmente por un experto en la materia de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Aglutinantes

Las composiciones fotosensibilizantes pueden incluir uno o más aglutinantes. El aglutinante, sin limitación, puede ser un péptido, un péptido cíclico, un polipéptido, un peptidomimético, una proteína, una proteína de fusión, una molécula híbrida, otro fotosensibilizante o un dímero, multímero, o un conjugado de los anteriores que se une o inactiva y, por lo tanto, puede inhibir, suprimir, neutralizar, o disminuir la actividad del, fotosensibilizante. El aglutinante puede incluir también, sin limitación, un inhibidor que se produce naturalmente, un receptor, un receptor soluble, un anticuerpo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monocatenario, anticuerpos antiidiotípicos, un peptacuerpo, un péptido, unos oligopéptidos, un oligonucleótido, un péptido cíclico (es decir, un péptido que es circular en la naturaleza), un conjugado de péptido-lípido, una hormona, un antígeno, un epítipo, un receptor, una quimiocina, un ácido nucleico, un ligando o un dímero, multímero, o un conjugado de los anteriores. Los aglutinantes que se producen naturalmente son aglutinantes que inactivan el fotosensibilizante y se encuentran en la naturaleza.

En un aspecto, el aglutinante comprende un fluoróforo. La propiedad que vuelve a un fluoróforo (o cualquier otro aglutinante) un inactivador adecuado es la capacidad de absorber energía del fotosensibilizante activado o activable.

Los fluoróforos pueden ser cualquiera conocido en la técnica, incluyendo fotosensibilizantes, colorantes fluorescentes, y colorantes fotoactivos.

Los aglutinantes fotosensibilizantes pueden ser cualquiera conocido en la técnica, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, se han usado derivados de hematoporfirina como sondas fluorescentes para investigar el desarrollo de placas ateroscleróticas humanas (Spokojny (1986) J. Am. Coll. Cardiol. 8:1387-1392). Un fotosensibilizante que actúa como un aglutinante puede tener una longitud de onda de excitación diferente que un fotosensibilizante que actúa para producir un efecto citotóxico sobre un patógeno o célula hospedadora infectada con un patógeno.

Los colorantes fluorescentes, que se pueden usar como fotosensibilizantes o aglutinantes, pueden ser cualquiera conocido en la técnica, incluyendo, aunque no de forma limitativa 6-carboxi-4',5'-dicloro-2', éster de 7'-dimetoxifluoresceína succinimidilo; 5-(y -6)-carboxieosina; 5-carboxifluoresceína; 6-carboxifluoresceína; 5-(y -6)-carboxifluoresceína; éter de 5-carboxifluoresceína-bis-(5-carboximetoxi-2-nitrobenzilo), -alanina-carboxamida, o éster de succinimidilo; éster de 5-carboxifluoresceína succinimidilo; éster de 6-carboxifluoresceína succinimidilo; éster de 5-

(y -6)-carboxifluoresceína succinimidilo; 5-(4,6-diclorotriazinil) aminofluoresceína; 2',7'-difluorofluoresceína; eosin-5-isotiocianato; eritrosin-5-isotiocianato; ácido 6-(fluorescein-5-carboxamido) hexanoico o éster de succinimidilo; ácido 6-(fluorescein-5-(y -6)-carboxamido) hexanoico o éster de succinimidilo; éster de fluorescein-5-EX succinimidilo; fluorescein-5-isotiocianato; fluorescein-6-isotiocianato; ácido carboxílico Oregon Green® 488, o éster de succinimidilo; isotiocianato de Oregon Green® 488; éster de succinimidilo Oregon Green® 488-X; ácido carboxílico Oregon Green® 500; ácido carboxílico Oregon Green® 500, éster de succinimidilo o sal de trietilamonio; ácido carboxílico Oregon Green® 514; ácido carboxílico Oregon Green® 514 o éster de succinimidilo; ácido carboxílico Rhodamine Green™, éster o clorhidrato de succinimidilo; ácido carboxílico Rhodamine Green™, trifluoroacetamida o éster de succinimidilo; éster o clorhidrato de succinimidilo Rhodamine Green™-X; ácido carboxílico Rhodol Green™, N,O-bis-(trifluoroacetil) o éster de succinimidilo; bis-(4-carboxipiperidinil) sulfonarodamina o éster de di(succinimidilo); 5-(y -6)-carboxinaftofluoresceína, éster de 5-(y -6)-carboxinaftofluorescein succinimidilo; clorhidrato de 5-carboxirrodamina 6G; clorhidrato de 6-carboxirrodamina 6G, éster de 5-carboxirrodamina 6G succinimidilo; éster de 6-carboxirrodamina 6G succinimidilo; éster de 5 (y 6)-carboxirrodamina 6G succinimidilo; ésteres de 5-carboxi-2',4',5',7'-tetrabromosulfonafluorescein succinimidilo o sal de bis-(di-isopropiletilamonio); 5-carboxitetrametilrodamina; 6-carboxitetrametilrodamina; 5-(y-6)-carboxitetrametilrodamina; éster de 5-carboxitetrametilrodamina succinimidilo; éster de 6-carboxitetrametilrodamina succinimidilo; éster de 5-(y -6)-carboxitetrametilrodamina succinimidilo; 6-carboxi-X-rodamina; éster de 5-carboxi-X-rodamina succinimidilo; éster de 6-carboxi-X-rodamina succinimidilo; éster de 5-(y -6)-carboxi-X-rodamina succinimidilo; sal de 5-carboxi-X-rodamina trietilamonio; cloruro de sulfonil rodamina B Lissamine™; isotiocianato de verde malaquita; mono(éster de sulfosuccinimidilo) NANOGOLD®; ácido carboxílico QSY® 21 o éster de succinimidilo; ácido carboxílico QSY® 7 o éster de succinimidilo; éster de succinimidilo Rhodamine Red™-X; éster de succinimidilo del ácido 6-(fluorescein-5-(y -6)-carboxamido)hexanoico; tetrametilrodamina-5-isotiocianato; tetrametilrodamina-6-isotiocianato; tetrametilrodamina-5-(y 6)-isotiocianato; sulfonil Texas Red®; cloruro de sulfonil Texas Red®; éster o sal de sodio de Texas Red®-XSTP; éster de succinimidilo Texas Red®-X; éster de succinimidilo Texas Red®-X; o X-rodamina-5-(y -6)-isotiocianato.

Los colorantes fluorescentes pueden incluir también, por ejemplo, colorantes bodipy comercialmente disponibles Molecular Probes, incluyendo, aunque no de forma limitativa BODIPY® FL; éster de BODIPY® TMR STP; éster de BODIPY® TR-X STP; éster de BODIPY® 630/650-X STP; éster de BODIPY® 650/665-X STP; éster de succinimidilo del ácido 6-dibromo-4,4-difluoro-5, 7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3- propiónico; ácido 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3,5-dipropiónico; ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-pentanoico; éster de succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-pentanoico; ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico; éster de succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico; éster de sulfosuccinimidilo o sal sódica del ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico; 6-((4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propionil)amino)hexanoico; ácido 6-((4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propionil)amino)hexanoico o éster de succinimidilo; ácido N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propionil)cisteico, éster de succinimidilo o sal de trietilamonio; ácido 6-4,4-difluoro-1,3-dimetil-5-(4-metoxifenil)-4-bora-3a,4a 4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico; éster de succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico; éster de succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5-fenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico; ácido 6-((4,4-difluoro-5-fenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propionil)amino)hexanoico o éster de succinimidilo; éster de succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico; éster de succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5-(2-pirrolil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico; ácido 6-(((4,4-difluoro-5-(2-pirrolil) -4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il)estiriloxi)acetil)amino)hexanoico o éster de succinimidilo; ácido 4,4-difluoro-5-estiril-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico; éster de succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5-estiril-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico; ácido 4,4-difluoro-1,3,5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-8-propiónico; éster de succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-8-propiónico; éster de succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5-(2-tienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico; ácido 6-(((4,4-difluoro-5-(2-tienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il)fenoxi)acetil)amino)hexanoico o éster de succinimidilo; y ácido 6-(((4,4-difluoro-5-(2-tienil) -4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il)estiriloxi)acetil)amino)hexanoico o éster de succinimidilo.

Los colorantes fluorescentes pueden ser también, por ejemplo, colorantes alexa fluor comercialmente disponibles de Molecular Probes, incluyendo, aunque no de forma limitativa ácido carboxílico Alexa Fluor® 350; ácido carboxílico Alexa Fluor® 430; ácido carboxílico Alexa Fluor® 488; ácido carboxílico Alexa Fluor® 532; ácido carboxílico Alexa Fluor® 546; ácido carboxílico Alexa Fluor® 555; ácido carboxílico Alexa Fluor® 568; ácido carboxílico Alexa Fluor® 594; ácido carboxílico Alexa Fluor® 633; ácido carboxílico Alexa Fluor® 647; ácido carboxílico Alexa Fluor® 660; o ácido carboxílico Alexa Fluor® 680.

Los colorantes fluorescentes pueden ser también, por ejemplo, los colorantes cy comercialmente disponibles de Amersham-Pharmacia Biotech, incluyendo, aunque no de forma limitativa éster de Cy3 NHS; éster de Cy 5 NHS; éster de Cy5.5 NHS; y éster de Cy 7 NHS.

Los colorantes fotoactivos, que se pueden usar también como aglutinantes o fotosensibilizantes, puede ser cualquier fotosensibilizante conocido en la técnica que emita fluorescencia pero que no produzca necesariamente una especie reactiva en cantidades fototóxicas cuando se ilumina. Dependiendo de la longitud de onda y de la intensidad de la luz administrada, se puede activar un fotosensibilizante para emitir fluorescencia, por lo tanto, actúa como un colorante

fotoactivo, pero no produce un efecto fototóxico salvo que, en algunos casos, la longitud de la luz y la intensidad de la luz se adapten de forma adecuada para inducir un efecto fototóxico.

En toda esta especificación, cualquier referencia a un aglutinante debe interpretarse para referirse a cada uno de los aglutinantes identificados y contemplados en el presente documento y a cada molécula biológicamente equivalente. "Biológicamente equivalente" significa composiciones que son capaces de prevenir la acción del fotosensibilizante de una manera similar, pero no necesariamente en el mismo grado.

Restos directores

Se contempla también que las composiciones fotosensibilizantes se acoplen a uno o más restos directores, lo cual aumenta la especificidad de la composición fotosensibilizante por su diana, y se puede usar para varios fines, incluyendo, por ejemplo, dirigir la composición fotosensibilizante para alcanzar una proximidad más cercana a las células o enzimas diana (por ejemplo, beta-lactamasa) que son de interés para evaluarse o medirse. Los restos directores incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, péptidos y hormonas. En un aspecto de la invención, el resto director puede ser un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido humano tal como polilisina o albúmina sérica). Como alternativa, el resto director puede ser un péptido antimicrobiano pequeño (SAMP) (es decir, un péptido que contiene menos de 60 restos de aminoácidos), tales como, por ejemplo, histatinas, defensinas, cecropinas, magaininas, bacteriocinas Gram positivas, y antibióticos peptídicos. Muchos SAMP están en el intervalo de 20-40 restos de aminoácidos de longitud. Los SAMP son péptidos que se producen naturalmente, y están hechos de una amplia variedad de organismos. Muchos SAMP tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, y, por ejemplo, pueden destruir más de una especie, y, en algunos casos, destruir de forma distante especies relacionadas, por ejemplo, especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

El resto director puede unirse a una población definida de células. En diversos aspectos, puede unirse a un receptor, un oligonucleótido, un sustrato enzimático, un determinante antigénico, u otro sitio de unión presente sobre o en la población de células diana. En consecuencia, el resto director puede ser una molécula o una estructura macromolecular que se dirige a células específicas, por ejemplo, macrófagos, o que interactúa con un patógeno. Algunos fotosensibilizantes se dirigen a macrófagos directamente (véase, por ejemplo, Korbek *et al.*, Cancer Res. 51:2251-2255, 1991).

Los restos, ya sea solos o cuando se incorporan en un conjugado, como en una estructura supramolecular (por ejemplo, un liposoma, una micela, una vesícula lipídica, o similares), se pueden utilizar para dirigirse específicamente a macrófagos mediante determinados receptores. Por tanto, se puede usar un ligando para dichos receptores como un resto director. Por ejemplo, se pueden usar los siguientes receptores para dirigirse a macrófagos: el receptor del complemento (Rieu *et al.*, J. Cell Biol. 127:2081-2091, 1994), el receptor secuestrante (Brasseur *et al.*, Photochem. Photobiol. 69:345-352, 1999; Suzuki *et al.*, Nature 386:292-296, 1997; Sarkar *et al.*, Mol. Cell. Biochem. 156:109-116, 1996), el receptor de la transferrina (Dreier *et al.*, Bioconjug. Chem. 9:482-489, 1998; Hamblin *et al.*, J. Photochem. Photobiol. 26:4556, 1994; Clemens *et al.*, J. Exp. Med. 184:1349-1355, 1996), el receptor de Fc (Dreier *et al.*, Bioconjug. Chem. 11:1731-1733, 1994; Hamblin *et al.*, Pharm Res. 11:1110-4, 1994). El receptor de la manosa es particularmente importante para el reconocimiento de macrófagos del material extraño y se ha usado satisfactoriamente para dirigir moléculas a macrófagos (Frankel *et al.*, Carbohydr. Res. 300:251-258, 1997; Chakrabarty *et al.*, J. Protozool. 37:358-364, 1990; Mistry *et al.*, Lancet 348:1555-1559, 1996; Liang *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1279:227-234, 1996; Sarkar *et al.*, Mol. Cell Biochem. 156:109-116, 1996). Los receptores toll o de tipo toll están también presentes sobre los macrófagos y son dianas útiles (Brightbill *et al.*, Science 285:732-736, 1999).

Las composiciones fotosensibilizantes pueden comprender restos directores que dirigen los primeros a los macrófagos. Dichos restos directores pueden incluir lipoproteínas de baja densidad (Mankertz *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 240:112-115, 1997; von Baeyer *et al.*, Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 31:382-386, 1993), lipoproteínas de muy baja densidad (Tabas *et al.*, J. Cell Biol. 115:1547-1560, 1991), restos de manosa (como se ha mencionado anteriormente) y otros restos de hidratos de carbohidratos (Pittet *et al.*, Nucl. Med. Biol. 22:355-365, 1995), moléculas policatiónicas (por ejemplo, poli-lisina; Hamblin *et al.*, J. Photochem. Photobiol. 26:45-56, 1994), emulsiones (Khopade *et al.*, Pharmazie 51:558-562, 1996), albúmina agregada (Hamblin *et al.*, J. Photochem. Photobiol. 26:45-56, 1994), microesferas biodegradables (Oettinger *et al.*, J. Interferon Cytokine Res. 19:33-40, 1999), microesferas no biodegradables (Schroder, Methods Enzymol 112:116-128, 1985), nanopartículas (Lobenberg *et al.*, AIDS Res. Hum. Retroviruses 12:1709-1715, 1996); Venier-Julienne *et al.*, J. Drug Target. 3:23-29, 1995; Schafer *et al.*, J. Microencapsul. 11:261-269, 1994; Gaspar *et al.*, Ann. Trop. Med. Parasitol 86:41-49, 1992), liposomas (Bakker-Woudenberg *et al.*, J. Drug Target. 2:363-371, 1994; Meyers *et al.*, Exp. Lung Res. 19:1-19, 1993; Betageri *et al.*, J. Pharm. Pharmacol. 45:48-53, 1993; Muller *et al.*, Biochim. Biophys. Acta. 986:97-105, 1989; Kole *et al.*, J. Infect. Dis. 180:811-820, 1999), citoquinas específicas de macrófagos (Biragyn *et al.*, Nat. Biotechnol. 17:253-258, 1999; Chan *et al.*, Blood 86:2732-2740, 1995), enterocitos (Magnani *et al.*, J. Leukoc. Biol. 185:717-730, 1997), anticuerpos que reconocen componentes del fagosoma tuberculoso de tipo Nrampl (Gruenheid *et al.*, J. Exp. Med. 185:717-730, 1997), una 2-macroglobulina (Chu *et al.*, J. Immunol. 152:1538-1545, 1994).

Un resto director puede dirigirse a un patógeno. Además, determinadas características estructurales de las enzimas pueden dirigirse, tales como el bolsillo hidrófobo de la enzima inhA del *Mycobacterium tuberculosis* (Dessen, *et al.*

(1995) Science 267:1638-1641). Como alternativa, las moléculas hospedadoras que se dirigen a las bacterias, tales como los péptidos antimicrobianos (por ejemplo, granulicina), se pueden usar en composiciones fotosensibilizantes (Stenger *et al.* Science 282:121-125, 1998).

5 Se puede usar un resto director solo o en combinación, particularmente para dirigirse a los macrófagos y al patógeno intracelular. Las manipulaciones de la célula hospedadora pueden también complementar el fotosensibilizante (Collins *et al.*, J. Cell Sci. 110:191-200, 1997; Korbek *et al.*, Br. J. Cancer 75:202-207, 1997; Kros *et al.*, Cancer Res. 56:3281-3286, 1996).

10 El resto director puede ser un polipéptido. El polipéptido puede ser lineal, ramificado o cíclico. El resto director puede incluir un polipéptido que tenga una afinidad por una diana de polisacárido, por ejemplo, una lectina (como de una semilla, judía, raíz, corteza, algas marinas, fúngicas, bacteriana, o lectina de invertebrado). Las lectinas particularmente útiles incluyen concanavalina A, que se obtiene de los frijoles blancos, y las lectinas obtenidas de las lentejas, Lens culinaris.

15 Las características deseables para los restos directores incluyen: especificidad por uno o más organismos diana no deseados o componentes de los mismos (por ejemplo, receptores de la superficie celular), afinidad y aidez por dichos organismos, y estabilidad con respecto a las condiciones de las reacciones de acoplamiento y la fisiología del órgano o tejido de uso. La especificidad no necesita definirse estrechamente, por ejemplo, puede ser deseable para una molécula directora tener afinidad por una amplia gama de organismos diana, tal como todas las bacterias Gram negativas. El resto director, que se incorpora en una composición, debe ser no tóxico para las células del sujeto.

20 Los restos directores pueden seleccionarse a partir de las secuencias de las proteínas y péptidos que se producen naturalmente, a partir de variantes de estos péptidos, y de péptidos sintetizados biológica o químicamente. Los péptidos que se producen naturalmente que tienen afinidad por uno o más organismos diana pueden proporcionar secuencias a partir de las cuales se pueden sintetizar péptidos adicionales con las propiedades deseadas, por ejemplo, afinidad o especificidad aumentadas, individualmente o como miembros de una biblioteca de péptidos relacionados. Se pueden seleccionar dichos péptidos basándose en la afinidad por el organismo diana.

30 Los péptidos que se producen naturalmente con afinidad por organismos diana útiles en los métodos de la invención incluyen, aptámeros, proteínas salivales, por ejemplo, histatinas, proteínas elaboradas por vía microbiana, por ejemplo, bacteriocinas, péptidos que se unen y/o destruyen especies que están estrechamente relacionadas con las cepas productoras; y proteínas producidas por especies animales, tales como defensinas, que se producen por mamíferos, y las cecropinas y magaininas, producidas por polillas y anfibios, respectivamente.

35 Como se ha mencionado de forma breve anteriormente, histatinas, defensinas, cecropinas y magaininas son ejemplos de una clase de polipéptidos que se encuentran ampliamente en la naturaleza, que comparten las características de tamaño pequeño (en general, aproximadamente 30 restos de aminoácidos y entre 10 restos y 50 restos), amplia especificidad de la actividad antimicrobiana, y baja afinidad por organismos diana.

40 Las histatinas son una familia de polipéptidos catiónicos ricos en histidina que tienen propiedades bactericidas y candidicidas y son constituyentes de la saliva humana normal (Oppenheim, G. G. *et al.*, J. Biol. Chem. 263:7472-747, 1988). Se cree que su mecanismo de acción implica una combinación de conformación en alfa hélice y una carga catiónica que los conduce a insertarse entre los grupos de cabeza polares en la pared de la célula bacteriana (Raj, P. A. *et al.*, J. Biol. Chem. 269:9610-9619, 1994).

50 Las bacteriocinas, que son proteínas producidas por las bacterias y que destruyen otras cepas y especies de bacterias (Jack, R. W. *et al.*, Microbiol. Rev. 59:171-200, 1995) se pueden usar como restos directores. Una bacteriocina Gram positiva ilustrativa es nisina, producida por *Lactococcus lactis* y que tiene estatus GRAS (generalmente considerada como segura) según la Food and Drug Administration para su aplicación a la conservación de alimentos.

Las bacteriocinas, nisina, subtilina, epidermina, galidermina, salivarina, y lacticina ilustran la clase "lantibiótica" de bacteriocinas Gram positivas, que se define como aquellas bacteriocinas en las que uno o más restos de cisteína están unidos a una serina o treonina deshidratada para formar un resto unido a tioéter conocido como lantionina (Lan) o tre-β-metilantionina (MeLan). (MeLan). Estas son modificaciones posteriores a la traducción que se encuentran en estos péptidos antimicrobianos por la célula productora. Los lantibióticos contienen secuencias peptídicas líder de 18-24 restos, que se escinden para dar como resultado un péptido antimicrobiano activo de aproximadamente 22-35 restos. El crecimiento de especies bacterianas productoras, y la preparación y purificación de bacteriocinas se lleva a cabo mediante procedimientos y técnicas publicadas que se pueden llevar a cabo por un experto en la materia. Por ejemplo, Yang, R. *et al.*, Appl. and Env. Microbiol. 58: 3355-3359, 1992, describe la purificación de bacteriocinas a partir de cada uno de 4 géneros de bacterias acidolácticas, optimizando la absorción sobre las células productoras, seguido por el uso de un pH bajo para la elución selectiva de fracciones muy enriquecidas en bacteriocinas. Las formas mutantes de cada una de las bacteriocinas, nisina, producida por *Lactococcus lactis*, y subtilina, producida por *Bacillus subtilis* tienen propiedades más deseables que las formas naturales precursoras (Liu, W. y N. Hansen, J. Biol. Chem. 267:25.078-25.085, 1992). Los procedimientos para el aislamiento de los genes adecuados y para la mutagénesis y selección de cepas que transportan mutaciones deseables se encuentran en Maniatis, T. *et al.*, 1982, Molecular

Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y en la segunda edición posterior, Sambrook, J. *et al.*, 1989.

Los péptidos antimicrobianos se producen por varios animales (Saberwal, G. y R. Nagaraj, Biochim. Biophys. Act. 1197:109-131, 1994). Un ejemplo es un péptido de la familia cecropina producido por polillas *Cecropia*. Algunas cecropinas contienen 37 restos, de los cuales 6 son lisina. Las cecropinas son activas contra bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Otros péptidos producidos por insectos incluyen apidaecina (procedente de abejas melíferas), andropina (procedente de moscas de la fruta), y miembros de la familia cecropina de abejorros, moscas de la fruta, y otros insectos.

Las defensinas se producen por mamíferos, incluyendo seres humanos, y tienen generalmente aproximadamente 29-34 restos de longitud, y las magaininas (aproximadamente 23 restos) se producen por anfibios tales como *Xenopus laevis*. Las defensinas de ser humano (HNP-1,-2,-3 y 4), cobaya (GPNP), conejo (NP-1, -2, -3A, -3B, -4 y -5) y rata (NP-1, -2, -3 y -4) comparten un número significativo de regiones de homología. Las defensinas pueden tener actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram positivas o Gram negativas y hongos, con concentraciones inhibitoras mínimas en el intervalo mM. NP-1 y NP-2 de conejo son agentes antibacterianos más potentes que otros en esta familia. Otros péptidos antimicrobianos de mamíferos incluyen criptidina de murino, bactenecina e indolicidina de granulocitos de bovino, y plasma seminal de semen de bovino. Los antimicrobianos de anfibios adicionales incluyen PGLA, XPF, LPF, CPG, PGQ, bombinina de *Bombina variegata*, péptidos BLP-1 similares a bombinina, -2, -3 y -4 de *B. orientalis*, y brevininas de *Rana esculenta*. Invertebrados tales como el cangrejo de herradura pueden ser una fuente de péptidos antimicrobianos tales como las taquilepsinas (I, II III) y las polifemusinas (I y II).

Los péptidos en estas familias de agentes antimicrobianos son generalmente catiónicos, y pueden tener un amplio espectro antimicrobiano, incluyendo actividades antibacterianas y antifúngicas. La adición de restos cargados positivamente puede potenciar la actividad específica antimicrobiana varias veces. Se cree que las cargas positivas ayudan en la inserción de los péptidos en las membranas de los organismos susceptibles, en cuyo contexto, las moléculas peptídicas pueden formar poros y producir la salida de iones y otros metabolitos. Los estudios estructurales en el resto peptídico 33 de la neurotoxina pardaxina del lenguado de Moisés, por ejemplo, desvelan que la pardaxina succinilada se inserta en las membranas de los eritrocitos y del modelo más lentamente que la pardaxina sin modificar. (Shaipor *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 20, 202-20, 209, 1990). La molécula de magainina cargada positivamente puede tanto alterar el metabolismo de *E. coli* como el potencial eléctrico de las mitocondrias (Westerhoff, H. V., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:6597-6601, 1989).

Novedosos péptidos, por ejemplo, un híbrido de cecropina-melitina, y denantiómeros sintéticos, tienen actividad antimicrobiana (Merrifield, R. B. *et al.*, "Antimicrobial peptides," Ciba Foundation Symp. 186, John Wiley, Chichester, págs. 5-26, 1994). Un de dichos péptidos de cecropina-melitina sintéticos es 5 veces más activo contra *Mycobacterium smegmatis* que rifampina.

Los restos directores pueden ser proteínas vegetales con afinidades por organismos diana concretos, por ejemplo, un miembro de la familia de las proteínas lectinas con afinidad por polisacáridos. Los restos directores pueden ser péptidos sintéticos, tales como polilisina, poliarginina, poliornitina, y heteropolipéptidos sintéticos que comprenden proporciones sustanciales de dichos restos de aminoácidos cargados positivamente. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente o producirse biológicamente en organismos recombinantes, en cuyo caso, el péptido del resto director puede producirse como parte de una proteína más grande, por ejemplo, como restos del extremo N, y escindirse a partir de esta proteína más grande. Los polipéptidos adecuados como restos de la "estructura principal" son también adecuados como restos diana, si tienen suficiente afinidad por el organismo diana. Las consideraciones descritas son por tanto adecuadas para la consideración general de unos restos directores.

Los restos directores no necesitan limitarse a las composiciones peptídicas, pero pueden ser lectinas, polisacáridos, esteroides, y composiciones metaloorgánicas. Los restos directores pueden estar comprendidos de composiciones que están compuestas de aminoácidos y azúcares, tales como mucopolisacáridos. un resto director útil puede ser parcialmente lípido y parcialmente péptido en la naturaleza, tal como lipoproteínas de baja densidad. Las lipoproteínas séricas, especialmente las lipoproteínas de alta densidad y baja densidad (HDL y LDL) pueden unirse a proteínas de la superficie bacteriana (Emancipator, K. *et al.*, Infect. Immun. 60:596-601, 1992). HDL, y especialmente HDL reconstituida, neutraliza el lipopolisacárido bacteriano tanto *in vitro* como *in vivo* (Wurfel MM *et al.*, J. Exp. Med. 181:1743--1754, 1995). El LDL endógeno puede proteger contra los efectos letales de la endotoxina y la infección Gram negativa (Netea, M., *et al.*, J. Clin. Invest. 97:1366-1372, 1996). Las características de unión adecuadas de las lipoproteínas a los componentes de la superficie bacteriana pueden identificarse mediante métodos de biología molecular conocidos en la técnica, y la característica de unión de las lipoproteínas puede usarse como el resto director en las composiciones fotosensibilizantes.

Moléculas, por ejemplo, péptidos, diferentes de anticuerpos y miembros de parejas de ligandos de alta afinidad, pueden usarse para dirigir una composición fotosensibilizante hacia un organismo diana. Los restos directores pueden modificarse o refinarse. Una vez que se ha proporcionado un resto director de afinidad razonable, un experto en la técnica puede alterar la estructura divulgada (de un polipéptido de polilisina, por ejemplo), produciendo fragmentos o análogos, y ensayando las estructuras producidas de nuevo para la modificación de la afinidad o especificidad. En la

patente de Estados Unidos n.º 6.462.070 se describen los ejemplos de métodos que permiten la producción y ensayo de fragmentos y análogos.

- 5 En aspectos que pertenecen a los métodos diagnósticos, el técnico experto apreciará que los restos directores descritos en el presente documento pueden configurarse de tal manera que no interfieran con la activación o la desactivación de los fotosensibilizantes asociados con la escisión del enlazador.

Estructuras principales

- 10 Las composiciones fotosensibilizantes incluyen aquellas en las que un resto de "estructura principal", tal como un poliaminoácido, se une a un fotosensibilizante y/o a un aglutinante y/o a un resto director. Adicionalmente, la estructura principal puede ser por sí misma un resto director, por ejemplo, polilisina.

- 15 La inclusión de una estructura principal en una composición con un fotosensibilizante y/o aglutinante y/o resto director puede proporcionar numerosas ventajas, incluyendo la provisión de intervalos estequiométricos mayores de fotosensibilizantes y/o aglutinantes y/o restos directores acoplados por estructura principal. Si la estructura principal posee afinidad intrínseca por un organismo diana, la afinidad de la composición puede potenciarse acoplándose a la estructura principal. Asimismo, la gama específica de organismos a los que puede dirigirse una composición puede expandirse acoplando dos o más restos directores diferentes a una única composición de fotosensibilizante-estructura principal. Sin embargo, se apreciará que en las realizaciones que pertenecen a los métodos diagnósticos, la estructura principal debe configurarse de tal manera que no interfiera con la inactivación o desactivación de los fotosensibilizantes tras la escisión del activador.

- 25 Los péptidos útiles en los métodos de la invención para el diseño y la caracterización de los restos de estructura principal incluyen poliaminoácidos que pueden ser homopolímeros y heteropolímeros de una composición de aminoácidos L, D, DL racémicos o mixtos, y que se pueden tener una composición o una secuencia definida o aleatoria. Los ejemplos de péptidos que se producen naturalmente con restos de aminoácidos D y L mixtos incluyen bacitracina y tirocidina. Estos péptidos pueden modelarse después de péptidos naturales sintético, y optimizarse mediante la técnica de expresión en fagos y selección de la unión potenciada a una diana seleccionada, de tal manera que el péptido seleccionado de afinidad más alta se caracteriza y a continuación se produce sintéticamente.

- 35 Se pueden introducir modificaciones adicionales de grupos funcionales para los fines, por ejemplo, de aumentar la solubilidad, disminuir la agregación, y una extensión alterada de la hidrofobicidad. Los ejemplos de estructuras principales no peptídicas incluyen ácidos nucleicos y derivados de ácidos nucleicos, tal como: ADN, ARN y ácidos nucleicos peptídicos; polisacáridos y derivados tales como almidón, pectina, quitinas, celulosas y celulosas hemimetiladas; lípidos tales como derivados de triglicéridos y cerebrósidos; polímeros sintéticos tales como polietilenglicoles (PEG) y polímeros PEG estrella; derivados de dextrano, alcoholes de polivinilo, copolímeros de N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, poli (ácido DL-glicólico-ácido láctico); y las composiciones que contienen elementos de cualquiera de estas clases de compuestos.

40

Administración de las composiciones fotosensibilizantes

- 45 En determinados aspectos, las composiciones fotosensibilizantes pueden utilizarse terapéuticamente, es decir, para el tratamiento fotodinámico de las infecciones bacterianas. Las composiciones fotosensibilizantes pueden administrarse a un sujeto en forma libre, es decir, en solución. Como alternativa, las composiciones pueden administrarse en diversas formulaciones incluyendo, aunque no de forma limitativa, un liposoma, unión a péptidos, unión a polímeros, o en formulaciones que contienen detergentes. Las personas normalmente expertas en la materia son bien capaces de generar y administrar dichas formulaciones. La composición debe ser soluble en condiciones fisiológicas, en disolventes acuosos que contienen transportadores o excipientes adecuados, o en otros sistemas, tales como liposomas, que se pueden usar para administrar el conjugado a un sujeto.

- 55 Las composiciones fotosensibilizantes que son algo insolubles en un disolvente acuoso pueden aplicarse en un liposoma, o en una forma de liberación temporalizada, de tal manera que se puede aplicar iluminación intermitentemente utilizando un régimen de periodos de iluminación alternante con periodos sin iluminación. Otros regímenes contemplados son periodos de iluminación a un nivel más bajo, para los que es adecuada una formulación de liberación temporalizada.

- 60 La composición se puede administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz mediante varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo por vía oral y tópica. En un aspecto, la composición fotosensibilizante puede administrarse por vía parenteral. La frase "administrada por vía parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración diferentes de la administración oral y tópica, habitualmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión. Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una composición fotosensibilizante que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para disminuir la actividad de un patógeno de tal manera que se reduce o alivia una infección.

65

Como apreciarán lo expertos en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Una composición fotosensibilizante puede estar contenida en un excipiente o transportador farmacéuticamente aceptable. Incluidos, sin limitación, están cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Ventajosamente, el transportador es adecuado para la administración oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede estar revestido con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

En un aspecto, el transportador puede proteger el compuesto frente a la liberación rápida, por ejemplo, una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En otro aspecto de la invención, las composiciones fotosensibilizantes se pueden administrar mediante tratamiento combinado, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, el tratamiento combinado puede incluir una composición de la presente divulgación con al menos un fotosensibilizante diferente, al menos un antibiótico, u otro tratamiento convencional.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica.

Una persona normalmente experta en la materia puede determinar y recetar la cantidad de la composición farmacéutica según sea necesario. Por ejemplo, se podrían iniciar las dosis de la composición fotosensibilizante conocida o novedosas a niveles menores que los indicados a fin de conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consigue el efecto deseado. Por ejemplo, la dosificación puede variar desde 0,1 mg/kg a 10 mg/kg dependiendo del agente terapéutico utilizado.

No se pretende que las iteraciones delineadas anteriormente sean limitantes con respecto a la naturaleza de las composiciones fotosensibilizantes conjugadas, o a una ruta concreta de la administración.

Fotoactivación/Iluminación

Las composiciones fotosensibilizantes se fotoactivan en los usos terapéuticos y diagnósticos de acuerdo con la invención. Para usos terapéuticos, la administración de una composición fotosensibilizante está normalmente seguida por un periodo de tiempo suficiente para permitir la acumulación de la misma en el sitio diana. Tras encontrar el patógeno diana y/o la célula hospedadora infectada que se va a tratar o evaluar diagnósticamente, el sitio de escisión de la enzima del enlazador se escinde por enzimas producidas por el patógeno. Cabe destacar que, las enzimas pueden secretarse, pueden ser internas, o pueden residir sobre la superficie, o en el espacio de la pared celular de un patógeno. Una vez que se escinde el enlazador, los fotosensibilizantes vuelven a un estado desactivado. Los fotosensibilizantes pueden, posteriormente, activarse mediante irradiación. Esto se lleva a cabo aplicando luz de una longitud de onda e intensidad adecuadas, durante un lapso de tiempo eficaz, en el sitio de la infección para usos terapéuticos, o en el sitio de reacción para usos diagnósticos, por ejemplo, el recipiente de reacción. Tal como se usa en el presente documento, "irradiación" se refiere al uso de la luz para inducir la reacción química de un fotosensibilizante.

Las dosificaciones fotoactivantes dependen de diversos factores, incluyendo la cantidad del fotosensibilizante administrada, la longitud de onda de la luz fotoactivante, la intensidad de la luz fotoactivante y la duración de la iluminación por la luz fotoactivante.

Por tanto, la dosis puede ajustarse a una dosis terapéuticamente eficaz o a una dosis adecuada para los diagnósticos ajustando uno o más de estos factores. Dichos ajustes están comprendidos en el nivel de las personas normalmente expertas.

La irradiación de la longitud de onda adecuada para un compuesto dado puede administrarse mediante varios métodos. Los métodos para la irradiación incluyen, aunque no de forma limitativa, la administración de luz láser, luz no de láser, o luz de banda amplia. La irradiación puede producirse mediante generación extracorpórea o intraarticular de luz de la longitud de onda adecuada. La luz usada en la invención puede administrarse usando cualquier dispositivo capaz el requisito de intensidad de la luz que incluye, aunque no de forma limitativa, instrumentos de fibra óptica,

instrumentos artroscópicos, o instrumentos que proporcionan transiluminación. Con las realizaciones terapéuticas, la administración de la luz a una localización fisiológica cóncava, o de otra forma inaccesible puede ser facilitada por fibras ópticas flexibles (implícita en esta declaración está la idea de que se puede irradiar tanto un campo amplio, tal como el pulmón o un lóbulo del pulmón, como un campo estrecho donde pueden haberse localizado las células bacterianas).

Las composiciones fotosensibilizantes, en algunos aspectos, pueden ser estables durante el curso de al menos un ciclo de tratamiento o uso diagnóstico (por ejemplo, la detección y/o la cuantificación de la actividad beta-lactamasa) mediante irradiación continuada o pulsada, durante el cual el fotosensibilizante comprendido en la composición se excitaría ventajosamente, de forma repetida hasta el estado energizado, experimentando múltiples ciclos de generación de oxígeno singlete.

La longitud de onda adecuada, o el intervalo de longitudes de onda, dependerá del(de los) fotosensibilizante(s) usado(s) y puede variar desde aproximadamente 350 nm a aproximadamente 550 nm, de aproximadamente 550 nm a aproximadamente 650 nm, de aproximadamente 650 nm a aproximadamente 750 nm, de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 850 nm y de aproximadamente 850 nm a aproximadamente 950 nm.

En algunos aspectos, los tejidos diana se iluminan con luz roja. Dado que la luz roja y/o la luz en el infrarrojo cercano penetran mejor los tejidos de mamíferos, los fotosensibilizantes con fuertes absorbancias, en el intervalo de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 900 nm pueden ser adecuados para la activación de los fotosensibilizantes administrados. Para la fotoactivación, la longitud de onda de la luz se corresponde con el espectro de absorción electrónica del fotosensibilizante de tal manera que el fotosensibilizante absorbe fotones y se puede producir la fotoquímica deseada. La especificidad de la longitud de onda para la fotoactivación depende generalmente de la estructura molecular del fotosensibilizante. La fotoactivación puede producirse también con dosis de luz subablativas. La determinación de la longitud de onda adecuada, la intensidad de la luz, y la duración de la iluminación están comprendidas en los conocimientos de una persona normalmente experta en la técnica.

Con usos terapéuticos, la profundidad de penetración eficaz, δ_{ef} , de una longitud de onda de luz dada es una función de las propiedades ópticas del tejido, tales como la absorción y la dispersión. La fluencia (dosis de luz) en un tejido está relacionada con la profundidad, d , como: $e^{-d/\delta_{ef}}$. Normalmente, la profundidad de penetración eficaz es aproximadamente de 2 a 3 mm a 630 nm y aumenta a aproximadamente 5 a 6 mm a longitudes de onda más grandes (aproximadamente 700 a aproximadamente 800 nm) (Svaasand y Ellingsen, (1983) Photochem Photobiol. 38:293-299). La alteración de las interacciones biológicas y las características físicas del fotosensibilizante puede alterar estos valores. En general, los fotosensibilizantes con longitudes de onda de absorción más largas son agentes fotodinámicos más eficaces.

La luz para la fotoactivación puede producirse y administrarse en el sitio de la infección o en una reacción diagnóstica mediante cualquier medio adecuados conocido en la técnica. La luz fotoactivante puede administrarse desde una fuente de luz, tal como un láser o fibra óptica. Los dispositivos de fibra óptica que iluminan directamente el sitio de la inflamación o una reacción diagnóstico pueden administrar la luz fotoactivante. Por ejemplo, para usos terapéuticos, la luz puede administrarse por fibras ópticas roscadas a través de agujas hipodérmicas de calibre pequeño. La luz puede administrarse mediante un catéter intravascular adecuados, tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos números 6.246.901 y 6.096.289, que pueden contener una fibra óptica. Las fibras ópticas pueden también pasarse a través de artroscopios. Además, la luz puede transmitirse mediante instrumentación percutánea utilizando fibras ópticas o guías de ondas canuladas. Para los sitios quirúrgicos abiertos, las fuentes de luz adecuadas incluyen fuentes de luz convencionales de banda amplia, matrices amplias de diodos emisores de luz (LED), y haces láser desenfocados.

La administración puede ser mediante todos los métodos conocidos en la técnica, incluyendo la transiluminación. Algunos fotosensibilizantes pueden activarse mediante luz infrarroja cercana, que penetra más profundamente en el tejido biológico que otras longitudes de onda. Por tanto, la luz infrarroja cercana es ventajosa para la transiluminación. La transiluminación puede llevarse a cabo utilizando varios dispositivos. Los dispositivos pueden utilizar fuentes de láser o fuentes no de láser, (por ejemplo, mesas de luz o haces de luz convergentes).

En aspectos donde se desea el tratamiento, la dosificación de la composición fotosensibilizante, y la luz que activa la composición fotosensibilizante, se administra en una cantidad suficiente para producir una especie fototóxica. Por ejemplo, cuando el fotosensibilizante es clorina_{a6}, la administración a seres humanos está en un intervalo de dosificación de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg, preferentemente aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg, más preferentemente aproximadamente 2 a aproximadamente 4 mg/kg y el tiempo de administración de la luz está espaciado a intervalos de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 3 días, preferentemente, aproximadamente 12 horas a aproximadamente 48 horas, y más preferentemente aproximadamente 24 horas. La dosis de luz administrada está en el intervalo de aproximadamente 2-500 J/cm², preferentemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 J/cm², y más preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 J/cm². La velocidad de fluencia está en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 mw/cm², preferentemente aproximadamente 50 a aproximadamente 300 mw/cm² y más preferentemente aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mw/cm². Existe una relación recíproca entre las composiciones fotosensibilizantes y la dosis

de luz, por lo tanto, la determinación de la longitud de onda adecuada, la intensidad de la luz, y la duración de la iluminación están comprendidas en los conocimientos de una persona normalmente experta en la técnica.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar en el tiempo varias dosis divididas, o la dosis se puede reducir proporcionalmente o aumentarse tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

La irradiación de la longitud de onda adecuada para un compuesto dado para los métodos diagnósticos de la invención puede administrarse mediante varios métodos. Los métodos para la irradiación incluyen, aunque no de forma limitativa, la administración de luz láser, luz no de láser, o luz de banda amplia. La irradiación puede producirse mediante generación extracorpórea o intraarticular de luz de la longitud de onda adecuada. La luz usada en la invención puede administrarse usando cualquier dispositivo capaz el requisito de intensidad de la luz que incluye, aunque no de forma limitativa, instrumentos de fibra óptica, instrumentos artroscópicos, o instrumentos que proporcionan transiluminación.

La longitud de onda y la intensidad de la luz pueden ajustarse de acuerdo con los métodos normalizados conocidos en la técnica para controlar la producción de especies fototóxicas o una respuesta de fluorescencia. Por tanto, en determinadas condiciones (por ejemplo, intensidad baja, velocidad de fluencia baja, longitud de onda de la luz más corta o alguna combinación de las mismas), una especie fluorescente se produce principalmente a partir del fotosensibilizante y cualquier especie reactiva producida tiene un efecto despreciable. Estas condiciones se adaptan fácilmente para provocar la producción de una especie fototóxica. Por ejemplo, cuando el fotosensibilizante es clorina^{es}, la dosis de luz administrada para producir una especie fluorescente y una especie reactiva insustancial es menor de aproximadamente 10 J/cm, preferentemente menos de aproximadamente 5 J/cm y más preferentemente menos de 1 J/cm. La determinación de la longitud de onda adecuada, la intensidad de la luz, y la duración de la iluminación para cualquier fotosensibilizante están comprendidas en los conocimientos de una persona normalmente experta en la técnica.

En determinados aspectos dirigidos a los métodos diagnósticos, los fotosensibilizantes desactivados o fotoactivables (por ejemplo, tras la escisión del enlazador) pueden detectarse iluminando los fotosensibilizantes con una longitud de onda de luz adecuada y detectando a continuación la respuesta (por ejemplo, emisión de fluorescencia).

Una muestra puede iluminarse con una longitud de onda de la luz seleccionada para dar una respuesta óptica detectable, y observarse con medios para detectar la respuesta óptica. El equipo que es útil para iluminar los presentes compuestos y composiciones incluye, aunque de forma no limitativa, lámparas ultravioleta de mano, lámparas de arco de mercurio, lámparas de xenon, láseres y diodos láser. estas fuentes de iluminación están ópticamente integradas en escáneres láser, lectores de microplacas fluorescentes o microfluorómetros normalizados, o cualquier otro medio conocido adecuado para detectar y/o medir la señal (por ejemplo, una señal de fluorescencia).

Los fotosensibilizantes divulgados en el presente documento pueden, en cualquier tiempo después o durante un ensayo, iluminarse con una longitud de onda de luz que da como resultado una respuesta óptica detectable, y observarse con medios para detectar y medir la respuesta óptica. tras la iluminación, tal como mediante una lámpara de emisión de longitud de onda ultravioleta o visible, una lámpara de arco, un láser, o incluso luz solar o luz ambiente ordinaria, los compuestos fluorescentes, incluyendo aquellos unidos al miembro de la pareja de unión específica complementaria, presentan una absorción intensa en el visible así como emisión de fluorescencia. El equipo seleccionado que es útil para eliminar los compuestos fluorescentes incluye, aunque de forma no limitativa, lámparas ultravioleta de mano, lámparas de arco de mercurio, lámparas de xenon, láseres de argón, diodos láser, y láseres YAG. Estas fuentes de iluminación pueden integrarse opcionalmente en escáneres láser, lectores de microplacas fluorescentes, fluorómetros normalizados o mini fluorómetros, o detectores cromatográficos. Cualquier software informático para medir, procesar y presentar imágenes y/o datos que pertenecen al proceso de detectar y medir secuencias señal será conocido por los técnicos expertos y se contemplan por la invención.

Las emisiones de fluorescencia pueden detectarse opcionalmente mediante inspección visual, o mediante el uso de cualquiera de los dispositivos siguientes: cámaras CCD, videocámaras, película fotográfica, dispositivos de escáneres láser, fluorómetros, fotodiodos, contadores cuánticos, microscopios de epifluorescencia, microscopios de barrido, citómetros de flujo, lectores de microplacas fluorescentes, o por medios para amplificar la señal tal como tubos fotomultiplicadores. Cuando la muestra se examina utilizando un citómetro de flujo, un microscopio fluorescente o un fluorómetro, el instrumento se usa opcionalmente para distinguir y discriminar entre compuestos fluorescentes y un segundo fluoróforo con propiedades ópticas diferentes detectables, distinguiendo normalmente la respuesta de la fluorescencia de los compuestos fluorescente de los del segundo fluoróforo. Cuando se examina una muestra utilizando un citómetro de flujo, el examen de la muestra incluye opcionalmente el aislamiento de partículas en la muestra basado en la respuesta de la fluorescencia utilizando un dispositivo de clasificación.

La descripción anterior no se entiende que limite los medios, métodos o instrumentación que se pueden usar para detectar, medir, cuantificar, y analizar señales (por ejemplo, fluorescencia) producidas por los fotosensibilizantes vinculados con aquellas realizaciones que pertenecen a los métodos diagnósticos de la invención. Se contemplan cualesquiera medios, métodos o instrumentación para detectar, medir, cuantificar y analizar las señales

fotosensibilizantes.

Dianas y muestras

- 5 Las composiciones sensibilizantes se pueden usar en métodos terapéuticos para tratar una infección bacteriana en un sujeto que lo necesita, por ejemplo, cuando la infección es debida a un patógeno resistente a antibiótico.

El sujeto puede ser un animal o ser humano vivo (por ejemplo, hospedador) que transporta un organismo no deseado (por ejemplo, un patógeno), es decir, un organismo que es una diana para el tratamiento fotodinámico.

- 10 El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano o un mamífero no humano (por ejemplo, un perro, gato, cerdo, vaca, ovejas, cabra, caballo, rata o ratón). el sujeto puede ser además inmunodeficiente; actualmente o experimentando previamente tratamiento para el cáncer (por ejemplo, mediante quimioterapia o radioterapia); o experimentando actualmente o previamente tratamiento antibiótico o un tratamiento inmunosupresor.

- 15 En determinados aspectos diferentes que se refieren al uso de las composiciones fotosensibilizantes para fines diagnósticos, por ejemplo, la detección y la cuantificación de una actividad beta-lactamasa, una muestra puede ser de cualquier fuente, incluyendo muestras obtenidas directamente de tejidos infectados o fluidos corporales (por ejemplo, sangre, orina, heces, piel, linfa, líquido espinal, músculo, corazón, cerebro, estómago, intestino y cualquier otro órgano que pueda estar transportando una infección que se va a tratar con antibióticos), o cultivos bacterianos obtenidos a partir de fuentes naturales (por ejemplo, los pacientes, suelos, sedimentos) o de fuentes comerciales o de fuentes de reservas que se desean evaluar o ensayar para la resistencia a antibióticos.

- 25 En aspectos que se refieren a los usos terapéuticos, un organismo que se dirige para la destrucción mediante los métodos y composiciones descritas en el presente documento es un organismo no deseado, no deseado por que infecta un organismo hospedador (o una célula del mismo) y produce o agrava una enfermedad o trastorno en este hospedador.

- 30 Los organismos diana pueden ser celulares. Dichos organismos diana incluyen al menos una membrana celular límite y son capaces de producir energía, síntesis de ácidos nucleicos, y contienen ribosomas y son capaces de la síntesis de proteínas ribosómicas. Las células pueden ser unicelulares o multicelulares, y dichos organismos unicelulares pueden ser procariotas o eucariotas. Las células diana pueden expresar o producir un fenotipo de resistencia a antibióticos (por ejemplo, fenotipo beta-lactamasa) que se va a ensayar o evaluar utilizando los métodos divulgados a continuación.

- 35 Los organismos diana procariotas para el tratamiento y/o el diagnóstico de acuerdo con el método de la invención incluyen bacterias, cuyas bacterias pueden ser Gram negativas o Gram positivas, o que carecen de paredes celulares. la tinción Gram base para distinguir bacterias, que se basa en si las células de una cepa específica o una especie de bacteria capta o no una tinción, o se tiñen solo con la contratinción, es conocida por los expertos en la materia.

- 40 Los géneros bacterianos Gram negativos, que producen β lactamasa en última instancia, adecuados como organismos diana para el tratamiento y/o el diagnóstico incluyen *Neisseria*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptophomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Haemophilus*, y *Klebsiella*. *Streptophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, y *Acinetobacter baumannii* son, por ejemplo, colonizadores comunes de pacientes en un escenario de cuidados intensivos. Los géneros bacterianos Gram positivos adecuados como organismos diana incluyen *Staphylococcus* y *Enterococcus*.

- 50 Otros patógenos bacterianos a contemplar en el presente documento como "organismos no deseados" y, por lo tanto, que se van a dirigir para la destrucción y/o el análisis diagnóstico, incluyen, sin limitación, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania*, *Mycobacterium leprae*, y *Shigella*.

- Leishmania* no produce β lactamasa. En su lugar, producen metaloproteínasa gp63 superficial, que pueden, por ejemplo, escindir el heptapéptido AYLLKKVV. Por tanto, el último polipéptido puede servir como un sitio de escisión de la enzima adecuado comprendido en un enlazador en una composición fotosensibilizante, para uso en los métodos diagnósticos de la invención.

- 55 En algunos aspectos terapéuticos, los patógenos pueden dirigirse mediante los métodos de la presente invención y se pueden encontrar en cualquier superficie accesible a la luz o en zonas accesibles a la luz, por ejemplo, en sujetos humanos y animales. En los casos de seres humanos y animales, las infecciones de la epidermis, cavidad oral, la cavidad nasal, los senos, orejas, pulmones, tracto urogenital, y tracto gastrointestinal son accesibles a la luz. Las infecciones epidérmicas incluyen infecciones subcutáneas, lesiones especialmente localizadas, cuyas infecciones son accesibles a la luz. Infecciones de la cavidad peritoneal, tales como aquellas resultantes de apendicitis reventada, son accesibles a la luz mediante al menos dispositivos laparoscópicos. Varias infecciones de la piel que son refractarias a los antibióticos o a un tratamiento antifúngico a largo plazo, por ejemplo, dermatoficosis de la uña del pie, son adecuadas para el tratamiento fotodinámico usando los métodos de la invención. En determinados métodos diagnósticos de la invención, las muestras que comprenden las enzimas beta-lactamasas o los productores de beta-lactamasas bacterianas pueden obtenerse de cualquiera de las anteriores enfermedades o células infecciosas y/o

tejidos para identificar y evaluar los regímenes antibióticos adecuados que se pueden usar en el tratamiento.

Se puede producir una infección pulmonar con varios géneros y especies bacterianas, que incluye las pseudomonas, que son la causa principal de muerte de los pacientes con fibrosis quística, Klebsiella, y también puede producirse con varias cepas de virus,. Debido a que los patógenos del pulmón son crecientemente resistentes a los tratamientos con antibióticos clásicos, el tratamiento y/o el diagnóstico fotodinámico con las composiciones ofrece un método alternativo para eliminar y/o diagnosticar estos organismos no deseados que es independiente de los mecanismos microbianos de resistencia.

Las infecciones epidérmicas adicionales y las infecciones de los tejidos profundos surgen de quemaduras, raspaduras, cortes, y heridas por punción. En un aspecto, el tratamiento y/o el diagnóstico de PDT con las composiciones son útiles para la esterilización de dichos sitios infecciosos potenciales, que pueden conducir rápidamente a un choque tóxico, una frecuencia concomitante de heridas de bala, y para el tratamiento de sol sitios para eliminar o reducir los organismos infecciosos no deseados o determinar un régimen de antibióticos adecuado y eficaz. Una causa principal de infección en las heridas, especialmente en quemaduras, es la bacteria aerobia Gram negativa Pseudomonas. Este organismo produce una exotoxina que se ha mostrado que retrasa la cicatrización de la herida. Las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a muchos antibióticos están llegando a ser un problema significativo, especialmente en las unidades de quemados de grandes hospitales. Las pseudomonas producen también infecciones fulminantes de la córnea. *Escherichia coli* junto con *Staphylococcus aureus* son las dos bacterias más comunes en heridas infectadas.

Otros sitios de organismos diana no deseados incluyen el tracto urogenital, la cavidad peritoneal, el oído interno y externo, la cavidad nasal y el tracto gastrointestinal. Los sitios infecciosos de proliferación de organismos diana no deseados en tejidos de origen mesotelial y endotelial son también accesibles a PDT mediante técnicas mínimamente invasivas.

En otras realizaciones específicas, las áreas de infección no son accesibles a la luz. Se puede acceder a dichas área, por ejemplo, con el uso de sondas o catéteres emisores de luz. Por tanto, la administración de la luz a una localización fisiológica cóncava. o de otra forma inaccesible puede ser facilitada por fibras ópticas flexibles (implícita en esta declaración está la idea de que se puede irradiar tanto un campo amplio, tal como el pulmón o un lóbulo del pulmón, como un campo estrecho donde pueden haberse localizado las células bacterianas). La fuente de luz necesaria para inactivar los compuestos descritos en el presente documento puede ser un láser de diodos barato o una fuente de luz no coherente.

Los patógenos a los que se va a dirigir mediante los métodos diagnósticos de la invención usando las composiciones descritas en el presente documento pueden producirse de forma natural o artificial. Los patógenos que se producen artificialmente comprenden patógenos diseñados mediante ingeniería genética recombinante, por ejemplo, presentan resistencia a determinados antibióticos estándar. En una situación de bioterrorismo, por ejemplo, se puede abarcar un patógeno que no produce β lactamasa de forma natural habiéndose diseñado mediante ingeniería genética para producir la última. Diseñar mediante ingeniería genética recombinante un patógeno que se produce naturalmente para presentar una resistencia a múltiples anticuerpos daría como resultado una cepa muy virulenta difícil de combatir mediante medidas de tratamiento normalizadas (tal como penicilina).

Los técnicos expertos reconocerán estos y otros grupos y géneros bacterianos no relacionados aquí como bacterias diana adecuadas para las composiciones descritas en el presente documento. Por tanto, los anteriores listados se usan para ilustrar aplicaciones de la presente invención a los grupos principales de organismos diana adecuados, pero no delimitan la invención a las especies, géneros, familias, órdenes o clases relacionados de esta manera.

El patógeno puede estar contenido en una célula hospedadora, tal como un fagocito (por ejemplo, un macrófago). Además, en esta célula, el patógeno puede estar contenido (completa o parcialmente) en una vacuola, vesícula, u orgánulo.

En aspectos que implican usos diagnósticos de las composiciones fotosensibilizantes descritas en el presente documento, se pueden obtener muestras biológicas de cualquiera de las localizaciones fisiológicas anteriormente mencionadas para la infección bacteriana a fin de medir, ensayar, o evaluar la producción de diversos factores de virulencia enzimáticos, por ejemplo, beta-lactamasa.

Composiciones antibacterianas

En determinadas realizaciones, las composiciones fotosensibilizantes, o sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptables, pueden formularse en una composición antibacteriana para tratar las infecciones bacterianas diana de acuerdo con la invención. Las composiciones antibacterianas comprenden una o más composiciones fotosensibilizantes como el(los) principio(s) activo(s), en asociación con un transportador sólido o líquido, orgánico o inorgánico, adecuado para la administración oral o la administración no oral o para aplicaciones externas, cuando dicha composición fotosensibilizante es para administrarse a fines de tratar terapéuticamente infecciones bacterianas, en particular, aquellas infecciones bacterianas que son resistentes a los antibióticos.

Esta composición antibacteriana puede prepararse en la forma de cualesquiera formulaciones convencionales, que incluyen cápsulas, comprimidos, pomadas, supositorios, soluciones, suspensiones, emulsiones y así sucesivamente. En caso necesario, la anterior formulación puede contener además un agente suplementario, estabilizante, agente humectante o emulsionante, o un agente tamponante, o cualquiera de otros aditivos convencionales.

Por tanto, la composición antibacteriana puede administrarse en la forma de una formulación, tal como inyecciones intravenosas o intramusculares, preparaciones administrables por vía oral, supositorios o similares. El excipiente o transportador presente en la composición puede seleccionarse entre los farmacéuticamente aceptables, y la clasificación del excipiente o transportador varía dependiendo de la ruta de administración y el método de administración.

Por ejemplo, se puede usar un transportador líquido, que puede incluir agua, etanol, o aceites animales y vegetales, tales como aceite de soja, aceite de sésamo, o aceite mineral o aceite sintético, y otros. Un transportador sólido, azúcar, tal como maltosa y sacarosa, un aminoácido, tal como lisina, un derivado de celulosa, tales como hidroxipropilcelulosa y similares, un polisacárido, tales como ciclodextrinas, y una sal de ácido orgánico, tal como estearato de magnesio y similares.

Cuando la composición antibacteriana se formula en una inyección, en general, el transportador puede ser deseablemente una solución salina fisiológica, diversas soluciones tamponadas, soluciones acuosas de un azúcar tal como glucosa, inositol, manitol y similares, o un glicol tal como etilenglicol, polietilenglicol y similares. Además, la composición antibacteriana puede formularse también en una preparación liofilizada en asociación con un excipiente que puede ser un azúcar tal como inositol, manitol, glucosa, manosa, maltosa, sacarosa y similares, o un aminoácido tal como fenilalanina y similares. Tras la administración, la preparación liofilizada puede disolverse en un disolvente adecuado para la inyección, por ejemplo, un líquido disponible para inyección intravenosa, que puede ser agua estéril, solución salina fisiológica, y solución acuosa de glucosa, solución de electrolitos y solución acuosa de aminoácidos, y similares.

La proporción de la composición fotosensibilizante formulada como una composición antibacteriana puede variar de acuerdo con el tipo de la formulación, pero normalmente puede ser 0,1 a 99 % en peso, preferentemente 1 a 90 % en peso de la composición. Por ejemplo, una solución inyectable puede contener normalmente 0,1 a 10 % en peso del compuesto del principio activo. Cuando la composición antibacteriana se va a proporcionar por vía oral, se usa en la forma de una preparación tal como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, jarabes secos, líquidos, jarabes y similares, en asociación con un transportador sólido o un transportador líquido como se ha mencionado anteriormente. Para las cápsulas, comprimidos, gránulos y polvos, en general, la proporción del compuesto del principio activo presente en el anterior puede ser 3 a 99 % en peso, preferentemente 5 a 90 % en peso de la composición, siendo el resto el transportador.

La dosificación de la composición fotosensibilizante que se va a usar como el principio activo, o su sal o éster depende de la edad, el peso corporal y los síntomas de los pacientes, y los fines del tratamiento terapéutico y otros factores. La dosificación es para proporcionar una cantidad eficaz de la composición fotosensibilizante para combatir contra las bacterias infectantes. La composición fotosensibilizante puede administrarse en una dosificación necesaria de forma continua o intermitente siempre que la dosificación total de la composición fotosensibilizante no exceda un nivel específico que se decide a la vista de los resultados de los ensayos animales y diversas circunstancias.

Cuando se administra por vía parenteral, la dosificación total de la composición fotosensibilizante de la invención se administra, por supuesto, con ajustes adecuados realizándose a la vista de la manera de administración, las condiciones de los pacientes tales como la edad, peso corporal y sexo, así como alimentos y medicinas administrados simultáneamente. Puede determinarse la dosificación y la frecuencia de administración adecuadas de la composición fotosensibilizante de la presente invención en condiciones dadas por el físico experto mediante los ensayos de determinación de la dosificación óptima a la luz de las directrices anteriormente mencionadas. Estas directrices para la administración se aplican también a la administración oral de la composición fotosensibilizante de la invención.

Métodos y kits diagnósticos

En otro aspecto más, la presente invención proporciona métodos y kits diagnósticos para utilizar las composiciones fotosensibilizantes descritas en el presente documento para una amplia gama de aplicaciones diagnósticas que se refieren generalmente a la detección cualitativa y/o cuantitativa de enzimas implicadas en la resistencia a los antibióticos, tales como, las enzimas beta-lactamasas. En algunos aspectos, las moléculas fotosensibilizantes de la invención se inactivan antes de la escisión del enlazador que las une juntas. Una vez que se escinde el enlazador, sin embargo, las moléculas fotosensibilizantes llegan a estar físicamente separadas, tras lo cual, se vuelven activables de tal manera que, cuando se activa, producen una señal detectable, por ejemplo, una señal de fluorescencia. Esta característica puede utilizarse de acuerdo con la invención para la detección cualitativa y/o cuantitativa y/o la medición de la enzima utilizando el enlazador como sustrato, es decir, la "actividad de interés", por ejemplo, una beta lactamasa. Dichos métodos pueden utilizarse también para obtener información con respecto a la especificidad del sustrato de la actividad de interés, por ejemplo, puede implementarse una actividad beta-lactamasa, que puede ayudar en la determinación de un tratamiento antibiótico adecuado.

Las enzimas que se ensayan utilizando los métodos de la invención pueden ser de cualquier organismo de interés, tanto aislado de una infección como directamente de una célula o tejido, o aquellos organismos que están aislados del cuerpo y se mantienen en cultivo o almacenamiento, etc. Los ensayos inventivos pueden también dirigirse contra las
 5 propias enzimas, tanto en forma purificada como en forma no purificada. Las enzimas pueden ser de cualquier organismo, por ejemplo, una bacteria Gram negativa, tales como, una bacteria productora de β lactamasa, incluyendo *Neisseria*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptophomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Haemophilus*, y *Klebsiella*. *Streptophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, y *Acinetobacter baumannii* are, por ejemplo, colonizadores comunes de pacientes en un escenario de cuidados
 10 intensivos. Los géneros bacterianos Gram positivos adecuados como organismos diana incluyen *Staphylococcus* y *Enterococcus*.

En un aspecto, se proporciona un método para detectar la presencia de la actividad de una enzima de interés, por ejemplo, la actividad de una beta-lactamasa, en una muestra. El método incluye poner en contacto la muestra con al
 15 menos una composición fotosensibilizante descrita en el presente documento, y fotoactivar la muestra para inducir una señal que se va a liberar desde fotosensibilizantes desactivados, y detectar la señal, por ejemplo, una señal de fluorescencia.

La "señal" como se usa en el presente documento se refiere a una respuesta detectable producida por la fotoactivación de los fotosensibilizantes desactivados que es detectable directa o indirectamente (observable) tanto mediante observación visual como mediante instrumentación u otros medios adecuados para la detección. Normalmente, la respuesta detectable es una respuesta detectable en una propiedad óptica, tal como un cambio en los modelos de distribución de longitudes de onda o de intensidad de la absorbancia o la luz o un cambio en la dispersión de la luz, la duración de la fluorescencia, la polarización de la fluorescencia, o una combinación de dichos parámetros en una
 20 muestra. La señal puede producirse a través de la muestra o en una porción localizada de la muestra. La presencia o ausencia de la señal tras el tiempo transcurrido es indicativa e una o más características de la muestra. Se puede usar la comparación de la cantidad del compuesto descrito en el presente documento con una respuesta estándar o esperada para determinar si y en qué grado una muestra posee la enzima (y la actividad enzimática) de interés.

En un aspecto, los métodos para detectar la actividad de una enzima de interés, por ejemplo, la actividad beta-lactamasa, de una muestra, mediante el uso de composiciones fotosensibilizantes. Dichos métodos de detección pueden ser métodos de detección *per se*, que, tal como se usa en el presente documento, se refieren a una detección cualitativa, 'sí/no' de la actividad de una enzima de interés, por ejemplo, la actividad beta-lactamasa. En aspectos ventajosos, los métodos de la invención proporcionan métodos de detección *per se* para detectar la actividad beta-lactamasa en una muestra, en la que la detección de la actividad frente a una composición fotosensibilizante indica una resistencia al enlazador de tipo antibiótico concreto por que dicho enlazador se escinde por la actividad. En otros aspectos, la información con respecto a la susceptibilidad de un enlazador a una enzima bacteriana, por ejemplo, una enzima beta-lactamasa procedente de una muestra biológica, puede utilizarse para determinar un régimen antibiótico eficaz que se va a aplicar contra una infección. En algunos aspectos, el régimen antibiótico puede comprender la
 30 administración de un antibiótico que tiene una estructura diferente que la del enlazador escindido. En otros aspectos más, se puede usar la información con respecto a la susceptibilidad del enlazador para determinar el tipo o clase de enzima beta-lactamasa producida por la bacteria que produce una infección. Los tipos o clases de beta-lactamasas se han descrito en el presente documento anteriormente. Se entenderá que el conocimiento del tipo o clase de la enzima beta-lactamasa de un organismo patógeno puede proporcionar información con respecto a los antibióticos concretos que pueden ser eficaces contra el patógeno de interés.

En otros aspectos, los métodos de detección proporcionan medios para detectar la actividad de una enzima de interés, por ejemplo, actividad beta-lactamasa, como una función de otro proceso que implica la producción de la enzima concreta que tiene la actividad. En un aspecto particular, la invención proporciona un método para detectar una
 40 actividad beta-lactamasa como una función de la producción de dicha enzima debido a otro proceso (tal como cuando un ácido nucleico que codifica una beta-lactamasa se usa como un gen indicador para medir la expresión del ácido nucleico). Dichos métodos de detección pueden practicarse en sistemas exentos de células y sistemas celulares (por ejemplo, detección intracelular). Los ejemplos de métodos para detectar la actividad beta-lactamasa en los que se pueden utilizar las composiciones fotosensibilizantes actualmente divulgadas que pueden utilizarse como sustratos para una beta-lactamasa incluyen aquellos métodos divulgados en las patentes de Estados Unidos números 5.955.604, 5.741.657, 6.031.094, 6.291.162, y 6.472.205, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia.

Como se describe en las patentes de Estados Unidos a las que se ha hecho referencia anteriormente (tales como, patente de Estados Unidos n.º 6.472.205), las células que se van a evaluar para la actividad beta-lactamasa pueden ponerse en contacto con una composición fotosensibilizante descrita en el presente documento. En presencia de una beta-lactamasa, el sustrato enlazador se escinde, haciendo que los fotosensibilizantes pasen a un estado inactivado, es decir, un estado activable. Tras la iluminación con la longitud de onda adecuada y/o la cantidad de luz, se produce una señal detectable, tal como la generación de emisiones de fluorescencia. Si está presente una beta-lactamasa en la muestra, y el enlazador es susceptible de escindirse por dicha enzima, entonces la muestra presentará una fluorescencia aumentada cuando se ponga en contacto con una composición fotosensibilizante. Dichos cambios de
 60

fluorescencia pueden detectarse excitando la muestra con radiación de una primera longitud de onda, que excita el grupo fotosensibilizante, que emite radiación de una segunda longitud de onda, que se puede detectar. Se mide la cantidad de la emisión, y se compara con un control adecuado o los valores de fondo. La cantidad de radiación emitida que difiere de los niveles de fondo y del control, tanto aumentada como disminuida, se correlaciona con la cantidad o actividad de la beta-lactamasa en la muestra. Se pueden determinar las curvas patrón para las mediciones cuantitativas.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para determinar si una enzima de interés en una muestra, por ejemplo, una enzima beta-lactamasa, puede escindir un enlazador divulgado de una composición fotosensibilizante. El método implica poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante, conduciendo por tanto a la escisión de cualquier enlazador sospechoso, seguido por excitar la muestra con radiación de una o más longitudes de onda que sean adecuadas para el compuesto escindido, y determinar el grado de fluorescencia emitida a partir de la muestra. Un grado de fluorescencia emitida a partir de la muestra que sea mayor que un grado esperado (o nivel inicial) indica que la enzima beta-lactamasa puede escindir el compuesto y que el compuesto es un sustrato para la enzima beta-lactamasa.

En otro aspecto, se proporciona un método para determinar si una muestra contiene actividad beta-lactamasa. El método implica poner en contacto la muestra que comprende una actividad beta-lactamasa con una composición fotosensibilizante en condiciones suficientes para permitir la escisión de cualquier resto enlazador susceptible por la actividad beta-lactamasa.

La escisión de un enlazador hace que los fotosensibilizantes se separen y lleguen a desinactivarse y por consiguiente, son fotoactivables. A continuación, la muestra se irradia con una o más longitudes de onda que se absorben por los sensibilizantes sin inactivar, que a continuación emiten fluorescencia de una longitud de onda e intensidad concreta. Un grado de fluorescencia emitida a partir de la muestra que es mayor que el esperado, es decir, mayor que el valor inicial de la muestra control que no contiene actividad beta-lactamasa, indica la presencia de actividad beta-lactamasa en la muestra. Un aspecto de este método es determinar la cantidad de una enzima en una muestra determinando el grado de fluorescencia emitida en un primer y segundo momento tras poner en contacto la muestra con un compuesto descrito en el presente documento. Se determina la diferencia en el grado de fluorescencia emitida desde la muestra en el primer y segundo momento, y la diferencia refleja la cantidad de una enzima beta-lactamasa en la muestra.

En otro aspecto, se proporcionan ensayos de cribado, que utilizan las composiciones sensibilizantes divulgadas y una célula hospedadora, tal como una célula de mamífero, transfectada con al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica al menos una proteína que tiene actividad beta-lactamasa. Dichas moléculas de ácido nucleico recombinante pueden incluir secuencias control de la expresión adaptadas para funcionar en una célula eucariota, tal como una célula de vertebrado, unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica la expresión de una enzima beta-lactamasa.

En otro aspecto más, se proporcionan métodos para determinar la cantidad de actividad beta-lactamasa en una célula. Este método implica poner en contacto una muestra, incluyendo una célula hospedadora que se transfecta con una molécula de ácido nucleico recombinante que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica la expresión de una beta-lactamasa. La muestra puede comprender células hospedadoras completas, o un extracto de las células hospedadoras, que se pone en contacto con una composición fotosensibilizante. La cantidad de composición fotosensibilizante escindida se mide midiendo una respuesta detectable, por lo cual, la cantidad de sustrato escindido está relacionada con la cantidad de actividad beta-lactamasa en la célula hospedadora.

En otro aspecto, se proporciona un método para controlar la expresión de un gen unido operativamente a un conjunto de secuencias control de la expresión. El método implica proporcionar una célula hospedadora transfectada con una molécula de ácido nucleico recombinante, donde la molécula de ácido nucleico comprende un conjunto de secuencias control de la expresión unido operativamente a secuencias de ácido nucleico que codifican la expresión de una enzima beta-lactamasa, excepto si la célula hospedadora es un hongo, la beta-lactamasa es una enzima beta-lactamasa citosólica. Una muestra que comprende la célula hospedadora, o un extracto o un medio acondicionado producido del anterior o mediante el anterior, se pone en contacto con un compuesto divulgado. Se determina la cantidad de compuesto escindido, en la que la cantidad de sustrato escindido está relacionada con la cantidad de actividad beta-lactamasa en la célula eucariota hospedadora, que está relacionada con la expresión del gen.

En otro aspecto, se proporciona un método para determinar si un compuesto de ensayo altera la expresión de una secuencia de ácido nucleico unida operativamente a una(s) secuencia(s) control de la expresión. El método implica poner en contacto una célula hospedadora transfectada con una secuencia de ácido nucleico recombinante, donde el ácido nucleico recombinante comprende una(s) secuencia(s) control de la expresión unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una beta-lactamasa. La célula hospedadora se pone en contacto con el compuesto de ensayo, y a continuación, la célula hospedadora se pone en contacto con una composición fotosensibilizante divulgada. A continuación se mide la cantidad de composición fotosensibilizante escindida, por lo cual, la cantidad de la composición fotosensibilizante escindida está relacionada con la cantidad de actividad beta-lactamasa en la célula. Además, la cantidad de la composición fotosensibilizante escindida en presencia del compuesto de ensayo puede compararse con la cantidad de composición fotosensibilizante escindida en ausencia del

compuesto de ensayo para determinar si el compuesto de ensayo altera la expresión regulada por la secuencia control.

En otro aspecto, se proporciona un método para la selección clonal, en el que las células que se transfectan presumiblemente con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia que codifica una beta-lactamasa se ponen en contacto con un compuesto divulgado. Aquellas células que están de hecho transfectadas con la molécula de ácido nucleico recombinante presentarán actividad beta-lactamasa, que se detecta midiendo el cambio óptico detectable producido tras la escisión de la composición fotosensibilizante. Se pueden seleccionar las células que presentan actividad beta-lactamasa, o mayor que un nivel predeterminado de actividad beta-lactamasa, y propagarse si se desea. Se puede llevar a cabo la selección de células que presentan actividad beta-lactamasa utilizando la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), utilizando, por ejemplo, un Becton Dickinson FACS Vantage.

Otro aspecto es usar un gen indicador de la beta-lactamasa y un compuesto descrito en el presente documento para cribar los compuestos químicos de ensayo para la actividad bioquímica. Una célula transfectada con una molécula de ácido nucleico recombinante que incluye al menos una secuencia control de la expresión unida operativamente a al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica la expresión de una enzima beta-lactamasa se pone en contacto con un compuesto químico de ensayo. A continuación, la célula se pone en contacto con una composición fotosensibilizante divulgada y se mide la cantidad de la composición fotosensibilizante escindida. La cantidad de la composición fotosensibilizante escindida refleja la cantidad de actividad beta-lactamasa en al menos una célula, y refleja la actividad bioquímica del compuesto químico de ensayo. La cantidad de la composición fotosensibilizante escindida en presencia del compuesto químico de ensayo se compara con la cantidad de la composición fotosensibilizante escindida en ausencia del compuesto químico de ensayo para determinar si el compuesto químico de ensayo aumenta, disminuye o no altera la expresión bajo el control de la secuencia control.

Se puede determinar fácilmente la interacción de la composición fotosensibilizante divulgada concreta con una enzima beta-lactamasa particular. En una realización, dicho método implica poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante para dar lugar a la escisión del enlazador, excitando en una o más longitudes de onda que son adecuadas para los fotosensibilizantes sin inactivar, y determinar el grado de fluorescencia en la muestra. Un grado de fluorescencia que es mayor que una cantidad esperada en ausencia de actividad beta-lactamasa indica que la enzima beta-lactamasa particular puede escindir el compuesto concreto. Se puede determinar la cantidad de fluorescencia esperada utilizando, por ejemplo, una muestra control, o valores control determinados simultáneamente, antes, o después de que se llevó a cabo un ensayo concreto. Dichos valores esperados pueden incluir un análisis estadístico, tal como una media y una desviación estándar, para proporcionar un nivel de confianza estadística seleccionado. Las enzimas beta-lactamasa que se producen naturalmente y las enzimas beta-lactamasa preparadas mediante mutagénesis pueden ensayarse con un compuesto divulgado concreto.

Cualquiera de los anteriores métodos divulgados específicamente, y otros métodos que incluyen el uso de las composiciones fotosensibilizantes divulgadas para detectar la actividad beta-lactamasa puede incluir el uso de los métodos descritos en la patente de Estados Unidos n.º 6.284.461 para aumentar la relación señal a ruido de los ensayos divulgados.

Además, Los compuestos divulgados pueden utilizarse para detectar la actividad beta-lactamasa en una amplia variedad de entornos biológicamente importantes, tales como suero de sangre humana, el citoplasma de las células y los compartimentos intracelulares, que puede facilitar la medición de la enzima beta-lactamasa periplásmica o secretada. Además, la presencia (por ejemplo, en suero humano, pus, orina, u otro fluido, muestra, o tejido) o bacterias resistentes a los antibióticos de beta-lactama puede detectarse fácilmente utilizando los compuestos divulgados. Solo en presencia de una enzima beta-lactamasa activa hay un espectro de fluorescencia que es característico de los fotosensibilizantes. Dichos métodos incluyen poner en contacto en entorno con una composición fotosensibilizante divulgada y detectar cualquier actividad beta-lactamasa presente midiendo el cambio óptico detectable que se produce tras la escisión de la composición fotosensibilizante por una beta-lactamasa. Además, se puede detectar la expresión de cualquier proteína diana fusionando un gen que codifica la proteína diana con un gen de la beta-lactamasa, que se puede localizar mediante inmunotinción o fluorescencia o con el microscopio electrónico. Por ejemplo, se pueden detectar proteínas de fusión de la beta-lactamasa en la luz de los orgánulos mediante el uso de los sustratos descritos en el presente documento. En este caso, solo los compartimentos subcelulares que contienen la proteína de fusión emiten fluorescencia a una longitud de onda característica del sustrato escindido, mientras que todos los otros emiten fluorescencia a una longitud de onda característica de la molécula intacta.

En otro aspecto más, se proporciona un método para evaluar las especificidades del sustrato de diversas beta-lactamasas, es decir, tipar una beta-lactamasa en una de las clases conocidas de las enzimas beta-lactamasas (por ejemplo, tipo A, B, C, o D). En un aspecto, se puede determinar la especificidad del sustrato de una beta-lactamasa poniendo en contacto una serie de composiciones fotosensibilizantes que comprenden una pluralidad de enlazadores diferentes. los enlazadores de la serie de composiciones estabilizantes pueden ser cualquiera de los enlazadores divulgados en el presente documento, por ejemplo, cefalosporina, penicilina, penemo, un carbapenemo o una monobactama monocíclica, junto con otros numerosos, que incluyen cualquier fragmento y/o derivado de los mismos. Los enlazadores que son susceptibles de escindirse representan aquellos compuestos frente a los cuales la beta-lactamasa muestra especificidad por el sustrato. Los enlazadores que no son susceptibles de escindirse representan

aquellos compuestos frente a los cuales las enzimas beta-lactamasas no son eficaces y que no tienen especificidad por el sustrato. Aquellos enlazadores que muestran especificidad por el sustrato representan aquellos antibióticos que no serían eficaces en el tratamiento de una infección producida por un organismo que expresa dichas beta-lactamasas. De esta manera, se puede diseñar un régimen antibiótico adecuado y que reflejaría la especificidad del sustrato concreta de la beta-lactamasa codificada del organismo infectivo. Por tanto, se pueden evitar antibióticos ineficaces.

Se pueden obtener y/o preparar muestras de cualquier fuente adecuada utilizando cualquier medio adecuado para la preparación. Las muestras incluyen, sin limitación, cualquier material biológico que se piensa que contiene una actividad de la enzima de interés, por ejemplo, una beta lactamasa. La actividad de la enzima de interés es, de forma ventajosa, una enzima que confiere resistencia a antibióticos en una bacteria (por ejemplo, una beta-lactamasa). Como alternativa, las muestras incluyen también material en el que se ha añadido una beta-lactamasa. Las muestras pueden ser un fluido biológico, tal como sangre completa, plasma, suero, secreciones nasales, esputo, saliva, orina, sudor, exudados transdérmicos, líquido cefalorraquídeo, o similares. Los fluidos biológicos incluyen también medio de cultivo de tejidos y células en el que un analito de interés se ha secretado en el medio. Como alternativa, la muestra puede ser de órganos completos, tejidos o células procedentes del animal. Los ejemplos de fuentes de dichas muestras incluyen músculo, ojo, piel, gónadas, ganglios linfáticos, corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñón, bazo, timo, páncreas, tumores sólidos, macrófagos, glándulas mamarias, mesotelio, y similares. Las células incluyen sin limitación células procariotas y células eucariotas que incluyen cultivos primarios y líneas de células inmortalizadas. Las células eucariotas incluyen sin limitación células de ovario, células epiteliales, células inmunitarias en circulación, células beta, hepatocitos, y neuronas.

En muchos casos, puede ser ventajoso añadir una pequeña cantidad de un detergente no iónico a la muestra. Generalmente, el detergente estará presente en de aproximadamente 0,01 a 0,1 % en vol. Los detergentes no iónicos ilustrativos incluyen los dioles polioxialquilénados, por ejemplo, Pluronic, Tweens, Triton X-100, etc.

Kits

En otro aspecto, se proporciona un kit, que incluye una o más de las composiciones fotosensibilizantes divulgadas. El kit puede incluir también un componente adicional, por ejemplo, instrucciones para usar las composiciones fotosensibilizantes en uno o más métodos, moléculas adicionales (tales como una beta-lactamasa, o un ácido nucleico que codifica una beta-lactamasa, tal como un vector que tiene una secuencia de beta-lactamasa como un indicador), sustancias (tales como un tampón de reacción), o componentes biológicos (tales como células, o extractos de células). Por ejemplo, las células (por ejemplo, células procariotas, o células eucariotas) que contienen actividad beta-lactamasa y/o al menos un sustrato de beta-lactamasa, así como la composiciones y mezclas de reacción que contienen dichas células, pueden incluirse en los kits. Las células pueden incluir además receptores y moléculas de señalización que regulan la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos en la célula, secuencias que se encuentran tanto en vectores, como en el núcleo o las mitocondrias de las células. Células, composiciones y mezclas de reacción que incluyen al menos uno de los compuestos divulgados son también parte de la divulgación, con respecto a si son parte o no de un "kit" per se.

En algunos aspectos, el kit incluye un soporte sólido unido covalentemente a una composición fotosensibilizante divulgada e instrucciones para detectar una beta-lactamasa en una muestra con el soporte sólido. En otros aspectos, el kit incluye una composición fotosensibilizante divulgada que incluye un grupo reactivo, un soporte sólido e instrucciones que especifican cómo inmovilizar el compuesto sobre el soporte sólido y cómo, después de formar la composición fotosensibilizante inmovilizada, detectar una beta-lactamasa. Como alternativa, el kit incluye un soporte sólido que lleva grupos reactivos que puede reaccionar con e inmovilizar una beta-lactamasa, e instrucciones que especifican cómo inmovilizar las beta-lactamasa al soporte sólido y detectar dichas beta-lactamasas inmovilizadas utilizando una o más de las composiciones fotosensibilizantes de la divulgación. Se presentaron anteriormente los métodos para detectar beta-lactamasas inmovilizadas.

En otro aspecto, el kit puede incluir composiciones para la determinación cuantitativa de una beta-lactamasa en una muestra. En un aspecto, la composición comprende una muestra que contiene una cantidad conocida de una beta-lactamasa (tal como una solución que contiene la cantidad conocida de beta-lactamasa o células que expresan cantidades conocidas de la beta-lactamasa) y una composición fotosensibilizante divulgada, en la que la composición fotosensibilizante reacciona con una beta-lactamasa para producir una respuesta óptica detectable que es proporcional a la cantidad de la beta-lactamasa en la muestra, por ejemplo, una cantidad de un producto fluorescente o la emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de la beta-lactamasa en la muestra.

Las beta-lactamasas que se pueden incluir en un kit de acuerdo con la divulgación pueden ser de cualquier tipo, e incluyen beta-lactamasas que se producen naturalmente y beta-lactamasas que no se producen naturalmente, tales como las divulgadas en Bush et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1211-1233, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Los expertos en la materia apreciarán que los polipéptidos que tienen actividad beta-lactamasa divulgados en el presente documento pueden alterarse mediante, por ejemplo, mutación, delección, y/o adición de uno o más aminoácido y que se pueden usar todavía en la práctica de la invención siempre que el polipéptido retenga la actividad

beta-lactamasa detectable hacia al menos un compuesto divulgado. Un ejemplo de un polipéptido alterado adecuadamente que tiene actividad beta-lactamasa es uno a partir del cual se ha eliminado y/o alterado una secuencia del péptido señal de tal manera que el polipéptido se retiene en el citosol de las células procariotas y/o eucariotas.

- 5 En otro aspecto más, la presente invención y/o la divulgación proporciona un método y un kit para tipar o caracterizar una enzima beta-lactamasa en términos de su especificidad por el sustrato. En esta realización, el kit comprende un compuesto o composición farmacéutica que se desvela en el presente documento. El kit comprende además uno o más antibióticos de beta-lactama competitivos o los derivados de los mismos, tales como cualquiera de los antibióticos de beta-lactama descritos en el presente documento. En la práctica, el kit puede utilizarse generalmente para comparar el nivel de la señal generada mediante reacción de la una o más composiciones fotosensibilizantes con la enzima beta-lactamasa del kit en presencia y ausencia del uno o más antibióticos de beta-lactama competitivos (o los fragmentos o derivados de los mismos). Comparando las señales generadas con y sin el uno o más antibióticos de beta-lactama competitivos, el técnico experto puede determinar la especificidad por el sustrato de la enzima. Se esperaría que una señal reducida (relativa a un valor inicial de una composición fotosensibilizante sin una beta-lactama competitiva) de la composición fotosensibilizante cuando esté en presencia de un antibiótico de beta-lactama competitivo sugiera que el antibiótico de beta-lactama competitivo es un sustrato escindible de la beta-lactamasa, y como tal, no sería eficaz contra una bacteria que expresa la beta-lactamasa ensayada. Por otro lado, se esperaría que una señal sin afectar o sin cambiar (relativa a un valor inicial de una composición fotosensibilizante sin una beta-lactama competitiva) de la composición fotosensibilizante cuando esté en presencia de un antibiótico de beta-lactama competitivo sugiera que el antibiótico de beta-lactama competitivo no es un sustrato escindible de la beta-lactamasa, y como tal, sería eficaz contra una bacteria que expresa la beta-lactamasa ensayada.

- Por tanto, en un aspecto, la presente invención y/o la divulgación proporcionan un método y/o un kit que permite la tipación y/o clasificación de una beta-lactamasa en términos de especificidad por el sustrato con instrucciones para: llevar a cabo una reacción no competitiva que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende una pluralidad de fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en el que el enlazador comprende un sitio de escisión para una beta-lactamasa y en el que los fotosensibilizantes están en un estado inactivado; (b) escindir el enlazador para activar los fotosensibilizantes; (c) activar con luz la composición para producir una señal de fluorescencia; y (d) cuantificar la señal de fluorescencia con un detector.

Ejemplos

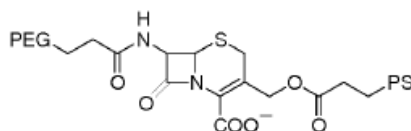
Ejemplo 1.

5 Preparación de una composición fotosensibilizante que comprende un polímero, resto de β -lactama y fotosensibilizante

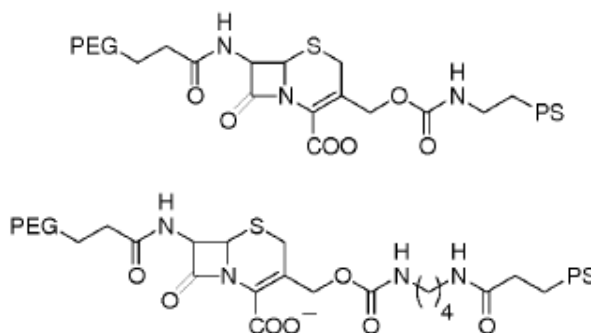
En un enfoque, la síntesis de los conjugados se basa en la cefalosporina, una β -lactama habitualmente utilizada. Se puede pensar en desarrollar posteriormente derivados de penemo o carbapenemo.

En lo sucesivo, el fotosensibilizante (una molécula de porfirina que tiene al menos una cadena lateral propiónica) está representada por PS-CH₂-CH₂-COOH. El polímero utilizado en las rutas sintéticas mostradas a continuación es un poli(etilenglicol) lineal o ramificado con grupos de ácido propiónico (PEG-CH₂-CH₂-COOH) (Senter, P.D., *et al.* (1995) Bioconjug. Chem. 6:389-394). Sin embargo, la química es aplicable a materiales poliméricos similares que contienen cadenas laterales disponibles. Para liberarse mediante hidrólisis enzimática, la molécula de porfirina está unida de forma ventajosa en la posición 3' de la cefalosporina. El resto cefalosporina-porfirina obtenido se puede conjugar a continuación con el polímero usando el grupo amino del anillo de β -lactama.

Se propone la preparación de tres conjugados diferentes, donde la porfirina y la cefalosporina se unen mediante un éster:



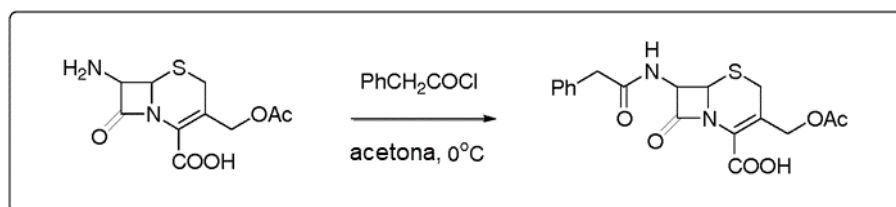
o mediante un grupo carbamato:



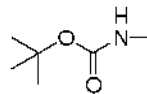
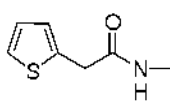
La preparación de un éster de cefalosporina-porfirina comprende las siguientes etapas:

A. Protección del grupo amino en el anillo de β -lactama

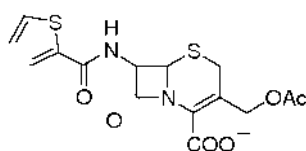
Hay varias formas de proteger el grupo amino. Una se representa a continuación (Hanessian, S., *et al.* (1993) Can. J. Chem. 71:896-906):



Los derivados de cefalosporina protegidos están comercialmente disponibles. Otros grupos protectores incluyen (Albrecht, H.A., *et al.*, (1990) J. Med. Chem. 33:77-86; Albrecht, H.A., *et al.* (1991) J. Med. Chem. 34:2857-2864; Alexander, R.P., *et al.* (1991) Tetrahedron Lett. 32:3269-3272):



Por ejemplo, la siguiente molécula (que viene con un grupo amino protegido) se denomina cefalotina.

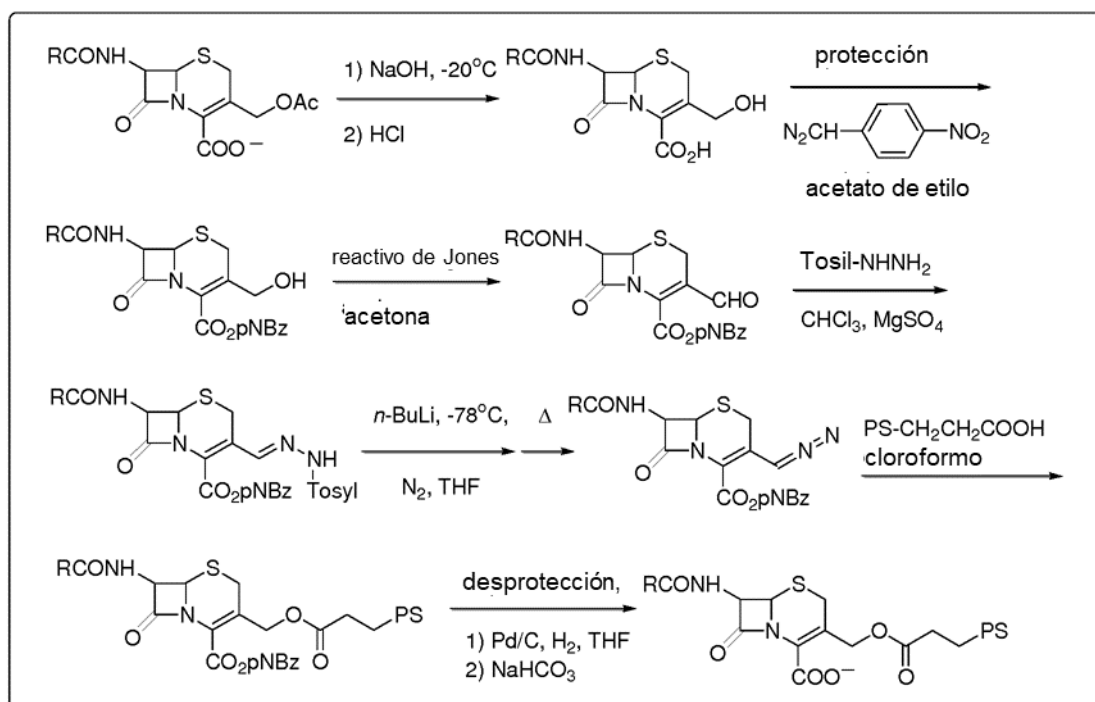


5

B. Unión de la porfirina en la posición 3' de la cefalosporina mediante una función éster

i. A través de un intermedio de diazometilo (Mobashery, S., *et al.* (1986) J. Biol. Chem. 261:7879-7887)

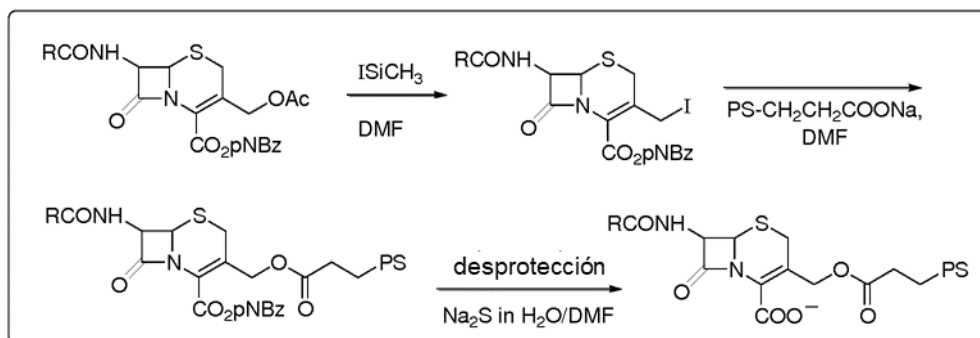
10



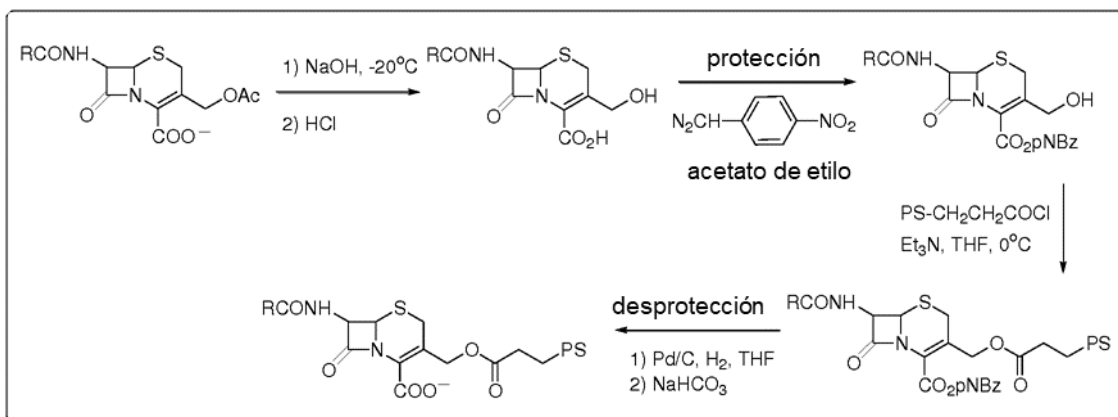
En este esquema, pNBz = para-nitro-bencilo.

ii. A través de un intermedio halogenado (Mobashery, S., *et al.* (1986) J. Biol. Chem. 261:7879-7887)

15

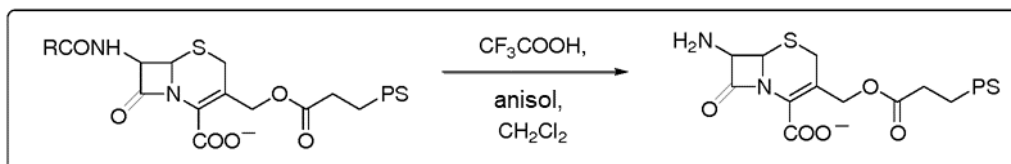


iii. A través de un intermedio de hidroximetilo (Hanessian, S., *et al.* (1993) Can. J. Chem. 71:896-906)



C. Desprotección del grupo amino en el anillo de la β -lactama (Albrecht, H.A., et al. (1991) J. Med. Chem. 34:669-675)

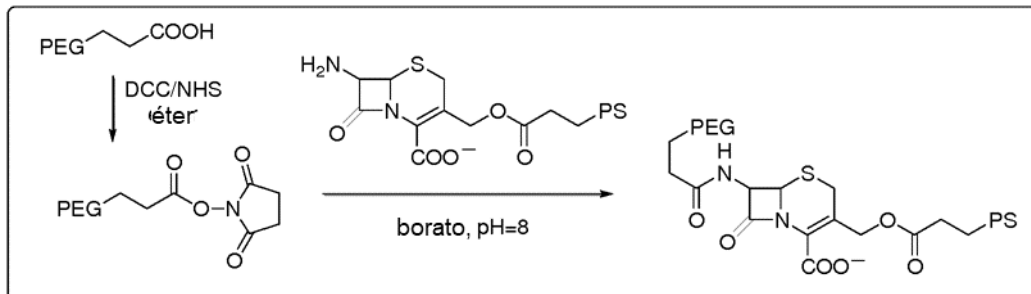
5



La desprotección del grupo amino también se realiza muy frecuentemente usando amidasa de Penicilina G (PGA) (Vrudhula, V.M., et al. (1995) J. Med. Chem. 38:1380-1385).

D. Conjugación del resto cefalosporina-porfirina con un polímero (Senter, P.D., et al. (1995) Bioconjug. Chem. 6:389-394)

10

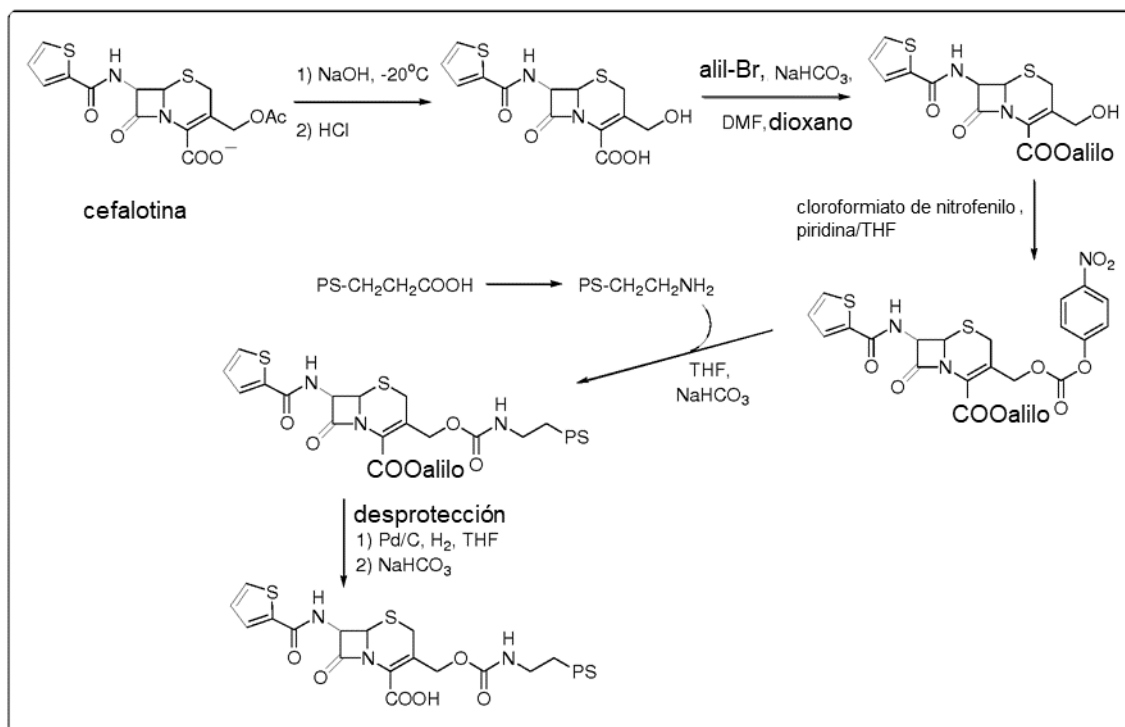


15 La preparación de un carbamato de cefalosporina-porfirina comprende las siguientes etapas:

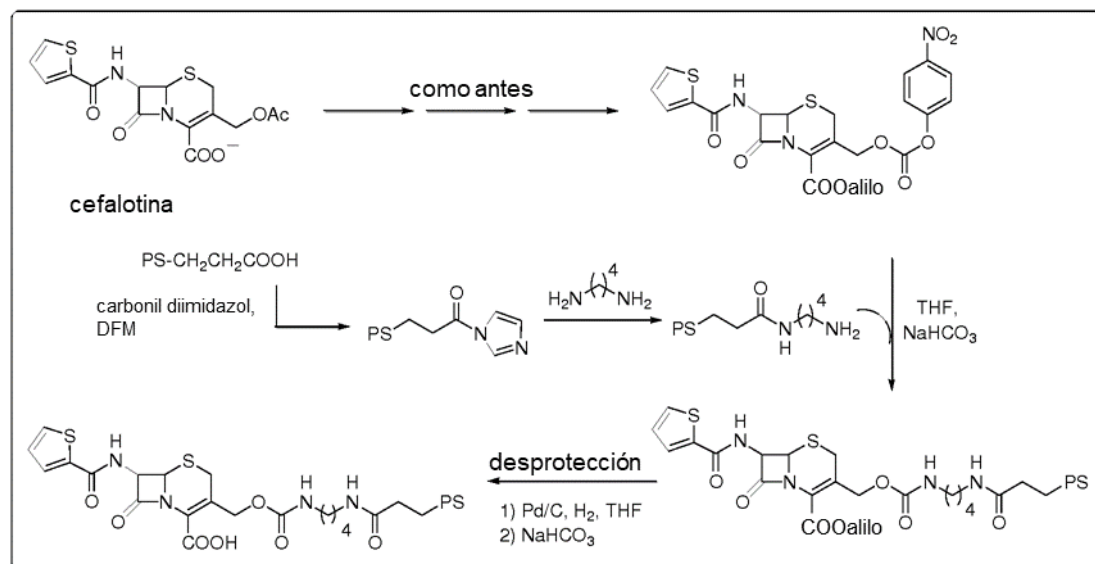
A. Protección del grupo amino en el anillo de β -lactama (véase anteriormente)

B. Unión de la porfirina en la posición 3' de la cefalosporina mediante un carbamato

20 i. Acoplamiento directo entre la porfirina y la cefalosporina (Alexander, R.P., et al. (1991) Tetrahedron Lett. 32:3269-3272; Rodrigues, M.L., et al. (1995) Chem. & Biol. 2:223-227; Smith, K.M., et al. (1987) Heterocycles 26:1947-1963)



ii. Acoplamiento a través de un enlazador (Alexander, R.P., *et al.* (1991) *Tetrahedron Lett.* 32:3269-3272; Rodrigues, M.L., *et al.* (1995) *Chem. & Biol.* 2:223-227; Boutorine, A.S., *et al.* (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118:9469-9476)

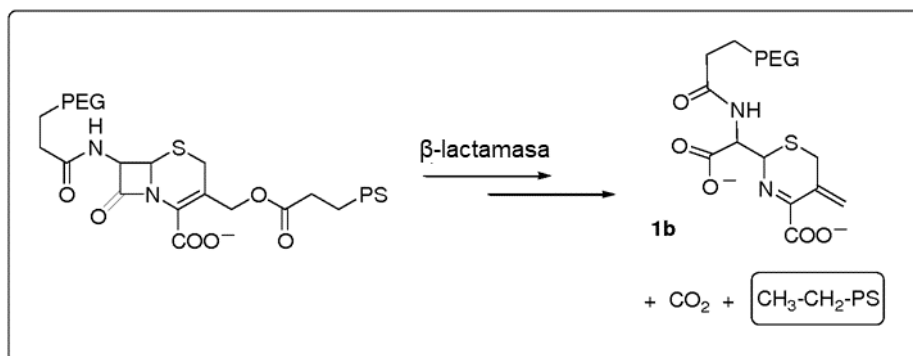


C. Desprotección del grupo amino del anillo de β -lactama (véase anteriormente)

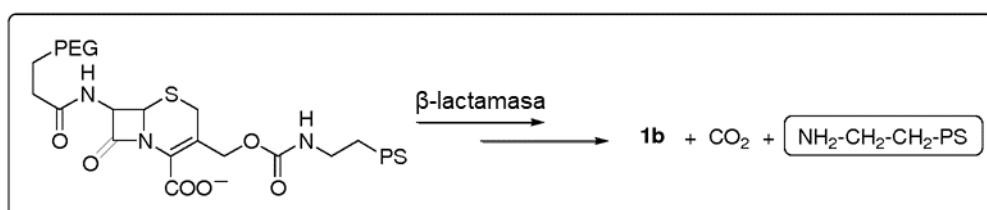
D. Conjugación del resto cefalosporina-porfirina con un polímero (Senter, P.D., *et al.* (1995) *Bioconjug. Chem.* 6:389-394) (véase anteriormente)

Como nota adicional, si, después de estas modificaciones químicas, los derivados de cefalosporina anteriormente descritos conservan sus propiedades como sustratos de las β -lactamasas, se puede esperar observar la liberación dependiente de la enzima de tres restos porfirina diferentes:

PS-CH₂-CH₃.

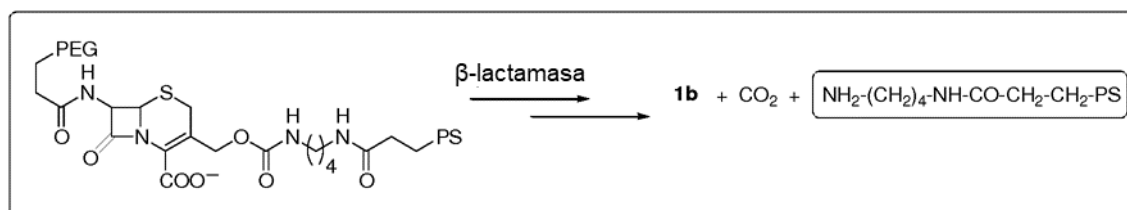


PS-CH₂-CH₂-NH₂:



5

y PS-CH₂-CH₂-CO-NH-(CH₂)₄-NH₂:

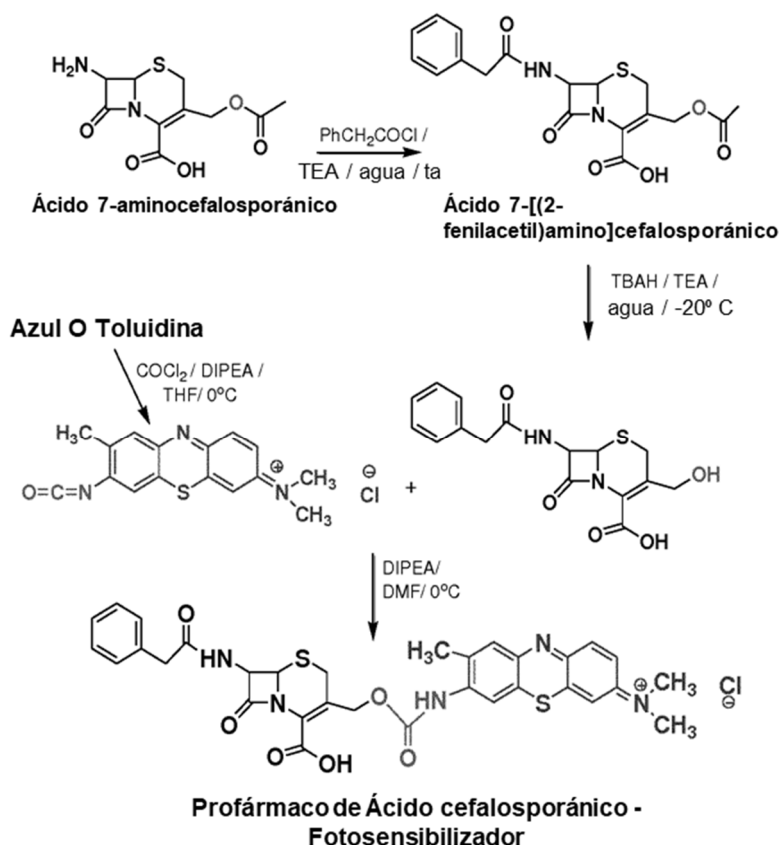


10

Ejemplo 2. Desarrollo del fotosensibilizante unido a carbamato, inactivo (con o sin luz) mientras está unido y es activable por luz solamente cuando se libera mediante escisión mediada por la enzima β -lactamasa

15 A diferencia de los antibióticos convencionales, donde la hidrólisis del anillo de la beta-lactama mediante β -lactamasa produce la inactivación, la apertura del anillo de la beta-lactama de los profármacos libera el fotosensibilizante y lo convierte en activable por luz para fotodestrucción (Figura 1).

Síntesis



El ácido 7-aminocefalosporánico comercialmente disponible se hizo reaccionar con cloruro de fenilacetilo en condiciones de reacción de Shotten-Baumann para conseguir una molécula de cefalosporina con el amino protegido. Esto se desesterificó posteriormente usando hidróxido de tetrabutilamonio como base para proporcionar un grupo hidroxilo final en la cefalosporina fácilmente hidrolizable. La última etapa de la síntesis se consiguió como una secuencia de reacciones en un solo recipiente. El azul de O toluidina (TBO) se convirtió en su derivado de isocianato en presencia de difosgeno. El profármaco unido a carbamato (denominado algunas veces en el presente documento como el profármaco 1) se obtuvo añadiendo un derivado de cefalosporina a la misma mezcla de reacción.

Síntesis de ácido 7-[(2-fenilacetil)amino] cefalosporánico

A una mezcla en agitación de bicarbonato de sodio (2,1 g, 25 mmol) en agua (40 ml) y acetona (30 ml), se añadió ácido 7-(fenilacetil)amino cefalosporánico. Esta solución se agitó durante casi 15 min en un baño de hielo y se añadió lentamente cloruro de fenilacetilo (2,5 ml, 20 mmol) durante el periodo de 30 min. Esta mezcla de reacción se agitó durante toda la noche y se acidificó hasta pH 2,0 con ácido clorhídrico 1 N. El precipitado obtenido se extrajo con diclorometano y se lavó con agua. Se secó con sulfato de magnesio y el disolvente se evaporó para dar un sólido de color crema. La muestra sólida se agitó durante la noche en dietil éter y se filtró para obtener el producto en bruto con un rendimiento del 80 %.

Síntesis de ácido 7-[(2-fenilacetil)amino] 3-hidroximetil cefalosporánico

A una suspensión de ácido 7-[(2-fenilacetil)amino] cefalosporánico (0,5 g, 1,28 mmol) en una mezcla de metano (4 ml) y agua (2,5 ml), se añadió trietilamina (0,21 ml, 1,54 mmol) durante 15 min a 0-5 °C. A esta solución, se añadió hidróxido de tetrabutilamonio (solución al 30 % en agua, 1,53 g, 1,92 mmol) a -18 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo a -18 °C durante casi 7,0 h y se acidificó a pH 5,0 usando ácido acético glacial. La purificación se llevó a cabo con una columna C-18 en fase invertida, y el producto puro se obtuvo en forma de un sólido de color blanco con un rendimiento del 67 %.

Síntesis de profármaco ácido cefalosporánico - azul de O toluidina

A una suspensión magnéticamente agitada de azul de O toluidina (0,1 g, 0,33 mmol) en THF anhidro (3 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió una solución de cloroformiato de triclorometilo (19,7 µl, 0,164 mmol) sobre carbón activo como catalizador. La mezcla de reacción se agitó a 55 °C durante 30 min. El progreso de la reacción se controló por espectroscopia de masas para la formación de un derivado de isocianato de azul de O toluidina. El matraz se enfrió a temperatura ambiente y se añadió a una solución de ácido 7-[(2-fenilacetil)amino] 3-hidroximetil

cefalosporánico (0,15 g, 0,33 mmol) en diclorometano anhidro (1 ml). El matraz de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió lentamente diisopropiletilamina (57,0 µl, 0,33 mmol). Se agitó durante 3,0 h y se purificó usando una columna C18 con acetonitrilo y agua como disolventes de elución. El producto en bruto se obtuvo como un sólido de color azul con un rendimiento del 25 %.

Se obtuvieron los espectros de RMN ¹H obtenidos para el ácido 7-[(2-fenilacetil)amino]cefalosporánico en CDCl₃ como un disolvente, así como para el ácido 7-[(2-fenilacetil)amino] 3-hidroximetilcefalosporánico en DMSO-d₆ como un disolvente (Figura 2). Los espectros de masas se obtuvieron para el ácido 7-[(2-fenilacetil)amino] 3-hidroximetilcefalosporánico y el profármaco de ácido cefalosporánico -azul de O toluidina (Figura 3).

Los espectros UV-visible revelaron un desplazamiento hacia el azul en el espectro de absorción del profármaco, indicando una conjugación extensa, así como la inactivación, del fotosensibilizante de TBO unido a carbamato (Figura 4). El espectro de fluorescencia reveló una reducción de casi 8 veces en la emisión de fluorescencia máxima a una excitación de 635 nm, indicando inactivación cuantitativa del fotosensibilizante tras conjugación con el resto de cefalosporina (Figura 5).

Escisión mediada por la enzima del profármaco

El profármaco obtenido se estudió adicionalmente para determinar la liberación del fotosensibilizante en presencia de β-lactamasa de *Enterobacter cloacae*. Para el estudio de emisión de fluorescencia del profármaco, el disolvente utilizado fue agua, y la longitud de onda de excitación de 635 nm en presencia de la enzima beta-lactamasa (de *Enterobacter cloacae*). La emisión de fluorescencia dependiente del tiempo también se midió para la liberación del fotosensibilizante desde el profármaco en presencia de la enzima. Los resultados indican una liberación sencilla y un aumento de casi 5 veces en las propiedades del estado excitado a los pocos minutos de incubación del profármaco con la enzima (Figura 6).

Por tanto, el profármaco se sintetizó y se caracterizó. Asimismo, el profármaco mostró una inactivación cuantitativa del fotosensibilizante activo en la forma conjugada. Adicionalmente, el producto demostró actividad específica de la lactamasa.

Ejemplo 3.

Construcción y uso de un profármaco fotosensibilizante activado por la enzima beta-lactamasa bacteriana (β-LEAPP)

Antecedentes

La terapia fotodinámica (PDT) es un enfoque emergente para el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos (Hamblin et al., 2004, Photochem. Photobiol. Sci., 3:436-50; Wainwright, J. Antimicrob. Chemother., 1998, 42:13-28). Hay cuatro componentes fundamentales de la PDT: luz, un fotosensibilizante, oxígeno y una diana. Los fotosensibilizantes (PS) son colorantes que absorben la energía de la luz y transfieren dicha energía a una molécula receptora produciendo de esta forma intermediarios moleculares reactivos que destruyen la diana biológica (Hamblin et al., 2004, Photochem. Photobiol. Sci., 3:436-50). La dosis eficaz necesaria para la inactivación de bacterias mediante PDT puede dañar el tejido circundante del hospedador (Gad et al., Photochem. Photobiol. Sci., 2004, 3:451-8). El desarrollo de fotosensibilizantes más específicos para la PDT de infecciones bacterianas reduciría el daño al tejido del hospedador y potenciaría el efecto antibacteriano. Este ejemplo también demuestra que dichos compuestos son útiles para la detección, cuantificación y tipado de una enzima virulenta diana (por ejemplo beta-lactamasa) y se puede usar ventajosamente para determinar un ciclo de terapia con antibiótico adecuada.

La presente invención implica, en un aspecto, el uso de un sustrato de una enzima virulenta hidrolítica bacteriana (por ejemplo, beta-lactamasa) como enlazador (por ejemplo, anillo de beta-lactama) para dos fotosensibilizante o fluoróforos. La proximidad de los fluoróforos enlazados entre sí da como resultado un estado inactivado (no fotoactivo) (véase la Figura 7).

Tras la hidrólisis del sustrato, los fluoróforos se liberan de la inactivación y se vuelven fotoactivos, capaces de absorber energía de la luz y de transferir dicha energía a otra molécula o para liberar dicha energía en la forma de luz fluorescente (véase la Figura 7).

Las fenotiazinas fotoactivas son un grupo de PS tricíclicos que absorben en la región del rojo del espectro electromagnético (Cincotta et al., Photochem. Photobiol., 1987, 46:751-8). EtNBS es un fotosensibilizante de benzo[a]fentiazinio (PS) que es muy fototóxico para un amplio espectro de bacterias (Cincotta et al., Photochem. Photobiol., 1987, 46:751-8). Recientemente, los presentes inventores han sintetizado y caracterizado derivados de la fenotiazina EtNBS que se han funcionalizado mediante conjugación a sustratos de enzimas hidrolíticas producidas específicamente por patógenos y no por el hospedador (por ejemplo, seres humanos) (véase la Figura 7). Cuando el sustrato está intacto, la proximidad de las moléculas de PS entre sí da como resultado una inactivación estática que se define por una reducción en la absorbancia de la luz y en las capacidades de transferencia de energía. Tras la

escisión enzimática de la molécula sustrato, las moléculas PF están separadas y se liberan de la misma de la inactivación. Cuando se liberan, las PS muestran un aumento en la absorbancia y en la capacidad de transferencia de energía. El resultado es un profármaco de PS que está activado en y alrededor de la bacteria infecciosa resistente a fármacos mediante una enzima bacteriana virulenta y/o que es capaz de liberar una señal de fluorescencia cuando se activa mediante luz.

Este ejemplo describe el uso de una composición fotosensibilizante ("β-LEAPP") que comprende dos moléculas de EtNBS conjugadas con la cefalosporina, una molécula sustrato de la beta-lactamasa (véase la Figura 8). El esquema sintético representado gráficamente en la Figura 8 se puede resumir de la siguiente forma: **éster p-metoxibencílico del ácido 7-amino-3-(4-aminofeniltio)metil-3-cefem-4-carboxílico (1)**. El clorhidrato de ACLE (100 mg, 0,247 mmol) se suspendió en diclorometano (DCM, 3 ml) a 0°C. Se añadió trietilamina (40 ul, 0,287 mmol) en tres porciones durante un periodo de 20 min. Se añadió 4-metilmorfolina (NMM, 35 ul, 0,032 mmol), seguido por 4-aminotiofenol (32 ul, 0,3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 2 h después se purificó usando cromatografía en gel de sílice (metanol al 1,5 % en DCM como eluyente) para dar como resultado 46 mg (40 %) de 1 en forma de un sólido de color blanco. **Conjugados EtNBS-ACLE con un grupo protector de p-metoxibencilo (3 y 4)**. EtNBS-COOH (130 mg, 0,3 mmol) y HATU (114 mg, 0,3 mmol) se agitaron en DMF (500 ul) durante 30 min y se añadió **1** (46 mg, 0,1 mmol) a esta mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a 4 °C durante 72 h para permitir la conversión completa del intermedio monosustituido (**2**) al producto disustituido (**3**). El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se disolvió de nuevo en diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó con sulfato sódico. Después de retirar el disolvente, el producto en bruto se purificó en PLC sobre gel de sílice preparativa (metanol al 10 % en DCM como eluyente) para dar 27 mg del conjugado de di-EtNBS **3** (21 %) y 26 mg del conjugado de mono-EtNBS **2** (30 %). El compuesto **3** (6 mg, 0,0046 mmol) se disolvió además en una mezcla de ácido trifluoroacético, anisol y DCM (1,5 ml, 1:1:5) y se agitó a 0 °C durante 2 h. El disolvente se eliminó al vacío y el resto se purificó mediante RP-HPLC para dar **4** (5 mg, rendimiento del 90 %).

La beta-lactamasa es una enzima hidrolítica expresada por muchas bacterias resistentes a antibióticos y no por seres humanos. Los estudios iniciales de los inventores han demostrado que este profármaco fotosensibilizante activado por la enzima beta-lactamasa (β-LEAPP) muestra un efecto antibacteriano PDT *in vitro* contra el MRSA cuando se compara con un *S. aureus* no productor de beta-lactamasa (datos no publicados). Estos hallazgos prometen una ventaja derivada del uso del profármaco en la PDT de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos, por ejemplo, para su uso en el tratamiento del *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (MRSA) y otras infecciones bacterianas resistentes a fármacos.

Un rasgo ventajoso de β-LEAPP es que la escisión hidrolítica que da como resultado la activación también da como resultado un aumento en la emisión de fluorescencia. Durante la experimentación para evaluar la capacidad de varias cepas productoras de beta-lactamasa para activar, (escindir), β-LEAPP, se ha descubierto que el aumento resultante en la emisión de fluorescencia fue rápidamente detectable y proporciona datos cuantitativos. Este hallazgo indicó que β-LEAPP es ideal para la detección y cuantificación de la actividad betalactamasa, entre otros usos.

Detección y cuantificación de la actividad beta-lactamasa

La capacidad de la penicilinas comercialmente disponible para hidrolizar el sustrato β-LEAPP se caracterizó en la Figura 9. Las representaciones gráficas de unidades de fluorescencia en función del tiempo demuestra la dependencia de la fluorescencia de β-LEAPP de la concentración de penicilinas. En los primeros 20 minutos de incubación, las pendientes de todas las representaciones gráficas son significativamente diferentes entre sí (véase la Figura 9). A partir de estos datos, se generó una curva patrón (véase la Figura 10) mediante la representación gráfica de la inversa de la velocidad instantánea del aumento en la fluorescencia de β-LEAPP (1/Vi) en función del inverso de la concentración de penicilinas en unidades por mililitro (1/U*ml⁻¹). La velocidad instantánea (Vi) es la tasa de cambio de la fluorescencia dentro de la región de la curva donde la pendiente es lineal. La región lineal de la curva depende de la concentración de la enzima. Para generar una curva patrón para la fluorescencia de β-LEAPP en función de la concentración de penicilinas, las primeras 20 lecturas, tomadas durante los primeros 20 minutos, mostraron un rendimiento suficiente con un valor de R² de 0,9969 para el ajuste lineal (véase la Figura 10). La ecuación que se corresponde con la línea de tendencia lineal del gráfico doble inverso se puede usar para determinar la actividad beta-lactamasa presente en las muestras experimentales donde y es igual al inverso de la Vi y x es igual a la inversa de U (véase la Figura 10 y la Tabla 1 siguiente).

La capacidad de varias cepas de bacterias, productoras de beta-lactamasa, no productoras de beta-lactamasa, Gram positivas, y Gram negativas, para hidrolizar β-LEAPP se determinó en condiciones idénticas a las utilizadas en el ensayo de la escisión proteolítica mediante penicilinas (véanse las Figuras 11A y 11B). La actividad beta-lactamasa fue detectable en cultivos de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Solamente aquellas cepas bacterianas que producen beta-lactamasa dieron como resultado un aumento en la emisión de fluorescencia durante la incubación con β-LEAPP (véanse las Figuras 11A y 11B).

La diferencia en el nivel de emisión de fluorescencia producida por las cepas productoras y no productoras de beta-lactamasa es evidente (como se muestra en la Figuras 11A y 11B). Todas las cepas productoras de beta-lactamasa de MRSA y la cepa productora de ESBL de *Escherichia coli* mostraron un drástico aumento en la emisión de fluorescencia cuando se compara con el producido por las cepas no productoras de beta-lactamasa. El aumento en la

emisión de fluorescencia debida a la incubación de β -LEAPP con la bacteria no productora de beta-lactamasa fue idéntico al producido por el tampón de reacción en solitario, lo que indica que el aumento marginal fue debido a la menor degradación de β -LEAPP en las condiciones de reacción.

5

Tabla 1.

Los valores de la velocidad instantánea (V_i) de la emisión de fluorescencia de β -LEAPP producida por diversas bacterias productoras de beta-lactamasa se usaron para calcular la cantidad de actividad beta-lactamasa presente en los cultivos bacterianos.				
Cepa	Pendiente (m) o (V_i)	$1/V_i$	$1/\text{Unidades de actividad} \cdot \text{ml}^{-1}$	Unidades de actividad/ml
MRSA 8179	0,635756	1,57293	0,811415	1,232415
MRSA 8150	0,4423	2,260909	1,266883	0,789339
MRSA 9307	0,466859	2,141973	1,188143	0,841649
ATCC BAA196	0,338173	2,957069	1,727768	0,578782

Discusión

Hay más de 500 beta-lactamasas diferentes conocidas, y más de 200 de estas son beta-lactamasas con un espectro extendido (ESBL) (Paterson et al., Clin. Microbio. Rev. 2005, 18:657-686). Los sustratos comercialmente disponibles para la detección de la beta-lactamasa bacteriana producen un cambio colorimétrico tras la hidrólisis, donde el color del sustrato cambia de tono o de intensidad. Los sustratos nitrocefina y centa, por ejemplo, muestran ambos un cambio colorimétrico cuando se hidrolizan con la beta-lactamasa. El primero, nitrocefina, se distribuye en la forma de discos de papel impregnados. La aplicación de una colonia de bacterias al disco da como resultado el desarrollo de un color rosa. Estos métodos conocidos de la técnica anterior proporcionan una detección cualitativa (sí/no), pero no proporcionan ninguna información con respecto a la cantidad relativa de actividad enzimática o cualquier percepción en el tipo de actividad de la beta lactamasa. La cantidad de actividad de la beta-lactamasa y la especificidad por el sustrato de esta actividad son consideraciones importantes en la determinación del tratamiento con antibióticos adecuado para pacientes que padecen de infecciones bacterianas resistentes a fármacos. El ensayo con el disco de nitrocefina en solitario no proporciona información suficiente para determinar el ciclo de terapia adecuado en un escenario clínico. Centa se distribuye en la forma de una sal pulverulenta y también proporciona información cualitativa, con un coste más razonable, pero requiere una amplia incubación de los cultivos líquidos para que aparezca el color.

La hidrólisis enzimática de β -LEAPP da como resultado un aumento en la emisión de fluorescencia, proporcionando de esta forma un cambio detectable más sensible que el de los sustratos colorimétricos. Esta característica permite la cuantificación rápida de la actividad de la enzima y también tiene el potencial para usarse en la identificación de la especificidad del sustrato para diferentes enzimas beta lactamasas. El uso de β -LEAPP con este fin permite avances significativos no solamente para el investigador de la beta-lactamasa bacteriana, sino también para la caracterización clínica de la actividad de beta-lactamasa en que proporciona información más útil. El investigador puede determinar la cantidad de actividad beta-lactamasa y la especificidad de sustrato de dicha actividad simultáneamente mientras que los sustratos comercialmente disponibles actuales solamente proporcionan una respuesta cualitativa. La duración del ensayo para determinar la cantidad de actividad de la enzima que tiene una cepa de bacteria productora de beta-lactamasa en particular puede ser de aproximadamente 20 minutos o incluso menos. Mediante la inclusión de varias beta-lactamas en el tampón de ensayo, se crea una competición entre β -LEAPP y la beta-lactama para unir el sitio activo de la enzima. Mediante la computerizada de emisión de fluorescencia con el tiempo entre las reacciones competitivas y no competitivas, el investigador puede determinar si una bacteria infecciosa concreta es capaz de hidrolizar el sustrato competidor. El uso de β -LEAPP en un papel de diagnóstico clínico proporciona al investigador información valiosa de si la bacteria infecciosa tiene o no la capacidad de hidrolizar las cefalosporinas de espectro extendido en un periodo de tiempo relativamente corto. Esta información es fundamental para que el especialista clínico determine el ciclo de terapia con antibiótico adecuado y podría dar como resultado un resultado mejorado para el paciente al reducir la cantidad de tiempo necesario para dichas evaluaciones.

Ejemplo 4.

Síntesis de β -LEAPP

Este ejemplo describe la síntesis de una composición fotosensibilizante (" β -LEAPP") que comprende dos moléculas de ETNBS conjugadas con la cefalosporina, una molécula sustrato de la beta-lactamasa (véase la Figura 8).

50

Fundamento

La fotosensibilidad de la fenotiazina se inactiva ventajosamente cuando se libera del inactivador unido a cefalosporina en presencia de β -lactamasa. Se reconocen ampliamente dos mecanismos de inactivación. Uno es la inactivación

estática (estado fundamental), conseguida mediante la homodimerización o la heterodimerización de los fluoróforos. La otra es la inactivación dinámica (estado excitado), que se puede conseguir mediante la transferencia de energía de resonancia de Foster (FRET). En este ejemplo, la composición fotosensibilizante, β -LEAPP, se sintetizó usando un mecanismo de inactivación estático. Sin embargo, el mismo diseño también se puede adaptar con facilidad a la inactivación FRET.

La homodimerización (par PS-PS) era ventajosa en este ejemplo respecto a la heterodimerización (par PS-inactivador) por al menos las dos siguientes razones: 1) se sintetiza fácilmente; 2) la escisión de cada profármaco (β -LEAPP) generará dos PS, por tanto en teoría, se puede conseguir el doble de fototoxicidad y/o señalización fluorescente.

El componente fotosensibilizante de β -LEAPP (también denominado en el presente documento como "profármaco 2") es 5-(4'-carboxibutilamino)-9-dietilaminobenzo[a]fenotiazina (EtNBS-COOH), que fue desarrollada por los inventores, y ha demostrado tener excelente eficacia fotosensibilizante. El grupo carboxilo del extremo con la cadena de alquilo flexible proporciona un sitio ideal para la conjugación. El éster de p-metoxibencílico del ácido 7-amino-3-clorometil-3-cefem-4-carboxílico (ACLE, comercialmente disponible) se usó como estructura principal de la cefalosporina. ACLE es un material de partida habitual para sintetizar derivados de cefalosporina. Integra un grupo amino en la posición 7. Cuando se sustituye el cloro en posición 3' por 4-amino-tiofenol se proporciona un grupo amino adicional, por tanto, cada molécula de ACLE puede aceptar dos moléculas de EtNBS-COOH para formar un par de inactivación estático.

Instrumentación

Los RMN de ^1H y ^{13}C se registraron en un instrumento Varian de 400 MHz, usando 15-20 mg de material en CDC13 o DMSO- d_6 como disolventes. Los espectrómetro de masas ESI se registraron en un espectrómetro Bruker Daltonics Esquire 3000 plus. Los espectros de absorción UV-Visible se registraron con un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453 provisto de un sistema detector de matriz de diodos. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron en soluciones acuosas/orgánicas de productos usando un fluorómetro Jobin Yvon Horiba FluoroMax-3. El análisis por HPLC se llevó a cabo usando un Shimadzu VP series de SCL 10A como controlador, detector de matriz de diodos SPD-M10A, bombas LC-10AD, desgasificador DGU-14A y una columna C18 en fase invertida controlada por el programa informático Class VP.

Síntesis y caracterización de β -LEAPP

El ACLE comercialmente disponible es una sal de clorhidrato. Se trató el ACLE con una base suave, dando como resultado la liberación del grupo amino en la posición 7, que rápidamente experimenta acilación. El cloro en la posición 3' de ACLE se desplazó con 4-aminotiofenol. Como grupo saliente excelente, el resto tiofenol facilitó la fragmentación después de la hidrólisis con β -lactamasa, y el grupo amino del tiofenol introdujo un sitio de acoplamiento adicional. EtNBS-COOH se acopló a ambos grupos amino en las posiciones 7 y 3' de hexafluorofosfato de O-(7-Azabenzotriazol-1-il)-N,N,N,N'-tetrametiluronio (HATU) como reactivo de acoplamiento. Un tratamiento posterior con TFA en presencia de anisol proporcionó el profármaco 2 no protegido con rendimiento excelente. La purificación del producto se llevó a cabo con RP-HPLC. El profármaco 2 se caracterizó mediante espectroscopía de RMN y espectrometría de masas.

Fenómeno de inactivación

La concentración de los componentes en los conjugados de profármaco se analizó rutinariamente mediante espectroscopia de absorción (entre 200 nm y 800 nm) en soluciones equimolares diluidas de los materiales de partida (EtNBS-COOH y ACLE) y el profármaco sintetizado. El fenómeno de inactivación de la fluorescencia en el profármaco con respecto al EtNBS-COOH se demostró usando experimentos de emisión de fluorescencia. Soluciones equimolares de EtNBS-COOH y profármaco se compararon a una excitación de 655 nm con barrido de emisiones en el intervalo de 655 nm a 800 nm.

Liberación del fotosensibilizante controlada por lactamasa

Dos enzimas comerciales, una β -lactamasa de *Enterobacter cloacae* y una penicilinas de *Bacillus cereus* se usaron para demostrar la liberación y la desinactivación. Para este estudio, se trataron soluciones de los profármacos con las unidades necesarias de ambas enzimas. La emisión de fluorescencia dependiente del tiempo, que indica la liberación del fotosensibilizante del conjugado, se registraron y se compararon con el fotosensibilizante libre. El fotosensibilizante liberado se analizó después para determinar su fotosensibilidad usando un kit de detección de especies reactivas con el oxígeno de Invitrogen (Posner et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, 123:869-873; Thompson et al., Methods Enzymol., 1986, 133:569-584; Li et al., J. Biol. Chem., 1998, 273:2015-2023) o usando dihidroetidio como sonda de oxidación (Dolgachev et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, 332:411-417).

Resultados anticipados

Se anticipa que β -LEAPP conseguirá un rendimiento satisfactorio para más del 95 % de pureza. Debido a la muy corta distancia entre dos fotosensibilizantes, se anticipa una elevada eficacia de inactivación. También se anticipa que β -LEAPP muestra una recuperación de la eficacia en las propiedades del estado excitado (tales como fluorescencia, rendimiento de oxígeno singlete, efecto citotóxico) tras la escisión enzimática / liberación del fotosensibilizante.

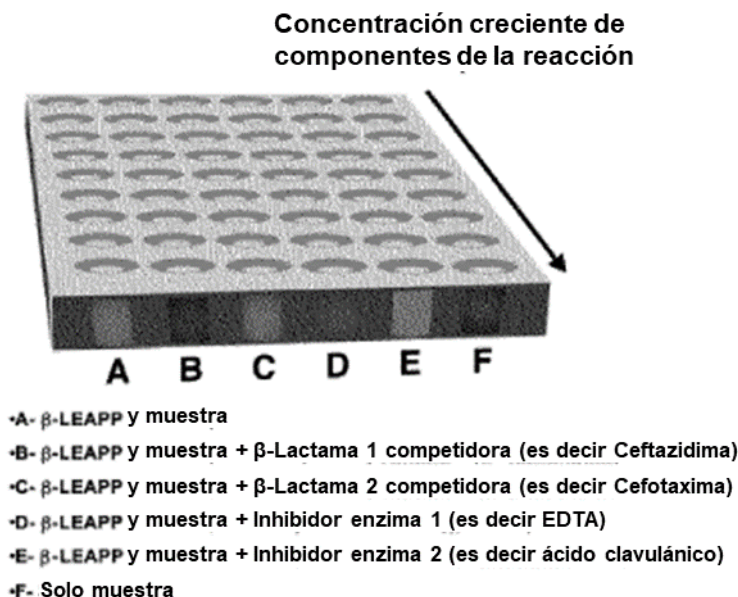
Ejemplo 4.

(Profético) Uso de β -LEAPP para determinar la especificidad del sustrato en una muestra de beta-lactamasa.

El siguiente ejemplo describe cómo determinar la especificidad de un enzima beta-lactamasa dada.

Métodos

Cualquier placa ópticamente transparente multipocillo adecuada, es decir, una placa de cultivo de 96 pocillos, se puede usar de acuerdo con este ejemplo para llevar a cabo las reacciones para determinar la especificidad del sustrato enzimático. Se describe a continuación una configuración adecuada:



Gran velocidad inicial = mayor emisión de fluorescencia
Relación de velocidades iniciales diferentes para enzimas

Configuración: "Dilución en serie Criss-Cross"

Se prepararon concentraciones en serie de β -LEAPP de la izquierda a la derecha de la placa, o de la parte de arriba a la parte de abajo de la placa. Se depositaron concentraciones en serie de sustratos competidores de la izquierda a la derecha de la placa, o de la parte de arriba a la parte de abajo de la placa: Estas incluyen preferentemente todos los antibióticos de beta-lactama. Concentraciones en serie de inhibidores de beta-lactamasa de la izquierda a la derecha de la placa, o de la parte de arriba a la parte de abajo de la placa: Estos incluyen ácido clavulánico, sulbactama, y tazobactama **Adición de la muestra y control de la fluorescencia:** Se compararía la velocidad en el cambio de emisión de fluorescencia en función del tiempo para cada condición experimental y se determinaría la especificidad de la enzima.

Ejemplo 5.**Uso de β -LEAPP para determinar la funcionalidad β -lactamasa en un ensayo de inhibición de sustrato competidor.**

Debido al solapamiento y características similares de muchas beta-lactamasas, se ha vuelto importante y crítico para el desarrollo de regímenes de antibiótico adecuados tener un medio para distinguir entre diferentes beta-lactamasas asociadas con agentes bacterianos infecciosos, por ejemplo, *S. aureus* con resistencia multifármaco. Está bien establecido que las beta-lactamasas se puede caracterizar por sus interacciones con inhibidores y sustratos (véase Molecular Bacteriology: protocols and clinical applications, Ed. Woodford et al., Humana Press 1998, Capítulo 26: Biochemical and Enzyme Kinetic Applications for the Characterization of β -lactamases, David J. Payne y Tony H. Farmer, pp. 513-537, incorporado en el presente documento por referencia). Por ejemplo, las beta-lactamasas se puede caracterizar por sus velocidades de hidrólisis de diferentes sustratos de beta-lactama (por ejemplo, penicilina, ampicilina, etc.) a concentraciones fijas o en función de la determinación de la I_{50} (la concentración de inhibidor que inhibe la actividad hidrolítica de una beta-lactamasa en un 50 % en comparación con un control).

Otros métodos conocidos se refieren a determinar la susceptibilidad (por ejemplo, concentraciones inhibitoras mínimas - MIC) de bacterias respecto a las beta-lactamas individuales, seguido por la determinación de su susceptibilidad a las combinaciones de beta-lactamas (como se recomienda por el Clinical Laboratory Institute). Dicho enfoque implica y, de hecho, requiere crecimiento bacteriano, y, por lo tanto, necesita al menos aproximadamente 20 horas para conseguir resultados fiables. Este tipo de enfoque se describe además en Farber et al., 2008, "Extended-spectrum Beta-lactamase detection with different panels for automated susceptibility testing and with a chromogenic medium", J Clin Microbiol 46:3721-7 y Spanu et al., 2006, "Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in Enterobacteriaceae isolates", J Clin Microbiol, 44: 3257-62, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia.

Como muchas de las técnicas normalizadas para caracterizar las beta-lactamasas son normalmente lentas y/o necesitan el crecimiento bacteriano, serían deseables métodos que sean sensibles, rápidos, y fáciles de usar.

Este Ejemplo describe una nueva metodología para usar en la caracterización de beta-lactamasas mediante el uso de un ensayo de inhibición con sustratos competitivos. Se cree que en la actualidad no se usa ningún ensayo de inhibición con sustratos competitivos para determinar la funcionalidad beta-lactamasa en los laboratorios de microbiología clínica.

Este nuevo enfoque se basa en aprovechar la sensibilidad y el mecanismo del compuesto β -LEAP de la invención. Más en particular, este enfoque se basa en medir el nivel de fluorescencia inducida producida mediante la escisión/hidrólisis y posterior activación del compuesto β -LEAP por enzimas beta-lactamasa en evaluación mientras están también en presencia de, o "en competición" con, diferentes tipos y cantidades de sustratos de enzima beta-lactamasa. Se determina el grado de inhibición de la hidrólisis de β -LEAP/fluorescencia debido a la competición con los sustratos competidores de la beta-lactama, lo que proporciona la base para determinar la funcionalidad beta-lactamasa.

Los métodos para fabricar el β -LEAP y sus propiedades de inactivación/activación se describen en otra parte de la presente solicitud (por ejemplo, véase el Ejemplo 3) y por los inventores en Zheng et al., 2009, "Exploiting a bacterial drug-resistance mechanism: a light-activated construct for the destruction of MRSA," Angew Chem Int Ed Engl, 48: 2148-51, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad).

Este enfoque implicó combinar un formato en placa de ensayo de 384 multipocillos e beta-lactamasa purificada de *B. cereus* o suspensiones bacterianas con el β -LEAP y un sustrato competidor de beta-lactama, incluidos amoxicilina, ácido clavulánico, ampicilina, penicilina G, carbenicilina, cefazolina, cefatoxima o ceftazidima. Para la enzima beta-lactamasa purificada de *B. cereus* y las suspensiones de bacterias completas, las cefalosporinas (ceftazidima, cefatoxima, y cefalotina) fueron inhibidores más eficaces de la hidrólisis de β -LEAP/fluorescencia de lo que fueron las penicilinas (amoxicilinas, ampicilina, penicilina G, y carbenicilina) (Fig. 13a, que muestra las constantes de inhibición (K_i) de un panel de beta-lactamas para la inhibición con sustratos competitivos de la hidrólisis de β -LEAP por la beta-lactamasa de *B. cereus*; y la Fig. 13b, que muestra las constantes de inhibición (K_i) de un panel de beta-lactamas para la inhibición con sustratos competitivos de la hidrólisis de β -LEAP mediante suspensiones bacterianas). Estos resultados se correlacionan con los obtenidos usando un ensayo MIC (concentración inhibidora mínima) convencional (véase la Fig. 13d, que muestra las MIC de un panel de beta-lactamas de *B. cereus*) y proporcionó más información útil. De manera importante, los efectos inhibidores de la ampicilina y la amoxicilina sobre la hidrólisis de β -LEAP se detectaron usando un ensayo de inhibición competitiva de β -LEAP; sin embargo, ni la ampicilina ni la amoxicilina dieron como resultado ninguna inhibición del crecimiento *in vitro* (Fig. 13d, sin inhibición mediante amoxicilina, ácido clavulánico o ampicilina, no se muestran los datos).

Estos resultados indican que β -LEAP se puede usar para identificar la funcionalidad de las enzimas β -lactamasa cuando los ensayos que se basan en el crecimiento bacteriano no pueden. En consecuencia, el ensayo de inhibición competitiva basado en la inhibición de la hidrólisis de β -LEAP (es decir, disminución en la fluorescencia) es una manera

rápida y sensible con respecto a los métodos conocidos anteriores, por ejemplo, los métodos MIC, mediante los que se caracteriza la funcionalidad de una enzima beta-lactamasa dada procedente bien de una fuente purificada o de una muestra de suspensión bacteriana.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la actividad de una enzima beta-lactamasa en una muestra, que comprende:

poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en donde el enlazador comprende un sitio de escisión de la enzima beta-lactamasa, en donde los fotosensibilizantes, cuando se acoplan juntos mediante el enlazador, están en estado inactivado, y en donde los fotosensibilizantes incluyen una pluralidad de fotosensibilizantes del colorante bodipy; y fotoactivar la muestra para inducir una señal que se va a liberar de los fotosensibilizantes sin inactivar y detectar la señal.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra biológica aislada de una infección en un sujeto.

3. El método de la reivindicación 2, en el que la infección está producida por un patógeno resistente a antibióticos.

4. Un método para determinar la especificidad del sustrato de una enzima beta-lactamasa en una muestra, que comprende:

poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende dos fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en donde los fotosensibilizantes incluyen una pluralidad de fotosensibilizantes del colorante bodipy, en donde el enlazador comprende un sitio de escisión de una enzima beta-lactamasa y en donde los fotosensibilizantes se inactivan cuando el sitio de escisión está intacto pero se desinactivan cuando el sitio de escisión está escindido; y determinar si el enlazador está escindido, en donde la escisión del enlazador indica que el enlazador es un sustrato de la enzima beta-lactamasa.

5. El método de la reivindicación 4, en el que la etapa de determinar si el enlazador está escindido comprende además detectar una primera señal producida por el fotosensibilizante sin inactivar.

6. El método de la reivindicación 5, que comprende además llevar a cabo una segunda reacción que comprende: poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante y un antibiótico de beta-lactama; detectar una segunda señal producida por el fotosensibilizante sin inactivar de la segunda reacción; y comparar la primera y la segunda señales, en donde el antibiótico de beta-lactama se identifica como un sustrato de la enzima beta-lactamasa cuando la primera señal es mayor que la segunda señal.

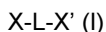
7. Un método de tipación de una enzima beta-lactamasa en una muestra, que comprende:

llevar a cabo una reacción competitiva que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante que comprende dos fotosensibilizantes que se conjugan con un enlazador, en donde los fotosensibilizantes incluyen una pluralidad de fotosensibilizantes del colorante bodipy, en donde el enlazador incluye un sitio de escisión para una beta-lactamasa y en donde los fotosensibilizantes están en un estado inactivado; (b) escindir el enlazador para activar los fotosensibilizantes; (c) activar con luz la composición para producir una señal de fluorescencia; y (d) cuantificar la señal de fluorescencia con un detector para obtener un resultado, llevándose a cabo la reacción competitiva en presencia de un antibiótico de beta-lactama competidor; y comparar el resultado de la reacción competitiva con un patrón para tipar la beta-lactamasa.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el patrón se determina llevando a cabo una reacción no competitiva que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una composición fotosensibilizante; (b) escindir el enlazador para activar los fotosensibilizantes; (c) activar con luz la composición para producir una señal de fluorescencia; y (d) cuantificar la señal de fluorescencia con un detector para obtener un patrón.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 o 6 a 8, en el que la señal es una emisión de fluorescencia inducida por la iluminación del fotosensibilizante del colorante bodipy sin inactivar con una longitud de onda de excitación.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición fotosensibilizante está representada por la fórmula (I):



en la que X y X' son fotosensibilizantes del colorante bodipy y L es el enlazador.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el enlazador comprende una cefalosporina.

12. El método de las reivindicaciones 1, 10 u 11, en el que la composición comprende además un resto director, que puede dirigir la composición a un patógeno o a una célula hospedadora infectada con un patógeno.

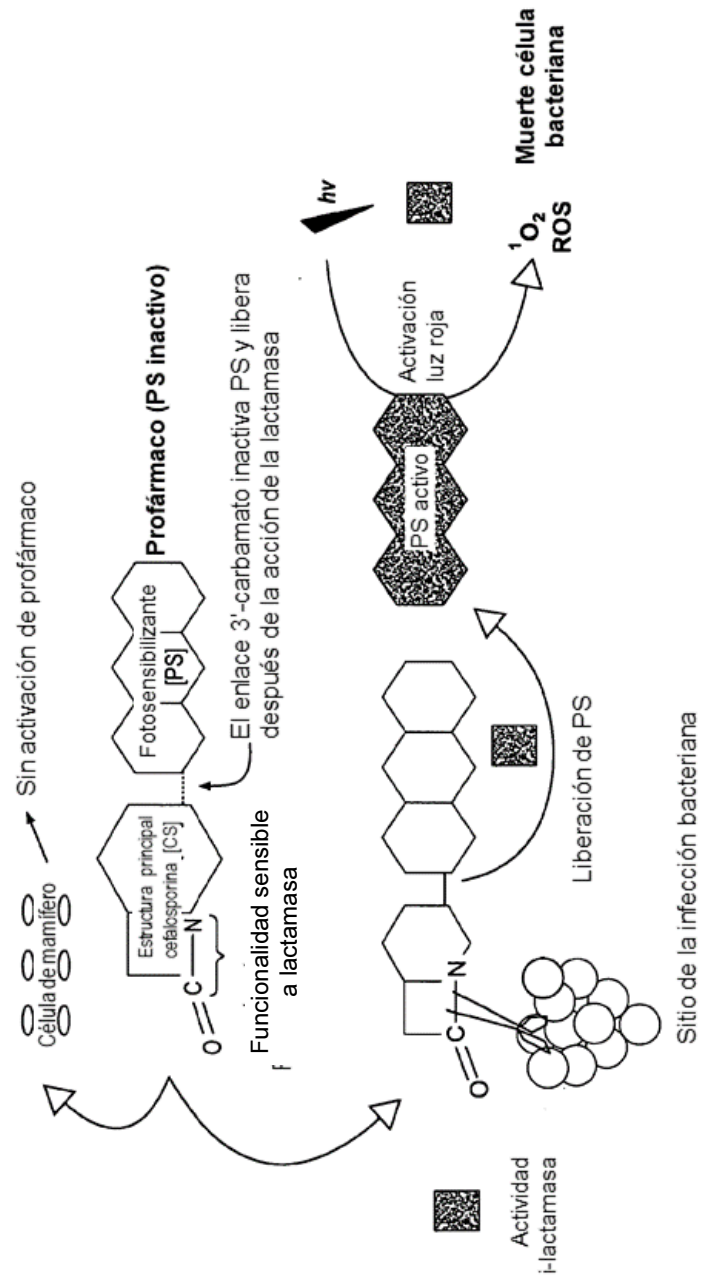


FIG. 1

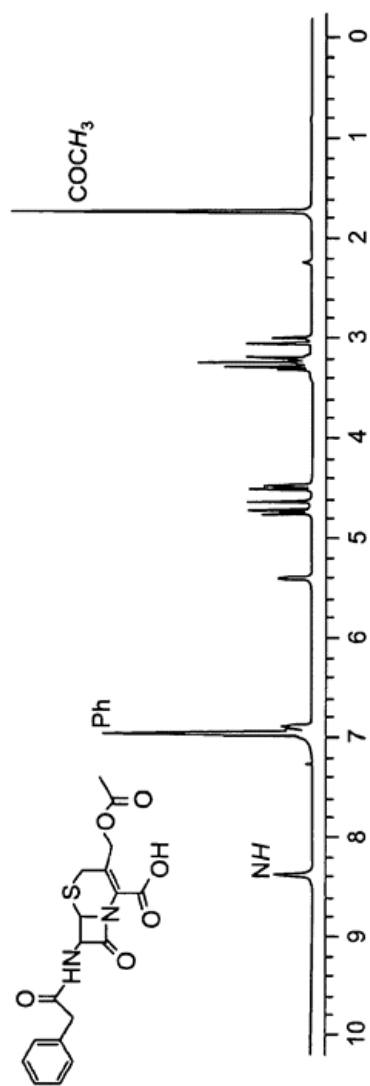


FIG. 2A

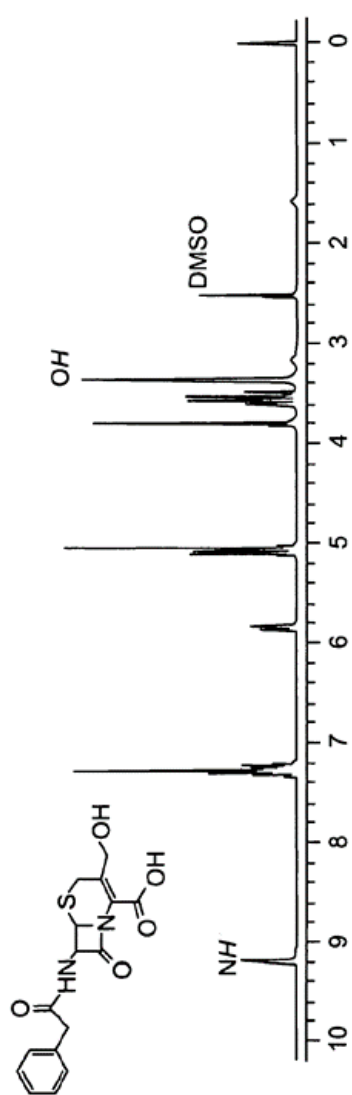


FIG. 2B

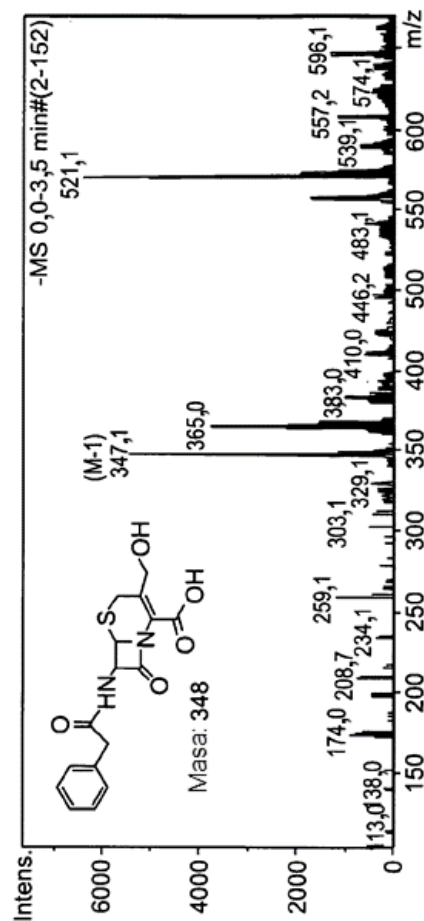


FIG. 3A

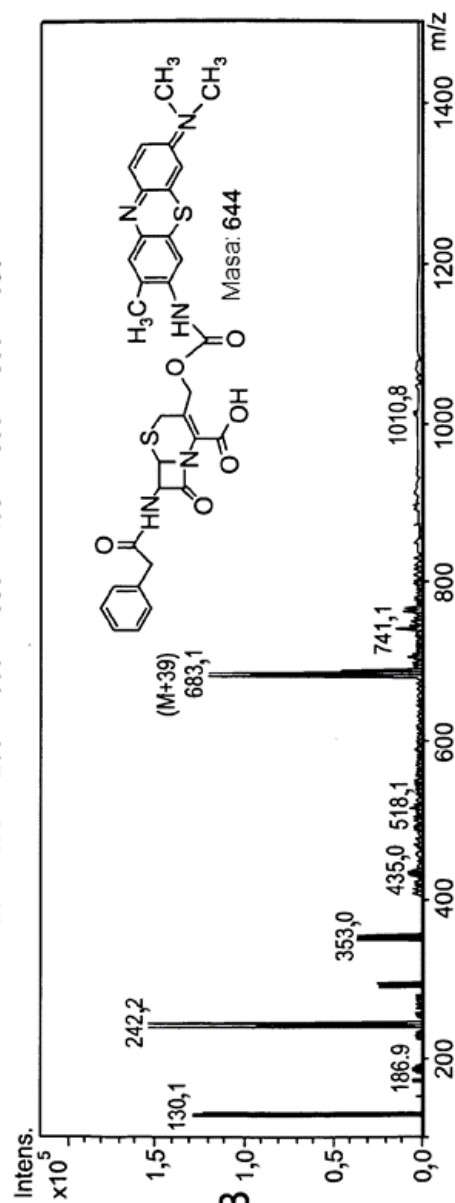


FIG. 3B

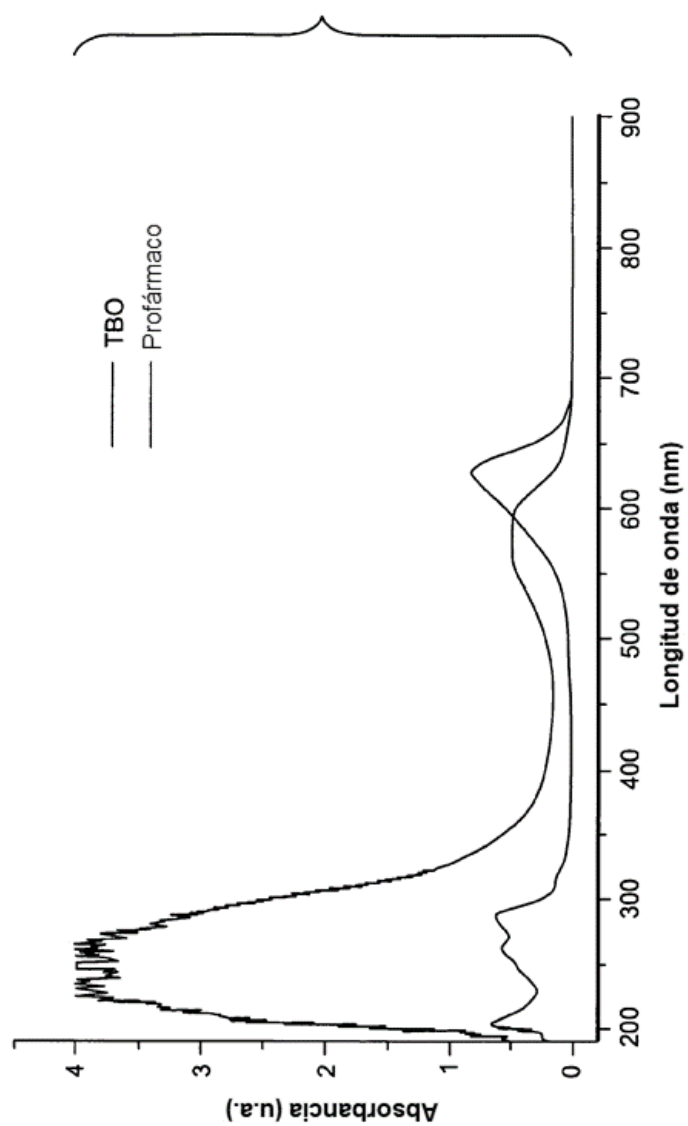


FIG. 4

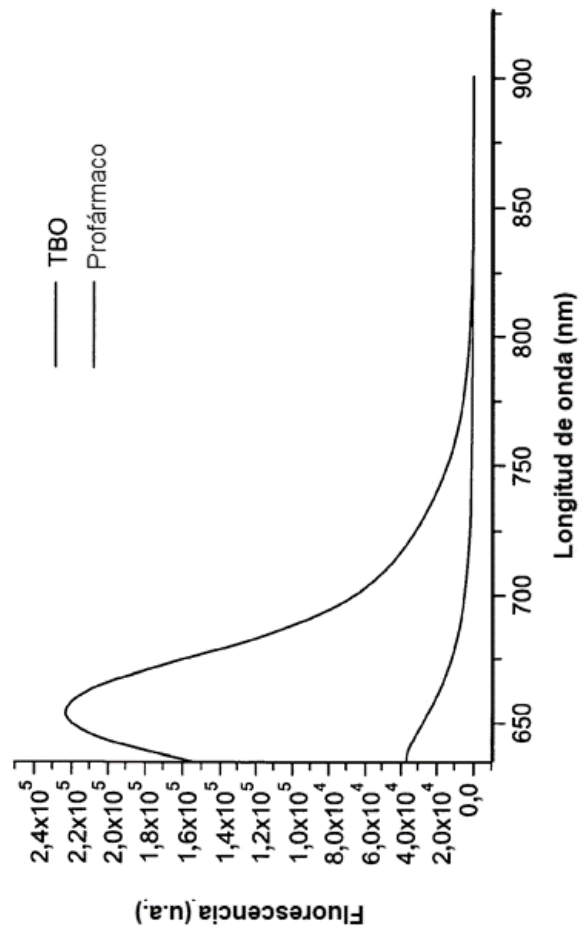


FIG. 5

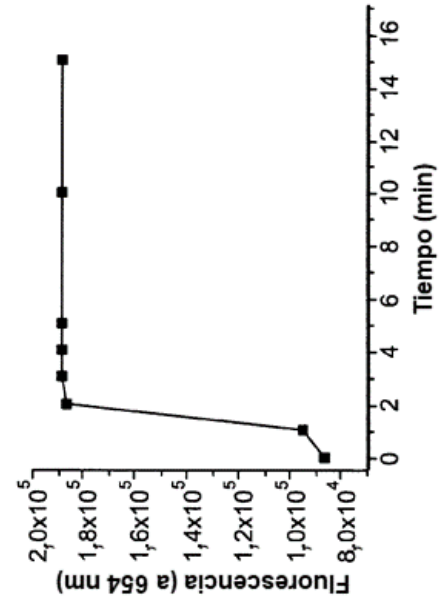


FIG. 6B

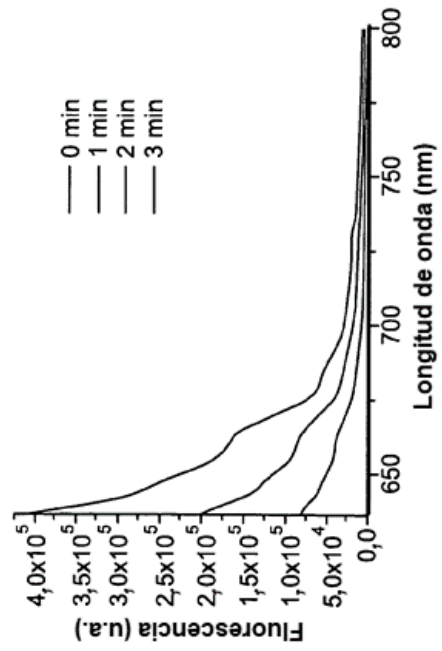


FIG. 6A

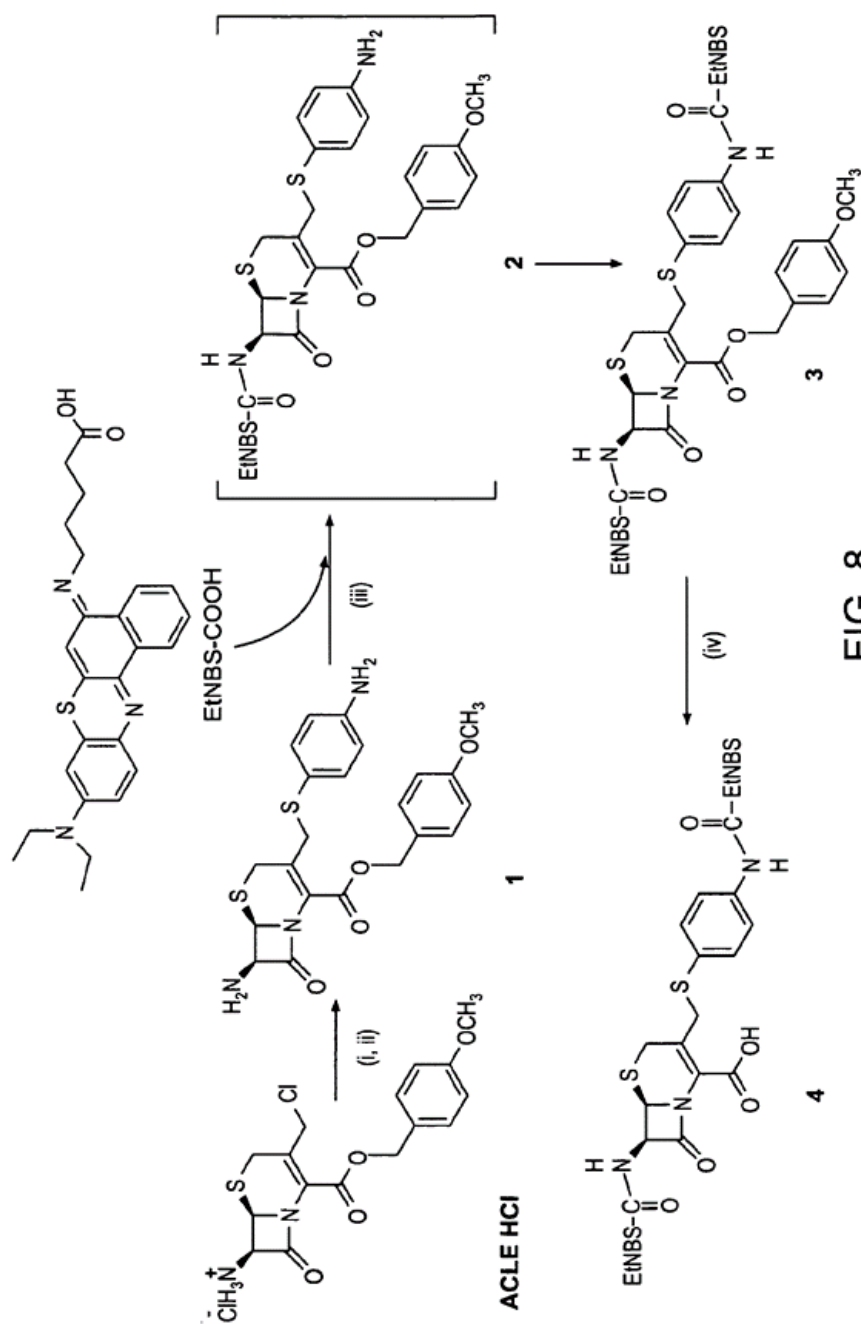


FIG. 8

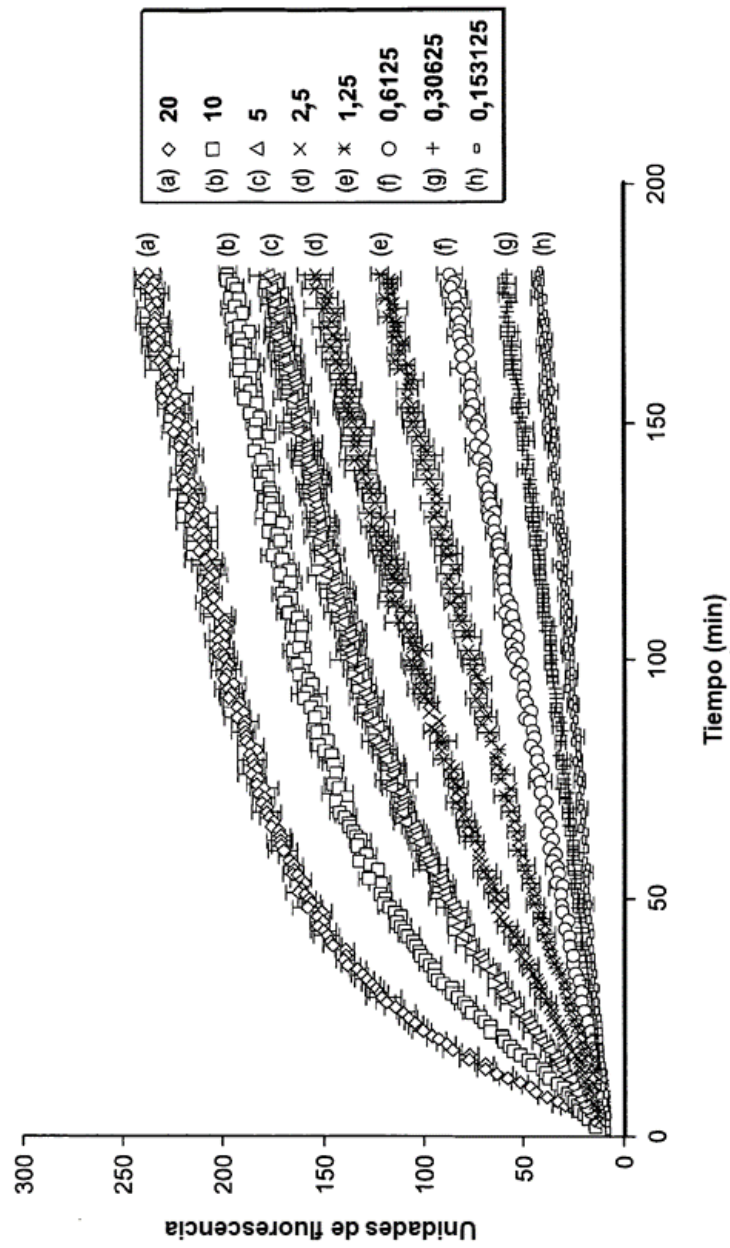


FIG. 9

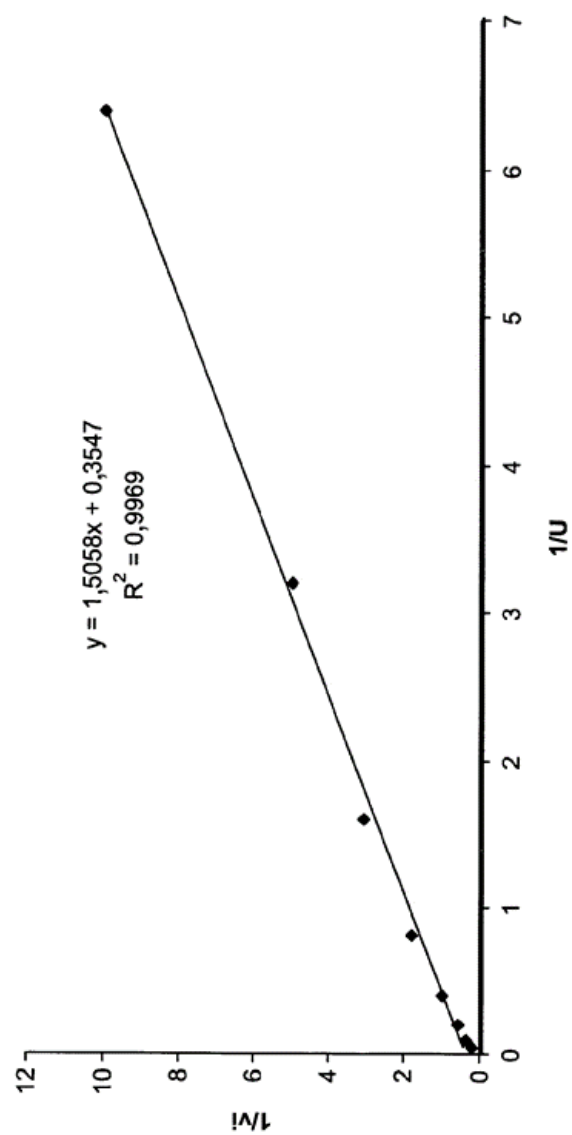


FIG. 10

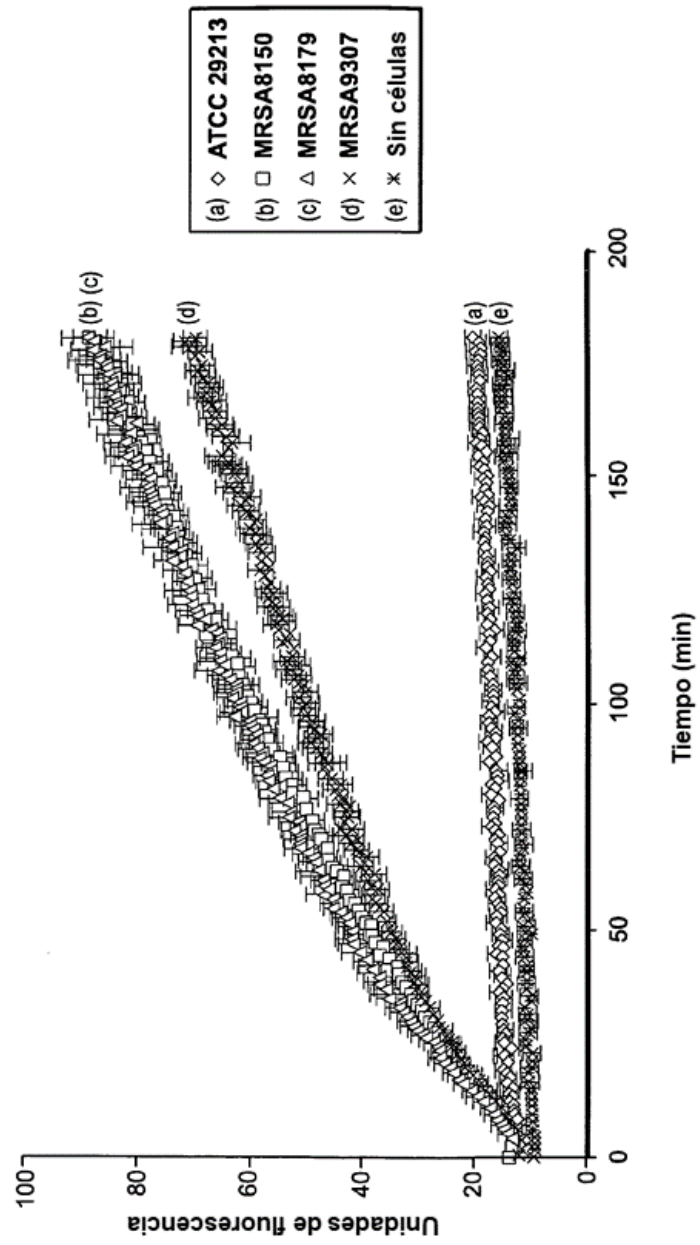


FIG. 11A

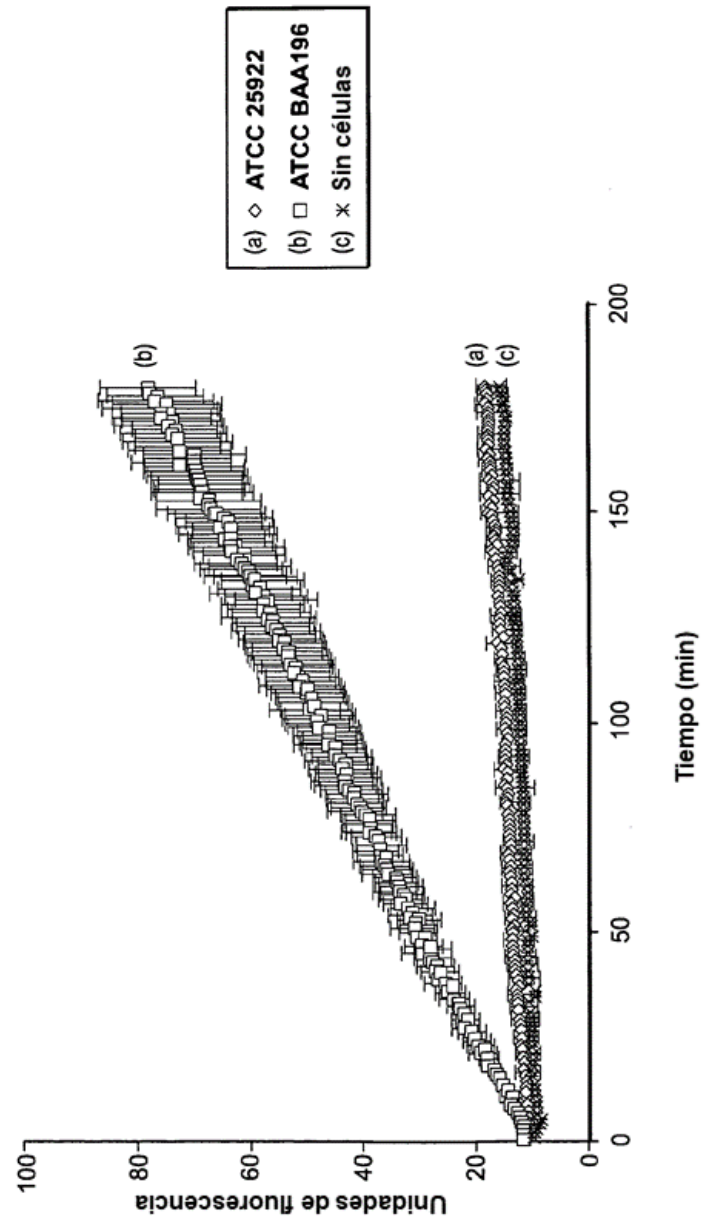
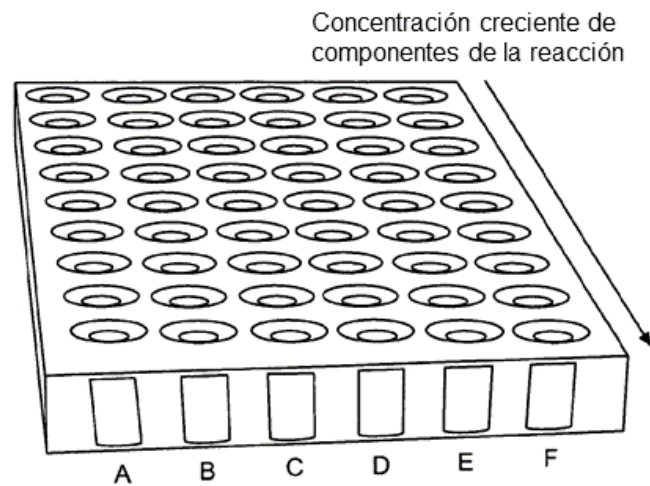


FIG. 11B

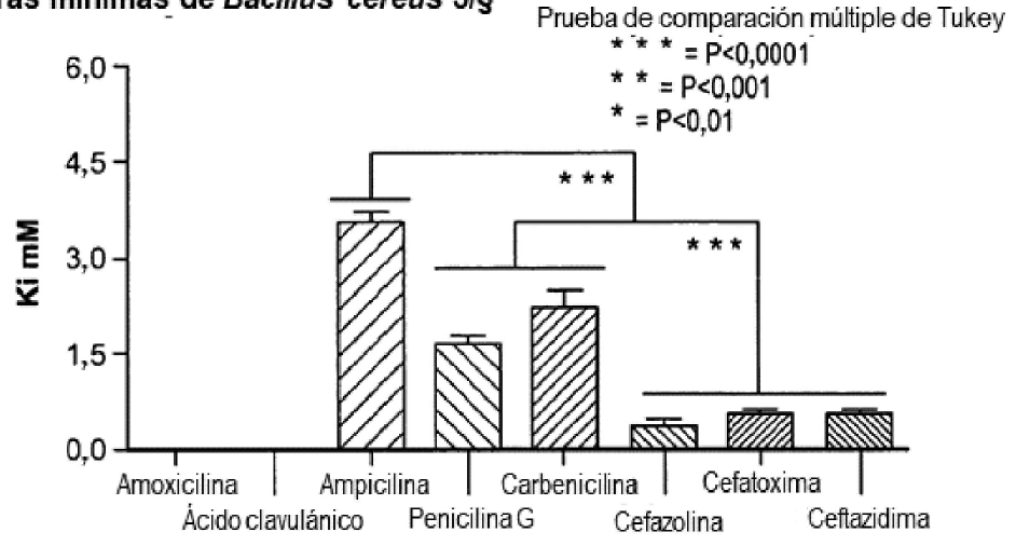


- A- β -LEAPP y muestra
- B- β -LEAPP y muestra + β -Lactama 1 competidora (es decir Cefotaxima)
- C- β -LEAPP y muestra + β -Lactama 2 competidora (es decir Cefotaxima)
- D- β -LEAPP y muestra + Inhibidor enzima 1 (es decir EDTA)
- E- β -LEAPP y muestra + Inhibidor enzima 2 (es decir ácido clavulánico)
- F-Solo muestra

Gran velocidad inicial = mayor emisión de fluorescencia
Relación de velocidades iniciales diferentes para enzimas

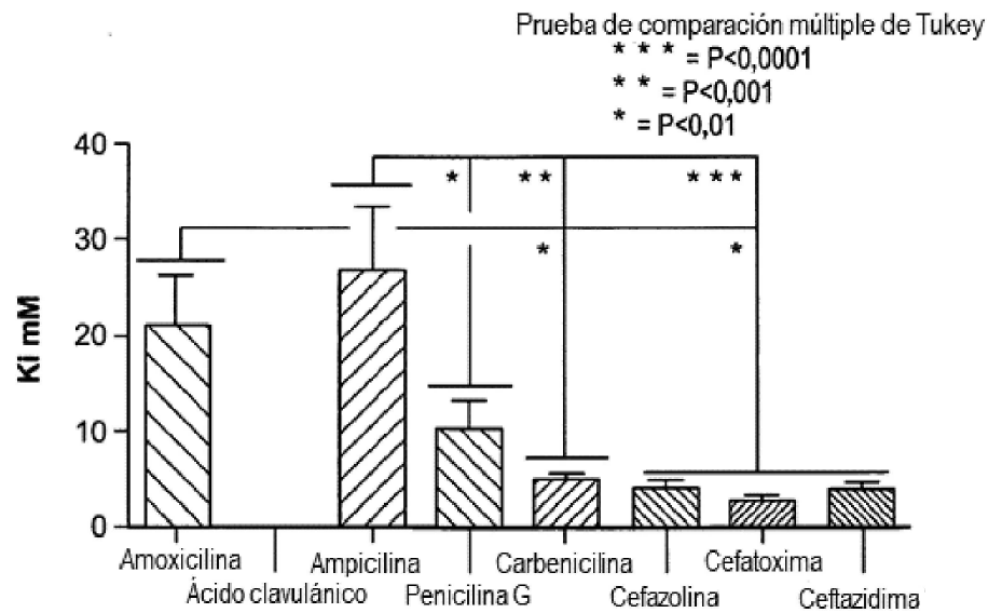
FIG. 12

Comparación de constantes de inhibición para β -Lactamasa pura y suspensiones bacterianas, con perfiles de inhibición y concentraciones inhibidoras mínimas de *Bacillus cereus* 5/§



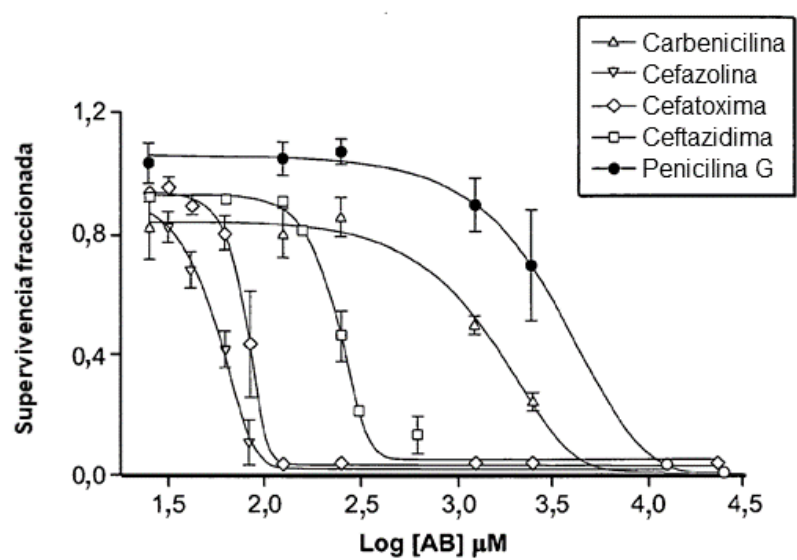
constantes de inhibición para un panel de β -lactamas para el sustrato competitivo
 inhibición de la hidrólisis de β -LEAP mediante la β -lactamasa de *B. cereus*

FIG. 13A



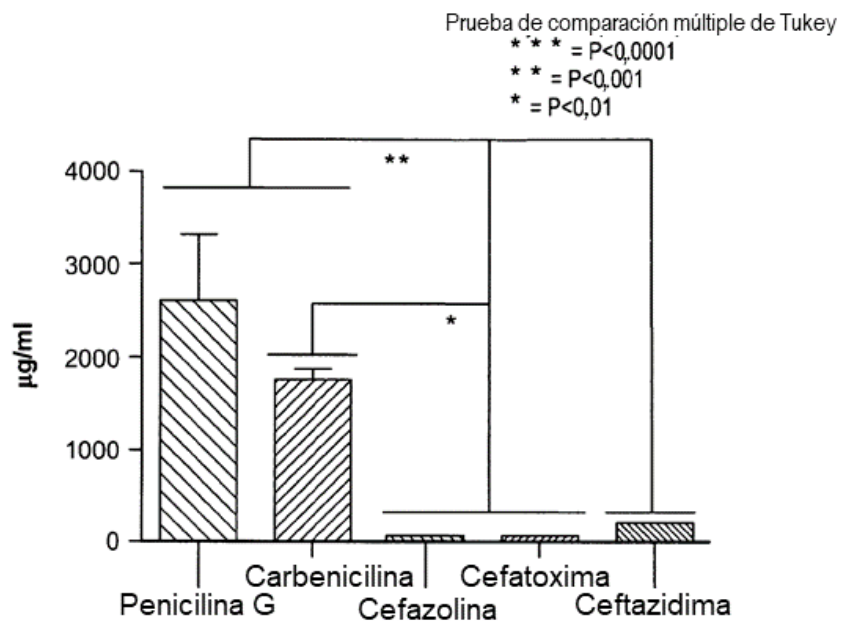
constantes de inhibición para la hidrólisis de β -LEAP mediante suspensiones bacterianas

FIG. 13B



perfiles de inhibición para el panel de β -lactamas de *B. cereus*

FIG. 13C



MIC del panel de β -lactamas de *B. cereus*. Amoxicilina, ácido clavulánico y ampicilina no inhibieron el crecimiento de *B. cereus* y no se incluyeron en (c.) y (d.) La significación estadística se determinó mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey usando Graphpad Prism 5. Las barras horizontales conectadas por intersecciones sólidas indican diferencia significativa

FIG. 13D