(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 24 072 T2** 2008.11.06

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 438 423 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 24 072.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB02/04799**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 770 099.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/035900**
(86) PCT-Anmeldetag: **24.10.2002**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **01.05.2003**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.07.2004**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.12.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.11.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/34*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
0125532 **24.10.2001** **GB**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(73) Patentinhaber:
Burton, Michael, Warrington, Cheshire, GB

(74) Vertreter:
Habermann, Hruschka & Schnabel, 81679 München

(72) Erfinder:
Burton, Michael, Warrington, Cheshire WA2 8QU, GB

(54) Bezeichnung: **ENZYMAKTIVITÄTSINDIKATOREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Fachgebiet

[0001] Die Erfindung betrifft Enzymsubstrate, die verwendet werden, um eine Enzymaktivität zu detektieren.

Stand der Technik

[0002] Es ist ein breit gefächertes Angebot an Enzymsubstraten beschrieben worden, die einen Nutzen zur Detektion von mikrobieller Aktivität und/oder Enzymaktivität aufweisen (S. F. Dealler, Reviews in Medical Microbiology, 1993, 4, 198–206). Diese Substrate können entweder natürliche Substanzen (z. B. Esculin und Indoxylsulfat) oder synthetische Moleküle (z. B. 4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranosid, 4-Nitrophenyl-β-D-glucuronid) sein. Diese Substrate enthalten Einheiten, die entweder fluorogen oder chromogen sind (oder nach der Entwicklung mit einem anderen Reagens werden) und einen anderen Anteil, wie z. B. ein Kohlenhydrat, eine organische Säure (gewöhnlich als ein Ester), eine inorganische Säure (typischerweise einen Phosphat- oder Sulfatester) oder eine Aminosäure, der durch spezifische Enzyme in den untersuchten Systemen gespalten werden kann. Die Spaltung des Substrats führt zur Freisetzung des fluorogenen oder chromogenen Anteils. Dieser abgespaltene Anteil erzeugt, entweder für sich allein oder nach Behandlung mit einem Entwicklungsreagenz oder -reagenzien, Fluoreszenz oder Farbe und kann so das Vorhandensein der spezifischen Enzymaktivität nachweisen. In Testsystemen, die in geeigneter Weise angelegt sind, kann diese Aktivität verwendet werden, um Mikroorganismen zu identifizieren und auszuzählen.

[0003] Eine der am weitesten verbreiteten Reihen von fluorogenen Enzymsubstraten basiert auf 4-Methylumbelliferon (die 4MU-Substrate). Zum Beispiel hat 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG) zur Detektion von β-Glucuronidase(GUS)-positiven Stämmen von E. coli (M. Manafi et al., Microbiological Reviews, 1991, 55, 335–348) umfangreiche Anwendung in mikrobiologischen Kulturmedien gefunden. Dieses und andere 4MU-Substrate leiden jedoch trotz ihrer hohen Sensitivität unter mehreren Nachteilen. Ein Nachteil besteht darin, dass die Intensität der Fluoreszenz pH-abhängig ist. Eine andere bedeutende Einschränkung dieser Substrate auf zu Platten gegossenem mikrobiellen Kulturmedien besteht darin, dass das freigesetzte 4-Methylumbelliferon in den allgemein verwendeten auf Agar basierenden Systemen weit diffundiert, und dies macht es schwierig, positive Kolonien aus einer gemischten Kultur herauszusuchen. Andere verbreitete fluoreszente Markierungen umfassen Resorufin und Fluorescein. Diese Substrate haben ebenfalls Nachteile, einschließlich der Ausbreitung. Ein weiteres Problem besteht in der Schwierigkeit, sie in einer angemessen reinen Form im industriellen Maßstab herzustellen. Alle fluorogenen Markierungen sind durch die Notwendigkeit eingeschränkt, UV-Auflicht zu verwenden, um ihre Gegenwart zu detektieren.

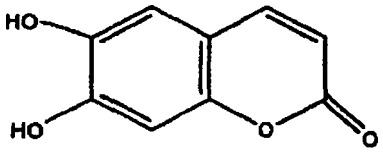
[0004] Chromogene Substrate, die auf p- und o-Nitrophenol basieren (PNP- bzw. ONP-Substrate), sind ebenfalls sehr gut etablierte Indikatoren für spezifische Enzymaktivitäten. Das gelbe Nitrophenolat, das bei Spaltung erzeugt wird, ist sehr geeignet für flüssige Kulturmedien, aber die Intensität der Farbe ist, wie bei den fluoreszenten 4MU-Substraten, pH-abhängig und die Diffusion auf Agarmedium ist erheblich (M. Manafi, Int. J. Food Microbiol., 1996, 31, 45–58).

[0005] 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) ist eines der am weitesten verbreiteten Substrate und wird verwendet um β-Galactosidase nachzuweisen, zu verschiedenen Zwecken, zum Beispiel in Klonierungsexperimenten unter Einbeziehung des LacZ-Gens und bei der Detektion von verschiedenen coliformen Bakterien. Die enzymatische Spaltung dieses Substrats erzeugt zunächst 5-Brom-4-chlorindoxyl. Obwohl dieses nicht selbst chromogen ist, kann es mit einem anderen Molekül von freigesetztem 5-Brom-4-chlorindoxyl über einen oxidativen Prozess reagieren und so einen unlöslichen blaugrünen indigoiden Farbstoff bilden (S. Cotson und S. J. Holt, Proc. Roy. Soc. B., 1958, 148, 506–519). Bei Anwendung in auf Agar basierenden Medien erscheinen X-Gal-positive mikrobielle Stämme als leicht erkennbare blaugrüne Kolonien bei minimaler Diffusion des Farbstoffs in das umliegende Medium. Das Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-α-D-galactopyranosid (X-α-Gal) wird verwendet, um α-Galactosidase-Aktivität in Genexpressionsstudien mit Hefe zu detektieren.

[0006] Das Indoxyl-Chromophor kann durch die Einführung eines Halogenatoms in die 6-Position des Indolrings modifiziert werden, sodass es stärker rote oder amethystfarbene Schattierungen erzeugt. Auf diese Weise können von 6-Chlor-3-indolyl abgeleitete Substrate als Alternativen zu den X-Substraten verwendet werden. Des Weiteren ist es bei Anbindung von verschiedenen Kohlenhydraten oder anderen enzymatisch spaltbaren Molekülen an die X- bzw. die 6-Chlor-3-indolyl-Gruppen möglich gewesen, mikrobiologische Kulturmedien herzustellen, die sowohl Mikroorganismen nachweisen als auch zwischen mindesten zwei separaten Mi-

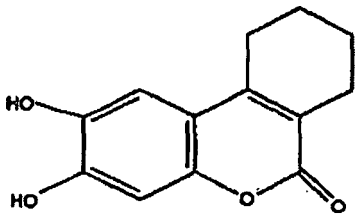
kroorganismen in einem Gemisch unterscheiden (J. N. Roth und W. J. Ferguson, US Patent Nr. 5 210 022 [1993]; D. G. Flowers und M. Sternfeld, US Patent Nr. 5 364 767 [1994]). Die verschiedenen Arten von Indoxyl-Substraten haben jedoch verschiedene Raten der Hydrolyse und Oxidation. Als eine Konsequenz erzeugen 6-Chlor-3-indolyl-Substrate schwach gefärbte Kolonien und es tritt zudem im Vergleich zu den entsprechenden X-Substraten mehr Diffusion in das umliegende Medium auf. Ein weiterer Nachteil der Indoxyl-Substrate besteht darin, dass sie, weil der farbige Farbstoff unter oxidativen Bedingungen erzeugt wird, nicht zur Detektion von Mikroben geeignet sind, die strikt anaerobe Bedingungen für das Wachstum erfordern.

[0007] Andere Klassen von Substraten sind auf die Fähigkeit eines Moleküls, das nach Spaltung freigesetzt wird, angewiesen, um ein unlösliches farbiges Chelat in der Gegenwart eines geeigneten Metallions zu bilden. Eine derartige Verbindung ist 8-Hydroxyquinolin (8HQ). 8HQ-β-D-Glucosid ist verwendet worden, um β-Glucosidaseaktivität zu bestimmen (A. L. James et al. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol., 1987, Ser A 267, 188–193), aber es sind Toxizitätsprobleme aufgetreten (A. Albert et al., Br. J. Exp. Pathol., 1953, 34, 119–130). Eine weitere Verbindung dieser Art ist Esculetin (6,7-Dihydroxy-2H-1-benzopyran-2-on) (1).



(1)

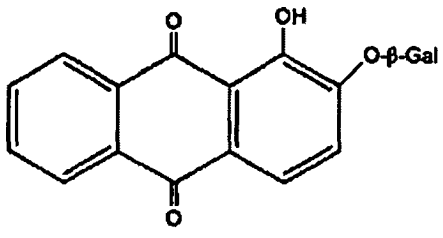
[0008] Esculin (Esculetin-6-β-D-glucopyranosid) ist eine weit verbreitet verwendete Sonde für die Detektion von β-Glucosidaseaktivität in mikrobiellen Systemen (z. B. Listeria – Bestimmung). Wenn es in einem festen Medium in Verbindung mit, unter anderem, einem geeigneten Eisensalz verwendet wird, bildet das freigesetzte Esculetin ein Chelat, das bei β-Glucosidase-positiven Stämmen deutlich sichtbare braune Kolonien entstehen lässt. Jedoch kommt es immer noch zu einiger Diffusion in das Medium. Das Problem der Diffusion wurde erst überwunden (A. L. James et al., J. Appl. Microbiol., 1997, 82, 532–536; A. L. James und L. Armstrong, WO 97/41138) durch die Synthese von neuen Esculetin-Derivaten, in denen das bizyklische System an den 3- und/oder 4-Positionen substituiert wurde. Das führende Beispiel, von dem berichtet wurde, war zu einem trizyklischen System ausgearbeitet worden, und zwar dem 3,4-Cyclohexenoesculetin (CHE) (2).



(2)

[0009] Wenn sie in einem eisenhaltigen festen Medium angewendet werden, ergeben CHE-Substrate intensiv schwarze Chelate. Die optimale Konzentration jedoch, die erforderlich ist, um Enzymaktivität nachzuweisen, ist mehr als drei Mal so hoch wie jene, die bei einem X-Substrat erforderlich ist. CHE-GAL ist ebenfalls von James et al. beschrieben worden in App. Env. Microbiol. (1996) 62(10), 3868–3870.

[0010] Ein weiteres Beispiel, in dem von einem cis-dihydroxy-trizyklischen System ein unlösliches farbiges Chelat gebildet werden kann, ist durch die Verwendung von Alizarin-β-D-galactopyranosid (3) gefunden worden (A. L. James et al., Lettr. Appl. Microbiol., 2000, 30, 336–340).

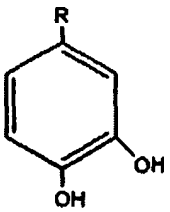


(3)

[0011] Nach Hydrolyse durch bakterielle Enzyme erzeugte dieses Substrat in der Gegenwart von Eisen- bzw. Aluminiumsalzen leuchtend violette bzw. leuchtend rote Kolonien. Die Kolonien auf Columbia-Agarplatten waren zudem in hohem Maße lokalisiert. Die zur Visualisierung benötigte Konzentration betrug weniger als ein Fünftel derer, die für CHE-Gal erforderlich war.

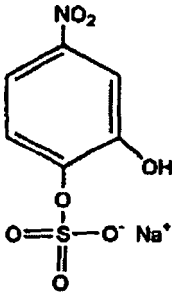
[0012] Bevor die vorliegende Erfindung gemacht wurde, konnte ein cis-dihydroxy-bizyklisches System, wie das in Esculetin, als Basis für eine chelatisierende Klasse von Enzymsubstraten angewendet werden, aber Probleme mit Diffusion konnten erst überwunden werden durch Ausarbeitung dieses Systems durch Substitution oder durch Erweiterung zu einem trizyklischen System, wie jenem, das in CHE und Alizarin vorliegt.

[0013] Bevor die vorliegende Erfindung entwickelt wurde, waren einfache 1,2-Dihydroxybenzole wie Catechol und seine Derivate (4) als Enzymsubstrate kaum beachtet worden.



(4)

[0014] Es wurde berichtet, dass Glycoside von Catechol (4, R=H) zu einem variablen Grad von Enzymen gespalten werden (B. Helferich et al., J prakt. Chem., 1933, 138, 275–280; K. Bock and S. Refn, Acta Chem. Scand., 1989, 43, 373–380). Catechol ist farblos, und daher war der Fortschritt der enzymatischen Hydrolyse in geeigneter Weise durch spektrophotometrische Analyse oder durch Messung der Menge an freigesetztem Kohlenhydrat verfolgt worden. Das Anion von 4-Nitrocatechol (4, R=NO2) ist gelb, und diese Verbindung war als ein Monosulfatsalz (5) als chromogenes Substrat in analoger Weise zu p-Nitrophenylsulfat verwendet worden (W. O. Bostick et al. Clin. Chem., 1978, 24, 1305–1316; A. L. Fluharty et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1974, 59, 455–461). Zusätzlich ermöglichte die Fähigkeit dieser Verbindung, Kupfer(II)-ferricyanid zu Kupfer(II)-ferrocyanid (bekannt als Hattchets Braun) zu reduzieren, ihre Anwendung, um auf diese Weise Arylsulfataseaktivität zu detektieren (J. S. Hanker et al., Histochemistry, 1975, 41, 207–225). Andere phenolische Verbindungen, die kein cis-1,2-Dihydroxysystem besitzen, können ebenfalls zur Herstellung von Hatchetts Braun angewendet werden.



(5)

[0015] Luukkanen, L. et al. beschreiben in Bioconjugate Chem. (1999) 10, 150–154, die enzymvermittelte Synthese von einer Reihe von Nitrocatechol-O-glucuroniden. Von den Glycosiden wird angenommen, dass sie durch mikrosomale β-Glucuronidase und möglicherweise auch durch E. coli-β-Glucuronidase im Darm hydrolysiert werden. Luukkanen et al. offenbaren keinerlei Hydrolyse-Tests. Allerdings versuchen sie, Hydrolyse durch die Zugabe eines Hemmstoffs zu dem enzymhaltigen Synthesemedium zu hemmen. Auch geben die Autoren nicht an, ob die Glycoside oder Aglycone farbig sind.

[0016] Shiozaki, M. in Tetrahedron:Asymmetry (1999) 10, 1477–1482 und Watanabe, Y. et al. in Carbohydrate Res. (2001) 335, 283–289 beschreiben die Synthese und die Eigenschaften von 4',8-Dihydroxy-isoflavon-7-yl-α-D-arabinose (A-76202) und vier Hexopyranose-Analoga. Die Glycoside sind mit der 7-Position verknüpft, d. h. mit dem fusionierten Ring. Die Glycoside gelten als Hemmstoffe von α-Glucosidase, einem Enzym des endoplasmatischen Retikulums. Enzymaktivität und -inhibition wurden in einem Flüssigphasen-Reaktions-

system bestimmt durch die Verwendung von 4-Nitrophenyl-α-D-glucopyranosid, einem chromogenen Enzymsubstrat für das Enzym.

[0017] WO-A-0048606 beschreibt Phosphat-Derivate von phenolischen Verbindungen, einschließlich Catechol-Derivaten, die auf 1,2-Dihydroxybenzol basieren und als Prodrugs verwendet werden. Obwohl das Catechol ein Flavonoid sein kann, werden keine Beispiele für Flavonoide offenbart.

[0018] Viele Glycoside von Flavonoiden sind natürlich vorkommende Verbindungen und/oder sind synthetisiert worden. 3,3',4'-Trihydroxyflavon-4'-β-D-glucopyranosid und 3',4'-Dihydroxyflavon-4'-β-D-glucopyranosid, zum Beispiel, sind bekannte Verbindungen. Viele derartige Verbindungen sind als Glycosidase-Enzymsubstrate verwendet worden. Zum Beispiel werden in Lambert, N. et al., (1999) Biochim. Biophys. Acta 1435, 110–116, Glucoside verschiedener Flavonoide verwendet, um die Aktivität einer zytosolischen β-Glucosidase aus Schweineleber zu untersuchen. Die Spaltung wird in einem flüssigen Medium durchgeführt und die Produkte werden durch Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) identifiziert. Weitere Flavonoid- und Isoflavonoidglucoside werden als Substrate für zellfreie Extrakte aus humanem Dünndarm und Leber verwendet, die verschiedene Glucosidaseenzyme enthalten, in Day, A. J. et al., (1998) FERS Letters 436, 71–75. Die Reaktionen werden in flüssigem Medium durchgeführt und Produkte werden, wiederum, durch HPLC analysiert.

Zusammenfassung der Erfindung

[0019] Diese Erfindung stellt ein Verfahren zur Detektion von Enzymaktivität auf einem festen Medium bereit, umfassend:

a) das Inkontaktbringen eines Enzymsubstrats, das

i) einen chromogenen Anteil, umfassend einen Catechol-Rest, und

ii) eine enzymatisch spaltbare Gruppe umfasst, die über eine Ester- oder Etherbindung mit dem Sauerstoffatom verbunden ist, das aus einer Hydroxylgruppe des Catechol-Rests stammt, mit einer Substanz, von der angenommen wird, dass sie ein Enzym enthält, das befähigt ist, die enzymatisch spaltbare Gruppe zu spalten, um eine gespaltene Verbindung zu erzeugen

b) Das Inkontaktbringen der gespaltenen Verbindung, wahlweise nach Zwischenreaktionen mit einem Metallion, das durch die gespaltene Verbindung chelatisierbar ist, oder durch das Produkt beliebiger Zwischenschritte, zur Herstellung eines im Wesentlichen nicht diffundierbaren farbigen Präzipitats, das in Gegenwart des Substrats und des Metallions sichtbar ist,

c) das Detektieren des Vorhandenseins des nicht diffundierbaren Präzipitats.

[0020] Für die vorliegende Beschreibung ist ein Catechol-Rest eine Einheit, die aus der Entfernung eines oder beider Hydroxylwasserstoffatome aus einem 1,2-Dihydroxybenzol oder einem substituierten Derivat davon, vorzugsweise substituiert mit einer derivatisierenden Einheit, die mit dem aromatischen Ring des Catechols über eine Bindung verbunden ist, resultiert. In dem Substrat werden eines oder beide Hydroxylsauerstoffatome des Rests verwendet, um eine enzymatisch spaltbare Gruppe anzubinden. Der aromatische Ring kann unsubstituiert oder mit einer oder mehreren derivatisierenden Einheiten substituiert sein, vorausgesetzt, dass die Substituenten kein mit dem 1,2-Hydroxybenzol-Ring fusioniertes Ringsystem bilden.

[0021] Eine gespaltene Verbindung ist der chromogene Anteil des Substrats, nachdem enzymatische Aktivität die enzymatisch spaltbaren Gruppen entfernt hat. Das präzipitierte Chelat sollte in der Gegenwart des Substrats und des Metallions sichtbar sein, sodass sein Vorhandensein mit dem Auge detektiert werden kann. Das Substrat und das Metallion können zusammen (d. h. als ein Chelat) oder einzeln farbig sein, vorausgesetzt, dass sich die Farbe von der des besagten präzipitierten Chelats unterscheidet.

[0022] In den Enzymsubstraten dieser Erfindung kann eine große Auswahl an enzymatisch spaltbaren Gruppen verwendet werden. Beispiele für die Klassen von Bindungen, die zwischen den catecholischen Hydroxylen und den enzymatisch spaltbaren Gruppen gebildet werden, umfassen Esterbindungen, wenn das catecholische Hydroxyl mit einer Acylgruppe verbunden ist, die z. B. von einer Aminosäure oder Fettsäure abgeleitet ist, und Phosphat-, Sulfonat- oder Sulfatesterbindungen, wenn die enzymatisch spaltbaren Gruppen Phosphatyl-, Sulfonyl- bzw. Sulfatylgruppen sind. Wenn die enzymatisch spaltbare Gruppe eine Zuckereinheit ist, die über eine Etherbindung angebunden ist, bildet diese einen Teil der zyklischen Acetal-Struktur. Wenn die enzymatisch spaltbare Gruppe ein Zuckerrest ist, kann der Zucker mit dem Catechol-Rest α- oder β-verknüpft sein und kann die L- oder D-Form des Zuckers sein, sofern nicht anders angegeben. Im Allgemeinen war das Sauerstoffatom, das zurückbleibt, wenn die enzymatisch spaltbare Gruppe und das catecholische Hydroxyl verknüpft werden, ursprünglich Teil des Catechols.

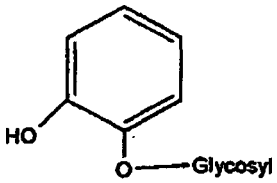
[0023] In einem Enzymdetektionssystem, wie es von der vorliegenden Erfindung vorgesehen wird, ist es möglich, den Zustand dieser Reaktion durch die Zugabe des Enzymsubstrats, wenn es erforderlich ist, und die spätere Zugabe des chelatierbaren Metallions zu kontrollieren. Dies kann in bestimmten Situationen Vorteile haben. Es ist jedoch bevorzugt, dass das oben beschriebene Verfahren während Schritt (a) in der Gegenwart des chelatierbaren Metallions abläuft. Dies wird es dem gespaltenen chromogenen Anteil ermöglichen, das Metallion zu chelatieren, sobald es erzeugt wird, womit jegliche Diffusion der gespaltenen Verbindung verhindert wird, die auftreten kann, wenn das gespaltene Produkt in seinem nicht chelatierten Zustand diffundierbar ist.

[0024] Das in Schritt (b) des Verfahrens erwähnte chelatierbare Metallion kann ein beliebiges Metallion sein, das von der gespaltenen Verbindung chelatisiert werden kann. Wenn das Metallion in dem festen Medium oder während Schritt (a) des Verfahrens vorhanden ist, sollte das Metallion eines sein, das von beliebigen Ziel-Mikroorganismen toleriert wird, die auf dem Medium wachsen. Es wird ersichtlich werden, dass eine große Auswahl von chelatisierbaren Metallionen-Verbindungen Eisensalze, Aluminiumsalze und Bismutsalze sind.

[0025] Die im Wesentlichen nicht diffundierbaren farbigen Präzipitate, die in dieser Erfindung gebildet werden, werden durch Chelatisierung eines chelatisierbaren Metallions durch die gespaltene Verbindung gebildet und bedeuten, dass der Ort der enzymatischen Aktivität durch unterschiedliche ortsspezifische Färbung detektiert wird. Das Vorhandensein des nicht diffundierbaren Präzipitats wird als ein direkter Hinweis auf das Vorhandensein der zu detektierenden Enzymaktivität verwendet.

[0026] Der Vorteil, dass das farbige Präzipitat aus Schritt (c) mit dem Auge detektierbar ist, und bevorzugt unter Verwendung von sichtbarem Auflicht, bedeutet, dass das Ergebnis von Tests schnell mit dem bloßen Auge bestimmt werden kann, ohne die Notwendigkeit für andere Ausrüstung, wie z. B. eine UV-Lampe oder ein Spektrophotometer, und dass das gesamte Detektionsverfahren einfacher ist.

[0027] Ein Glycosid (6) von Catechol selbst wurde hergestellt und hinsichtlich seiner Fähigkeit, ein unlösliches Chelat in Gegenwart eines Eisensalzes und der geeigneten Glycosidase erzeugenden Mikroorganismen zu bilden, getestet.

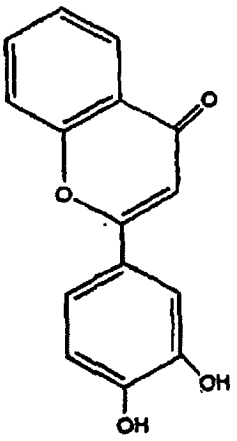


(6)

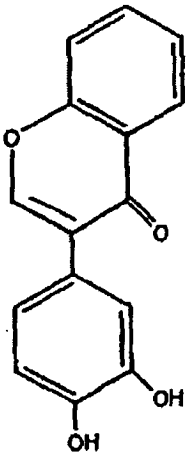
[0028] Es wurde festgestellt, dass diese Verbindung ein purpurfarbenes Chelat erzeugt, dass hinsichtlich sowohl der Farbintensität als auch dem Ausmaß der Diffusion auf einer Agarplatte ungefähr gleichwertig zu Esculetin war. Die Diffusion ist jedoch ziemlich erheblich und Catechol ist in dieser Hinsicht geringerwertig als CHE. Nichtsdestoweniger ist gezeigt worden, dass das cis- oder 1,2-Dihydroxysystem, um ein nützliche chelatisierende Klasse von Enzymsubstraten zu erzeugen, nicht Teil eines fusionierten bizyklischen oder trizyklischen Systems sein muss, wie das bei Esculetin, CHE oder Alizarin der Fall ist. Catechol ist billiger als Esculetin und daher könnten in dieser Weise verwendete Catechol-Substrate wie (6) leichter verfügbare Alternativen zu Esculetin oder anderen, auf Esculetin basierenden Substraten bereitstellen.

[0029] Die bevorzugten Enzymsubstrate in dem obigen Verfahren sind jene, in denen eine derivatisierende Gruppe mit dem aromatischen Ring des Catechol-Rests verbunden ist, bevorzugt in meta-Stellung oder, stärker bevorzugt, in para-Stellung zu dem Atom, das durch die enzymatisch spaltbare Gruppe substituiert ist. Es ist am stärksten bevorzugt, dass die derivatisierende Gruppe mindestens 4 Atome umfasst. Es ist besonders bevorzugt, dass der Substituent Aryl-, Heteroaryl-, Cycloheteryl- oder Cycloalkyl- ist. Bei einer Klasse der bevorzugten Enzymsubstrate umfasst der Catechol-Rest eine Dihydroxyflavonoid-, Dihydroxyauron- oder Dihydroxychalcon-Struktur. Einige Beispiele für Catechol-Reste, aus denen die chromogenen Anteile gebildet werden (durch den Austausch von einem der Hydroxylwasserstoffatome durch eine spaltbare Gruppe), sind unten angegeben. In den Strukturen 8 bis 13 ist das Catechol ein Dihydroxyflavonoid, in Struktur 14 ein Dihydroxyauron und in Struktur 15 ist es ein Dihydroxychalcon und in 16 ein Flavonol. Diese Erfindung kann auch natürliche Glycoside von anderen Mitgliedern der Flavonoidreihe einsetzen, wie z. B. Spiraeosid, worin der chromogene Anteil eine auf Quercetin basierende Struktur aufweist (17).

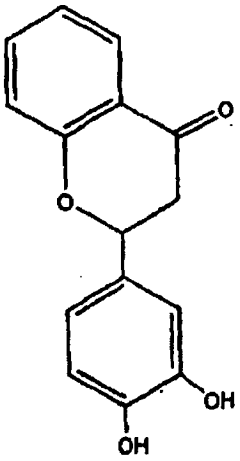
[0030] In den Strukturen ist die Hauptringstruktur gezeigt mit den zwei Hydroxylgruppen an der 3'-und 4'-Position, die für die derivatisierbaren Verbindungen wesentlich sind. Die Namen geben die Hauptkomponenten an ohne die 3'- und 4'-Hydroxylgruppen. Ein besonders bevorzugter Rest basiert auf 3',4'-Dihydroxyflavon oder seinem 3'-niederen Alkoxyderivat. Quercetin hat im Unterschied zu den anderen gezeigten Strukturen bereits die 3'- und 4'-Hydroxylgruppen.



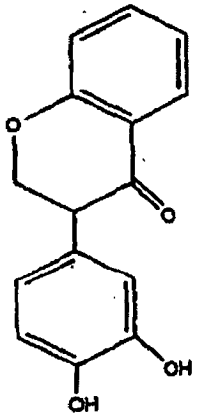
Flavon (8)



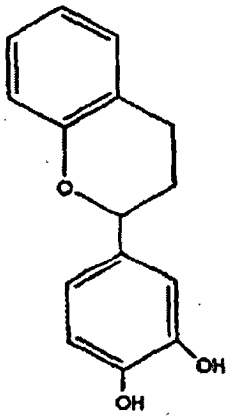
Isoflavon (9)



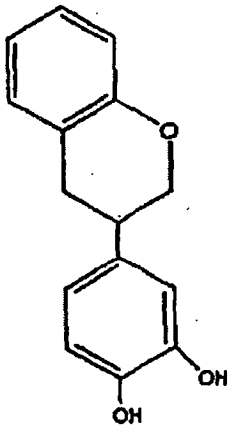
Flavanon (10)



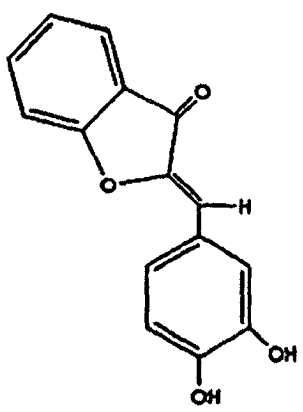
Isoflavanon (11)



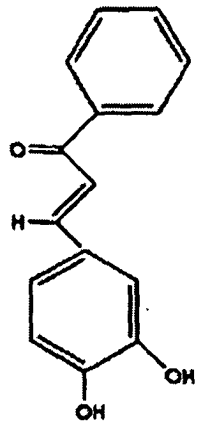
Flavan (12)



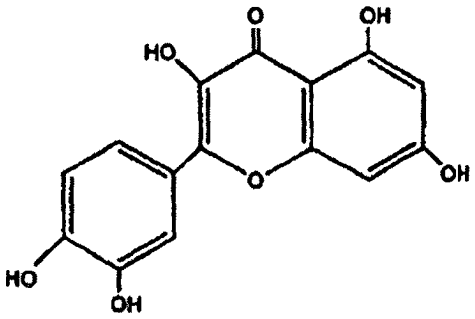
Isoflavan (13)



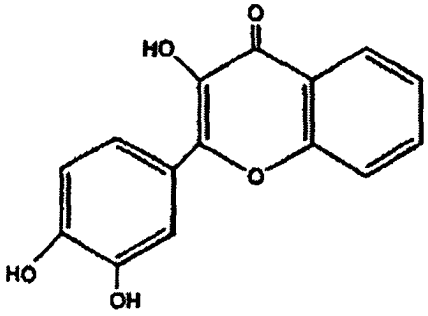
Auron (14)



Chalcon (15)

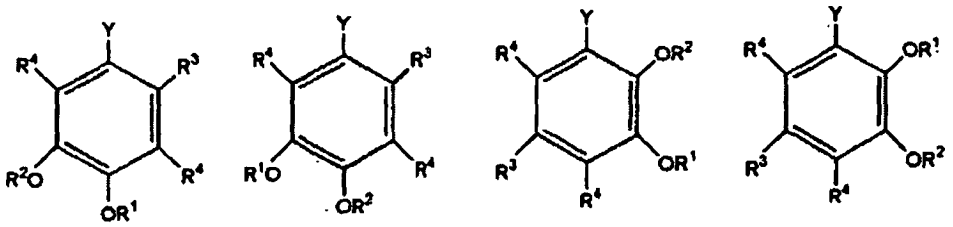


Quercetin (17)



Flavonol (16)

[0031] Die in dem Verfahren dieser Erfindung nutzbaren Enzymsubstrate können auch gemäß den folgenden Strukturformeln beschrieben werden:



I II III IV

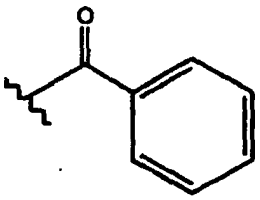
wobei R^1 und R^2 H oder eine beliebige enzymatisch spaltbare Gruppe sind und R^1 und R^2 nicht beide H sein können.

[0032] Y, R^3 und R^4 sind Einheiten, die nicht die enzymatische Spaltung oder die Chelatbildung stören.

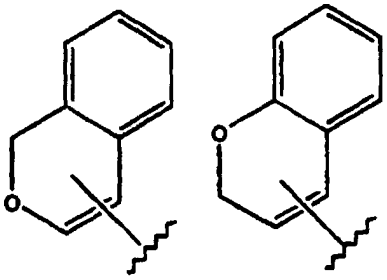
[0033] Die Verbindungen der Formeln I, II, II und IV können eine enzymatisch spaltbare Gruppe aufweisen, die sich an der Position R^1 oder R^2 befinden können. In einer anderen Ausführungsform können diese Verbindungen zwei enzymatisch spaltbare Gruppen aufweisen, die sich an den Positionen R^1 und R^2 befinden.

[0034] Die Verbindungen dieser Erfindung können vollständig derivatisiert sein, wobei Y, R^3 und R^4 organische Einheiten sind, die weniger als 40 Atome, bevorzugt weniger als 30 Atome und stärker bevorzugt weniger als 20 Atome enthalten. In einer anderen Ausführungsform können die Verbindungen dieser Erfindung nur teilweise derivatisiert sein, wobei R^4 H ist. In noch einer anderen Ausführungsform können die Verbindungen dieser Erfindung nur eine derivatisierende Einheit haben, die an den Catechol-Ring gebunden ist, wobei R^3 und R^4 H sind; in derartigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass Y vier oder mehr Atome enthält. In einer weiteren Klasse von Verbindungen ist Y Acyl, zum Beispiel COPhe, wobei Phe Phenyl- oder CHO- ist.

[0035] Y kann substituierte oder unsubstituierte Aryl- oder Heteroaryl-Gruppen enthalten, die 5 bis 18 Ringatome enthalten. In derartigen Ausführungsformen kann Y auch nur eine Ringgruppe enthalten, wie z. B.



[0036] Y hat bevorzugt die Kernstruktur von V oder VI,



V VI

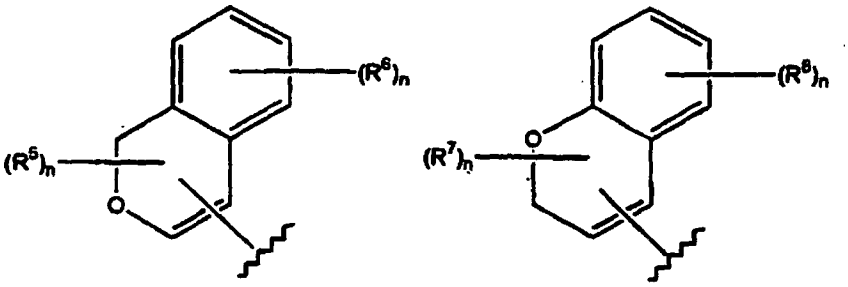
wobei die Strukturen wie gezeigt mit dem Catechol-Ring verbunden sind.

[0037] „Kernstruktur" bedeutet das Gerüst von Y, das weiter substituiert sein kann.

[0038] Beispiele von Substituenten sind Hydroxyl-, C_{1-24}-Alkyl-, C_{2-12}-Alkenyl-, C_{1-4}-Alkoxy-, Acyl-, einschließlich -CHO und -COPhe, wobei Phe Phenyl ist, =O, Halogen-, Nitro-, Aryl- und Acyloxy-Gruppen. Alkyl- und Arylgruppen, die Substituenten sind, können substituiert sein durch Amino-, Hydroxyl-, Peptid-, Acyloxy-, Alkoxy- und Arylgruppen. Die Bindung, die mit einer Zickzack-Linie endet, ist mit dem Rest des Moleküls, d. h. dem Catechol-Ring, verbunden.

[0039] Bevorzugt ist R^1 eine enzymatisch spaltbare Gruppe. Bevorzugt ist Y in para-Stellung zu OR^1, das heißt, dass die Verbindung der Formel I entspricht.

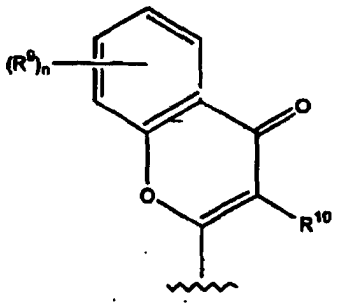
[0040] Es ist bevorzugt, dass Y die Struktur von VII oder VIII hat,



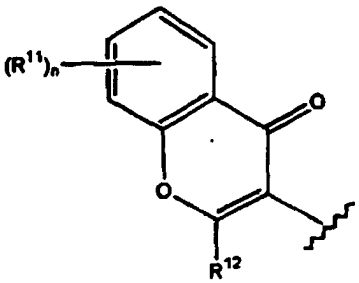
VII VIII

worin $(R^5)_n$, $(R^6)_n$, $(R^7)_n$ und $(R^8)_n$ jeweils mehr als einen Substituenten darstellen können und =O einschließen würden. R^5, R^6, R^7 und R^8 sind Substituenten, die nicht die Enzymaktivität oder die Metallion-Chelatisierung stören, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe, die aus Hydroxyl-, C_{1-24}-Alkyl-, C_{2-12}-Alkenyl-, C_{1-4}-Alkoxy-, Acyl-, einschließlich -CHO und -COPhe, wobei Phe Phenyl ist, =O, Halogen-, Nitro-, Aryl- und Acyloxy-Gruppen besteht. Alkyl- und Arylgruppen, die Substituenten sind, können durch Amino-, Hydroxyl-, Peptid-, Acyloxy-, Alkoxy- und Arylgruppen substituiert sein, oder es können zwei Gruppen, R^6 und R^8, an demselben Kohlenstoff =O sein.

[0041] Die am stärksten bevorzugten Ausführungsformen von Y sind dargestellt durch die Strukturen IX und X,



IX



X

worin $(R^9)_n$ und $(R^{11})_n$ einen oder mehrere Substituenten darstellen und R^{10} und R^{12} jeweils Wasserstoff oder ein Substituent sind, wobei jeder oder sämtliche dieser Substituenten nicht die enzymatische Spaltung oder die Metallion-Chelatisierung stören. R^9, R^{10}, R^{11} und R^{12} sind bevorzugt aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyl, C_{1-24}-Alkyl-, C_{2-12}-Alkenyl-, C_{1-4}-Alkoxy-, Acyl-, einschließlich -CHO und -COPhe, wobei Phe Phenyl ist, =O, Halogen-, Nitro-, Aryl- und Acyloxy-Gruppen ausgewählt. Alkyl- und Arylgruppen, die Substituenten sind, können durch Amino-, Hydroxyl-, Peptid-, Acyloxy-, Alkoxy- und Arylgruppen substituiert sein. Am stärksten bevorzugt ist Y IX und R^{10} ist Wasserstoff, Hydroxyl-, C_{1-4}-Alkoxy- oder OR^x, wobei R^x eine enzymatisch spaltbare Gruppe ist.

[0042] In Ausführungsformen, bei denen $(R^6)_n$, $(R^8)_n$, $(R^9)_n$ und $(R^{11})_n$ mehr als einen Substituenten darstellen, einschließlich =O, sind die Doppelbindungen in dem substituierten Ring umgelagert. Bevorzugt ist n 0, 1 oder 2.

[0043] R^3 und R^4 können ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus H, C_1 bis C_6-Alkyl-, -Alkoxy- sowie Hydroxyalkyl, Halogen-, Nitro-, Acyl-, Acyloxy-, Aralkyl-, Aryl- und Amidogruppen. R^3 und R^4 sind nicht so verbunden, dass sie einen fusionierten Ring bilden.

[0044] Damit das Verfahren dieser Erfindung funktioniert, muss nur entweder R^1 oder R^2 durch eine enzymatisch spaltbare Gruppe substituiert werden. Auf diese Weise werden nach enzymatischer Spaltung und Freisetzung der enzymatisch spaltbaren Gruppe die benachbarten Hydroxylgruppen, die für die Chelatisierung des chelatisierbaren Metallions notwendig sind exponiert und das im Wesentlichen nicht diffundierbare farbige Präzipitat kann sich bilden. In einer anderen Ausführungsform können sowohl R^1 als auch R^2 durch eine enzymatisch spaltbare Gruppe substituiert sein. Diese enzymatisch spaltbaren Gruppen können wahlweise identisch oder verschieden sein. Wenn diese Gruppen identisch sind, dann ist eine Klasse von Enzymaktivität notwendig, um die Spaltung und die Erzeugung des im Wesentlichen nicht diffundierbaren farbigen Präzipitats zu bewirken. Wenn R^1 und R^2 verschiedene enzymatisch spaltbare Gruppen darstellen, dann sind zwei Enzymaktivitäten notwendig, bevor das im Wesentlichen nicht diffundierbare Präzipitat gebildet wird. Dies kann nützlich sein, in Fällen, in denen die Zielmikrobe oder das betreffende Enzymextrakt zwei Enzymaktivitäten enthält und die kommensalen Mikroben oder andere Enzymextrakte nur eine dieser enzymatischen Aktivitäten enthalten.

[0045] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung sind auf Enzymaktivität zur Entfernung der enzymatisch spaltbaren Gruppe oder Gruppen angewiesen, sodass benachbarte (d. h. cis-)Hydroxylgruppen in der gespaltenen Verbindung freigelegt werden.

[0046] Zur Bildung des Catechol-Rests nicht bevorzugte Moleküle der vorliegenden Erfindung sind jene, die ein Paar von benachbarten Hydroxylgruppen an anderen Stellen des Gerüsts aufweisen; d. h. zwei benachbarte Hydroxyle wie R^8, R^8, R^9 oder R^{10}; das Vorhandensein dieser Gruppen kann dazu führen, dass das Chelat in Abwesenheit von enzymatischer Hydrolyse geformt wird und somit eine Schwärzung des in Platten gegossenen Mediums bewirkt. Andere Moleküle, die nicht bevorzugt sind, weisen eine Gruppe auf, die nicht enzymatisch spaltbar ist, wie z. B. $-CH_3$ an entweder R^1 oder R^2.

[0047] Ein allgemeines Schema für die Synthese eines Substrats, bestehend aus einem Zuckerrest und einem Catechol-Rest, die über eine Etherbindung verbunden sind, beinhaltet einen Zucker mit geschützten Hydroxylgruppen, der zugleich mit Catechol oder einem Catechol-Derivat und einem Katalysator gemischt wird, um das Catechol(-Derivat)-Glycosid zu bilden. Wahlweise können weitere derivatisierende Einheiten an den Catechol-Rest angefügt werden. Die Zuckereinheit wird entschützt und das chromogene Enzymsubstrat wird aufgereinigt. Ein allgemeines Schema für die Herstellung von chromogenen Enzymsubstraten, die einen Catechol-Rest und einen Phosphoryl-Rest umfassen, die über einen Phosphatesterbindung verbunden sind,

kann die Reaktion des Catechol-Derivats und einem molaren Äquivalent von Phosphoroxychlorid oder einem anderen phosphorylierenden Reagens, gemischt in einem aprotischen Lösungsmittel beinhalten. Nachdem die Reaktion vollständig abgelaufen ist, kann das Substrat aufgereinigt werden.

[0048] Wenn die Substanz, von der angenommen wird, dass sie eine Enzymaktivität enthält, Mikroben umfasst, kann das Verfahren der Erfindung einen vorläufigen Verfahrensschritt zur Anzucht der Mikroben auf einem festen Medium umfassen. In einer derartigen Ausführungsform, wobei das Substrat während des mikrobiellen Wachstums im Medium vorhanden ist, wird das Vorhandensein der Enzymaktivität anhand stark gefärbter mikrobieller Kolonien detektiert. Die Färbung bleibt im Wesentlichen innerhalb der Kolonie und diffundiert nicht in oder über das feste Medium, gewöhnlich Agar.

[0049] Das Verfahren dieser Erfindung kann mit anaeroben Bakterien verwendet werden, die unter anaeroben Bedingungen auf dem festen Medium angezogen werden. Dies kann nützlich sein in Situationen, in denen Untersuchungen von Darmbakterien oder Untersuchungen über andere anaerobe Bakterien, wie Bodenbakterien, zum Beispiel Clostridia, notwendig sind. In solch einer Situation kann es bevorzugt sein, dass die enzymatisch spaltbaren Gruppen Phosphate sind.

[0050] Zur einfachen Durchführung des Verfahrens dieser Erfindung ist vorgesehen, dass das chromogene Enzymsubstrat und das chelatisierbare Metallion in einem festen Medium vorhanden sind, welches das Wachstum von Mikroben unterstützt. Es versteht sich, dass die Mikroben, die unter Verwendung des Verfahrens dieser Erfindung untersucht werden können, Pilze, Bakterien oder Viren sein können, obwohl sie am stärksten bevorzugt Bakterien sind.

[0051] Das Verfahren dieser Erfindung kann mit den Enzymsubstraten des vorliegend beschriebenen Verfahrens als dem einzigen Detektionssystem durchgeführt werden. Der Fachmann wird zudem erkennen, dass das feste Medium ein oder mehr zusätzliche Selektions- oder Detektionssysteme enthalten kann. Nicht einschränkende Beispiele für zusätzliche Selektions- oder Detektionssysteme sind Antibiotika, Enzymsubstrate, chromogene oder fluorogene Indikatoren, Enzyminduktoren, Wachstumsfaktoren und Wachstumshemmer, wie sie für die erforderliche Testprozedur geeignet sind.

[0052] Der Fachmann wird zudem erkennen, dass die enzymatisch spaltbare Gruppe der Verbindungen dieses Verfahrens eine beliebige Gruppe sein kann, die durch die Enzymaktivität, die detektiert werden soll, spaltbar ist. Demnach würde eine nicht einschränkende Liste von Möglichkeiten Phosphat-, Sulfat-, Aminosäure-, Zuckerreste, Fettsäuregruppen, Proteine, Nukleotide und Peptide umfassen. Bevorzugte Ausführungsformen weisen Glycosyle als enzymatisch spaltbare Gruppen auf.

[0053] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung stellt neuartige Verbindungen bereit, umfassend
i) einen chromogenen Anteil, der einen Catechol-Rest umfasst, und
ii) eine enzymatisch spaltbare Gruppe, die über eine Ester- oder Etherbindung mit dem Sauerstoffatom verbunden ist, das aus einer Hydroxylgruppe des Catechol-Rests stammt, wobei die enzymatisch spaltbaren Gruppen ausgewählt sind aus Fucosyl-, Ribosyl-. Arabinosyl-, Mannosyl-, Xylosyl-, α- oder β-verknüpften Glucosyl-, β-verknüpften Glucuronyl-, α- oder β-Galactosyl-, Phosphatyl- und Acylgruppen.

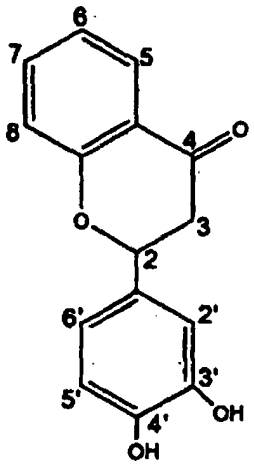
[0054] Die Verbindungen einer Klasse der Erfindung weisen eine β-D-Ribofuranosylgruppe als enzymatisch spaltbare Gruppe auf. Andere bevorzugte Ausführungsformen weisen Phosphatyl-, α- oder β-Galactosyl-, α- oder β-Glucosyl-, myo-Inositolphosphatyl-, Octanoyl-, oder Decanoylgruppen auf.

[0055] Wenn die enzymatisch spaltbaren Gruppen Zuckerreste sind, können sie entweder über α- oder β-Verknüpfungen angebunden sein, und es kann entweder der L- oder der D-Zucker verwendet werden, sofern nicht anders angegeben.

[0056] Die neuartigen Verbindungen dieser Erfindung können als Hydrat oder in der Form eines geeigneten Salzes hergestellt werden.

[0057] Es wird im Allgemeinen erwartet, dass in Verbindungen dieser Erfindung, die eine oder mehrere derivatisierende Einheiten aufweisen, mindestens eine der derivatisierenden Einheiten in para-Stellung zu der enzymatisch spaltbaren Gruppe an den Catechol-Ring angebunden ist.

[0058] In der folgenden Beschreibung wird, wenn die neuartigen Verbindungen auf einer Flavanoid-Struktur basieren, das folgende Nummerierungssystem verwendet:



[0059] Die neuartigen Verbindungen stellen eine bevorzugte Ausführungsform dar, wenn mindestens eine der enzymatisch spaltbaren Gruppen β-D-Ribofuranosyl ist. Noch stärker bevorzugte Verbindungen sind ausgewählt aus Catechol-β-D-ribofuranosid, 3',4'-Dihydroxyflavon-4'-β-D-ribofuranosid, 3,4-Dihydroxybenzaldehyd-4-ß-D-ribofuranosid, 3,4,-Dihydroxychalcon4-β-D-ribofuranosid, 4-Nitrocatechol-1-β-D-ribofuranosid, 3',4'-Dihydroxyauron-4'-β-D-ribofuranosid, 3',4'-Dihydroxybenzaldehydsemicarbazon-4-β-D-ribofuranosid, 3,3',4'-Trihydroxyflavon-4'-β-D-ribofuranosid, 3',4'-Dihydroxy-3-methoxyflavon-4'-β-D-ribofuranosid und ihren Derivaten. Auf diese Verbindungen wird in der gleichzeitig anhängigen PCT-Anmeldung des Anmelders, welche die Priorität aus GB 0125528.0 beansprucht, ein Anspruch erhoben.

[0060] Besonders bevorzugte Ausführungsformen von neuartigen Verbindungen umfassen Enzymsubstrate der Strukturformel I, wobei R^2, R^3 und R^4 H sind und Y die Strukturformel IX annimmt, wobei R^{10} H ist, keine Substituenten R^9 (n = 0) vorhanden sind und R^1 aus der unten angegebenen Liste ausgewählt ist. Alternativ beschrieben umfasst das Enzymsubstrat einen chromogenen Rest, gebildet aus einem Catechol-Rest, der 3',4'-Dihydroxyflavon ist, und einer enzymatisch spaltbaren Gruppe, die über eine Ester- oder Etherbindung mit dem Sauerstoffatom verbunden ist, das aus einer Hydroxylgruppe des Catechol-Rests stammt. Die enzymatisch spaltbaren Gruppen oder R1 sind ausgewählt aus 4'-β-D-Glucuronyl, 4'-β-D-Galactopyranosyl, 4'-α-D-Galactopyranosyl, 4'-Decanoyl, 4'-Octanoyl, 4'-Inosit-1-phosphatyl, 4'-Phosphatyl, 4'-β-D-Ribofuranosyl, 4'-α-L-Arabinopyranosyl, 4'-Butyryl, 4'-Nonanoyl, 4'-Palmitoyl, 4'-Lignoceroyl, 4'-α-L-Fucopyranosyl, 4'-β-L-Fucopyranosyl, 4'-α-D-Fucopyranosyl, 4'-β-D-Fucopyranosyl, 4'-α-D-Mannopyranosyl, 4'-β-D-Mannopyranosyl, 4'-Oleoyl, 4'-Sulfatyl, 4'-α-D-Xylopyranosyl und 4'-β-D-Xylopyranosyl und Derivaten dieser enzymatisch spaltbaren Gruppen.

[0061] Eine zweite Gruppe von besonders bevorzugten Ausführungsformen neuartiger Verbindungen umfasst Enzymsubstrate der Strukturformel I, wobei R^2, R^3, und R^4 H sind und Y die Strukturformel IX annimmt, wobei R^{10} -OH ist und keine Substituenten R^9 vorhanden sind und R^1 ausgewählt ist aus der oben angegeben Liste und 4'-α-D-Glucopyranosyl sowie Derivaten dieser enzymatisch spaltbaren Gruppen. Alternativ beschrieben umfasst das Enzymsubstrat einen chromogenen Rest, gebildet aus einem Catechol-Rest, der 3,3',4'-Trihydroxyflavon ist, und einer enzymatisch spaltbaren Gruppe, die über eine Ester- oder Etherbindung mit dem Sauerstoffatom verbunden ist, das aus einer Hydroxylgruppe des Catechol-Rests stammt. Die enzymatisch spaltbaren Gruppen oder R^1 sind aus der oben angegeben Liste und 4'-α-D-Glucopyranosyl und Derivaten dieser enzymatisch spaltbaren Gruppen ausgewählt.

[0062] Eine dritte Gruppe von besonders bevorzugten Ausführungsformen neuartiger Verbindungen umfasst Enzymsubstrate der Strukturformel I, wobei R^2, R^3, und R^4 H sind, R^1 aus der unten angegebenen Liste ausgewählt ist und Y die Strukturformel IX annimmt, wobei R^{10} eine C_{1-6}-Alkoxy-Gruppe ist und keine Substituenten R^9 vorhanden sind. Alternativ beschrieben umfasst das Enzymsubstrat einen chromogenen Rest, gebildet aus einem Catechol-Rest, der 3',4'-Dihydroxy-3-C_{1-6}-Alkoxyflavon ist. Eine vierte Gruppe bevorzugter Ausführungsformen umfasst Enzymsubstrate der Strukturformel I, wobei R^2, R^3, und R^4 H sind und Y die Strukturformel IX annimmt, wobei R^{10} -OCH3 ist und zwei R^9-Substituenten, -OH und -OCH_3, substituiert an Position 5 bzw. 7, vorhanden sind. Alternativ beschrieben umfasst das Enzymsubstrat einen chromogenen Rest, gebildet aus einem Catechol-Rest, der 3,7-Dimethylquercetin ist. Für sowohl die dritte als auch die vierte Gruppe kann die enzymatisch spaltbaren Gruppe oder R^1 aus der für die zweite Gruppe neuartiger Enzymsubstrate angegebenen Liste und 4'-β-D-Glucopyranosid sowie Derivaten dieser enzymatisch spaltbaren Gruppen ausgewählt werden.

[0063] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung stellt ein Kit von Bestandteilen zur Verwendung bei der Detektion von Enzymaktivität auf einem festen Medium bereit, das ein Enzymsubstrat umfasst, umfassend

i) einen chromogenen Anteil, der einen Catechol-Rest umfasst, und

ii) eine enzymatisch spaltbare Gruppe, die über eine Ester- oder Etherbindung mit dem Sauerstoffatom verbunden ist, das aus einer Hydroxylgruppe des Catechol-Rests stammt und

iii) eine Verbindung eines Metallions, das durch den gespaltenen chromogenen Anteil chelatisiert wird.

[0064] Bei diesem Aspekt der Erfindung ist das Metallion, zum Beispiel, aus der Gruppe, bestehend aus Zn^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Sn^{2+}, Ba^{2+}, Al^{3+}, Sr^{2+}, Bi^{2+} and Fe^{3+} ausgewählt. Zn^{2+} und Co^{2+} sind weniger bevorzugt, da ihre Gegenwart das Wachstum einiger interessanter Mikroben hemmen kann. Fe^{3+}, Al^{3+} und Bi^{2+} sind besonders geeignet.

[0065] Das Enzymsubstrat des Kits kann weiter definiert werden wie oben beschrieben.

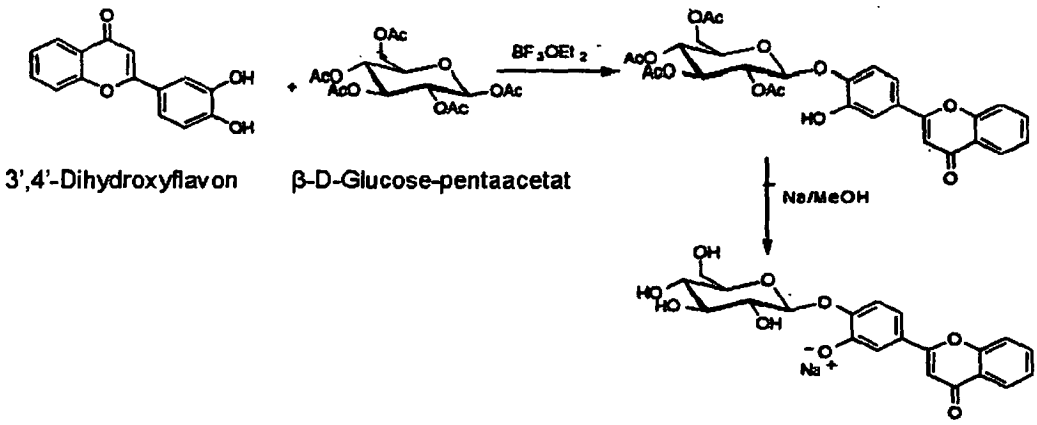
[0066] Ein Fachmann wird verstehen, dass ein derartiges Kit von Bestandteilen einen breiten Anwendungsbereich hat. Daher werden derartige Kits die Bestandteile wahlweise fertig gemischt oder in getrennten Behältern enthalten. Wenn die Bestandteile fertig gemischt vorliegen, bietet das eine einfache Nutzung. Wenn die Bestandteile in getrennten Behältern vorliegen kann der Anwender die optimalen Anteile für die Durchführung des Detektionsverfahren bestimmen.

[0067] Wenn die Substanz, von der angenommen wird, dass sie Enzymaktivität enthält, Mikroben umfasst, die auf einem festen Medium angezogen werden müssen, wird ein festes Medium verwendet werden, welches das Wachstum von Mikroben unterstützt, dass die oben aufgelisteten Kit-Bestandteile enthält. In einer entsprechenden Ausführungsform des oben beschriebenen Kits umfasst das Kit die Bestandteile des festen Mediums, welches das Wachstum von Mikroben unterstützt, und umfasst die Bestandteile der oben genannten Kits. In einem derartigen Kit können seine Bestandteile in einer nicht hydratisierten Form und wahlweise fertig gemischt oder in getrennten Behältern vorliegen.

[0068] Diese Erfindung wird nun anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1: Synthese und Bewertung von 3',4'-Dihydroxyflavon-4'-β-D-glucopyranosid-Natriumsalz (DHF-Glucosid)

[0069] Eine 50 ml-Rundbodenflasche, ausgestattet mit einem Stopfen und einem Magnetrührer, wurde beschickt mit einem Molekularsieb 3Å (3,7 g), 3',4'-Dihydroxyflavon (DHF) (750 mg) und Dichlormethan (20 ml), dann wurde dieses Gemisch für 5 Minuten gerührt. Sodann wurde β-D-Glucose-pentaacetat (1,0 g) hinzu gegeben und das Gemisch wurde für weitere 10 Minuten gerührt, bevor Bortrifluoriddiethyletherat (3,0 ml) auf einmal hinzu gegeben wurde. Nach dem Rühren für eine Stunde wurde das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat in einen Scheidetrichter überführt, wo es fünfmal mit einem gleichen Volumen gesättigter Natriumbicarbonatlösung gewaschen wurde. Nach der Trennung wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat für 16 Stunden getrocknet, vor der Entfernung des Trocknungsmittels und Verdampfung, was das Glycosid-tetraacetat als einen bernsteinfarbenen Schaum lieferte (480 mg). Das Glycosid-tetraacetat (100 mg) wurde in Methanol (0,2 ml) suspendiert und eine Lösung, die Natrium (10 mg) in Methanol (0,1 ml) enthielt, wurde auf einmal hinzu gegeben. Nach Schütteln bildete sich ein gelbes Präzipitat. Nach dem Stehenlassen bei Raumtemperatur für 16 Stunden wurde Diethylether (3 ml) zu dem Gemisch gegeben und der Feststoff wurde durch Filtration gewonnen. Nach dem Waschen mit Diethylether (4 ml) in vier Portionen wurde der Feststoff unmittelbar in einen Exsikkator überführt und im Vakuum über Phosphorpentoxid für 2 Stunden getrocknet. Das Produkt nahm die Form eines leuchtend gelben Pulvers an (30 mg).



3',4'-Dihydroxyflavon β-D-Glucose-pentaacetat

3',4'-Dihydroxyflavon-4'-β-D-glucopyranosid-Natriumsalz

Bewertungsverfahren

[0070] Das Glucosid-Derivat von DHF wurde mit 194 verschiedenen Bakterienstämmen getestet. Die Auswahl von Bakterien umfasste einen weiten Bereich, zu dem viele bedeutende Pathogene oder Kommensalen gehören, die häufig aus pathologischen Proben isoliert werden.

[0071] Das Substrat wurde in einer Substratkonzentration von 300 mg/l zu Columbia-Agar gegeben. Eisen-(III)-ammoniumcitrat wurde in einer Konzentration von 500 mg/l eingesetzt. Alle Einsatzstoffe wurden bei 116°C für 20 Minuten autoklaviert um die Sterilisation zu gewährleisten. Agarplatten wurden dann in 90 mm-Petrischalen angesetzt. Die Substrate bewirkten eine gelbe Färbung des Agars.

[0072] Für jeden getesteten Stamm wurde eine Bakteriensuspension in sterilem deionisiertem Wasser angesetzt mit einem Inokulum von ungefähr 1,5 × 108 Koloniebildenden Einheiten (CFU) pro ml. Dies wurde unter Verwendung eines Densitometers erreicht. 1 µl von jeder Bakteriensuspension wurde dann unter Verwendung eines Multipoint-Inokulators auf jede Platte inokuliert. Stämme wurden parallel auf Columbia-Agarplatten inokuliert, die Eisen-(III)-ammoniumcitrat ohne Substrat enthielten (Negativkontrolle).

[0073] Nach 18 Stunden Inkubation wurden Stämme mit dem Auge auf das Vorhandensein von Farbe untersucht. Sämtliche Stämme, die eine schwarze Färbung auf Substrat enthaltendem Medium, aber nicht auf den Platten der Negativkontrolle erzeugten, wurden als das Substrat hydrolysierend bewertet.

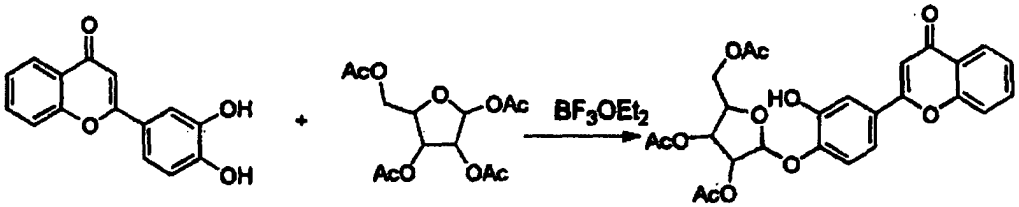
Ergebnisse

[0074] Von 120 getesteten gramnegativen Bakterien hydrolysierten 20% das DHF-Glucosid. Die Stämme, die „positiv" waren, erzeugten im Allgemeinen eine braune/schwarze Färbung, die keine Diffusion in Agar zeigte. Von den positiven Stämmen wurde im Allgemeinen basierend auf früheren Ergebnissen unter Verwendung von Indoxyl-Substraten erwartet, dass sie positiv sein würden. Es gab 11 Stämme, bekannt als Produzenten von β-Glucosidase, die DHF-Glucosid anscheinend nicht hydrolysierten. Von diesen Stämmen ist früher gezeigt worden, dass sie gegenüber analogen Substraten, wie X-Glucosid und CHE-Glucosid, reaktionsfähig sind. Wenn DHF-Glucosid verwendet werden soll, um speziell Glucosidase produzierende gramnegative Bakterien zu detektieren, würde dies eine offensichtliche Schwachstelle seiner Leistung darstellen. Die Ergebnisse sind unten in Tabelle 1 gezeigt.

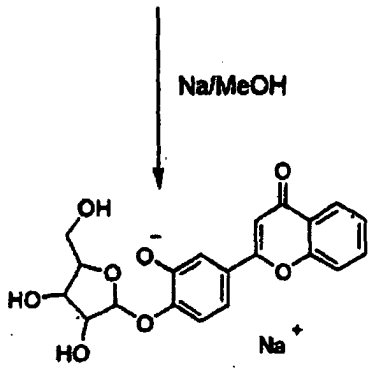
[0075] In der diagnostischen Mikrobiologie werden Glucoside im Allgemeinen eingesetzt, um grampositive Bakterien zu detektieren und werden, zum Beispiel, häufig zur Detektion von Enterokokken und Listerien eingesetzt. Von 74 getesteten grampositiven Bakterien hydrolysierten 22,5% das DHF-Glucosid. Diese hier getesteten grampositiven Bakterien, von denen bekannt war, dass sie Glucosidase-Produzenten sind, zeigten alle eine hervorragende Aktivität gegenüber DHF-Glucosid. Stämme von Listerien und Enterokokken erzeugten intensive schwarze Kolonien ohne Diffusion des schwarzen Chelats. DHF-Glucosid zeigt ein hervorragendes Potenzial zur Detektion dieser Stämme und ist im Vergleich mit CHE-Glucosid in dieser Hinsicht vorteilhaft. Die Ergebnisse sind unten in Tabelle 2 gezeigt.

Beispiel 2: Synthese und Bewertung von 3',4'-Dihydroxyflavon-4'-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz (DHF-Ribosid)

[0076] Ein 50-ml-Rundkolben, ausgestattet mit einem Stopfen und einem Magnetrührer, wurde mit 3',4'-Dihydroxyflavon (Lancaster Synthesis Ltd., Lancashire, UK) (500 mg), β-D-Ribofuranose-tetraacetat (640 mg), einem Molekularsieb 3Å (5,2 g) und Dichlormethan (20 ml) beschickt. Das Gemisch wurde für 15 Minuten gerührt, dann wurde der Katalysator Bortrifluoriddiethyletherat (20 ml) auf einmal hinzu gegeben. Es wurde für weitere 20 Minuten gerührt, dann wurde das Reaktionsgemisch in eine gesättigte Natriumbicarbonatlösung (150 ml) gegossen. Die organische Phase wurde durch Zugabe von mehr Dichlormethan (30 ml) verdünnt und dann in einem Scheidetrichter von der gelben, wässrigen Phase getrennt. Die organische Phase wurde dann elfmal mit einem gleichen Volumen gesättigter Natriumbicarbonatlösung gewaschen und dann für eine Stunde über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Trocknungsmittels lieferte die Verdampfung des Dichlormethans das Glycosid-triacetat als ein dunkles Gummi (390 mg). Zu diesem Gummi (315 mg) wurde eine Natriummethoxidlösung gegeben, die angesetzt worden war durch Auflösen von Natrium (50 mg) in Methanol (5 ml). Nach Schütteln für wenige Minuten löste sich das Gummi auf und die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 16 Stunden stehen gelassen. Die Lösung wurde dann durch Verdampfung auf ein Volumen von ungefähr 2 ml konzentriert, wonach die Zugabe von Diethylether (10 ml) die Präzipitation des Produkts bewirkte. Es wurde durch Vakuumfiltration gesammelt und, nach Waschen mit Diethylether (20 ml) in vier Portionen, unmittelbar in einen Exsikkator überführt und im Vakuum über Phosphorpentoxid für 2 Stunden getrocknet. Das erhaltene Produkt war ein gelbes Pulver (201 mg).



3',4'-Dihydroxyflavon β-D-Ribose-tetraacetat



3',4'-Dihydroxyflavon-4'-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz

Bewertungsverfahren

[0077] Es wurde dasselbe Verfahren verwendet wie in Beispiel 1.

Ergebnisse

[0078] Von 120 getesteten gramnegativen Bakterien hydrolysierten 68,3% das DHF-Ribosid. Jene, die positiv waren, erzeugten ein deutlich sichtbares schwarzes Chelat, das ohne Diffusion in den umliegenden Agar auf die Bakterienkolonien beschränkt blieb. Die Detektion von zur Spaltung der β-D-Ribofuranosyl-Gruppe befähigten Aktivität, (nachstehend β-Ribofuranosidase genannt), ermöglichte die Unterscheidung zwischen nahe verwandten Gattungen oder Arten. Die meisten der getesteten Enterobacteriaceae waren stark positiv für β-Ribofuranosidase-Aktivität. Eine Ausnahme bildete Yersinia enterocolitica, ein Pathogen, das eine Ursache von Enteritis darstellt. Dieses Substrat könnte eine nützliche Funktion für die Abgrenzung dieser Art von nahe verwandten Bakterien haben. Die Tatsache, dass die Gattung Shigella gleichmäßig positiv für Ribofuranosidase-Aktivität war, war ebenfalls bemerkenswert. Keine der Glycosidasen, auf die in der diagnostischen Mikrobiologie häufig getestet wird, werden gleichmäßig von Shigella-Arten produziert und dies ist ein limitierender Faktor bei der Entwicklung von Verfahren zu ihrer Detektion. Dies könnte die Unterscheidung zwischen Shigel-

la und nahe verwandten Arten, wie Proteus, erlauben.

[0079] Ein weiterer interessanter Punkt unter den Aktivitäten von gramnegativen Bakterien betrifft die Vibrionaceae. Kulturmedien zur Detektion der Art Vibrio erlauben nicht die Abgrenzung von der Art Aeromonas, die häufig in der Umwelt vorkommt und sehr nahe mit Vibrio verwandt ist. Die meisten der hier getesteten Vibrio-Arten, einschließlich der beiden wichtigsten Pathogene, V. cholerae und V. parahaemolyticus, exprimieren β-Ribofuranosidase nicht. Dies steht im Gegensatz zu Aeromonas-Arten, die in hohem Maß aktiv sind. Dies könnte eine einfache Möglichkeit sein, zwischen diesen beiden nahe verwandten Arten zu unterscheiden. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 1 gezeigt.

[0080] Von den getesteten grampositiven Bakterien waren nur 30,8% gegenüber diesem Substrat aktiv. Sämtliche Staphylokokken waren positiv, aber es bestand keine Abgrenzung zwischen den verschiedenen gestesteten Staphylococci-Arten. Streptokokken waren beinahe allgemein negativ, während Enterokokken („fäkale Streptokokken") sich in ihrer Aktivität unterschieden. Der wichtigste interessante Punkt war, dass Corynebacterium diphtheriae und Arcanobacterium haemolyticum gegenüber diesem Substrat aktiv waren. Beide Arten findet man im Rachen von infizierten Menschen und daher werden Rachenkulturen durchgeführt, um diese Pathogene zu isolieren und identifizieren. Die aerobe kommensale Flora des Rachens wird von Streptokokken dominiert und DHF-Ribosid kann eine einfache Möglichkeit zur Abgrenzung dieser beiden Pathogene von der normalen kommensalen Flora des Rachens bereitstellen. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 1: Hydrolyse von Glycosiden von 3',4'-Dihydroxyflavon durch gramnegative Bakterien

Stamm	Referenznummer	β-Glucosid	β-Ribosid
E. coli 0157	NCTC 12079	–	++
E. coli 0157	NCTC 12080	–	++
E. coli 0157	NCTC 12900	–	++
E. coli 0157	NCTC 13125	–	++
E. coli 0157	NCTC 13126	–	++
E. coli 0157	NCTC 13127	–	++
E. coli 0157	NCTC 13128	–	++
E. coli	NCTC 10418	–	++
E. coli	ECO 2	–	++
E. coli	ECO 3	–	++
E. coli	ECO 4	–	++
E. coli	ECO 5	–	++
E. coli	ECO 6	–	++
E. coli	ECO 7	–	++
E. coli	ECO 8	–	++
E. coli	ECO 9	–	++
E. coli	ECO 10	–	++
E. coli	ECO 11	–	++
E. coli	ECO 12	–	++
Shigella boydii	NCTC 9327	–	++
Shigella boydii	NCTC 9732	–	++
Shigella boydii	NCTC 9850	–	++
Shigella dysenteriae (type 4)	NCTC 9759	–	++
Shigella dysenteriae (type 2)	NCTC 9952	–	++
Shigella dysenteriae (type 3)	NCTC 9720	–	++
Shigella flexneri	NCTC 8192	–	++
Shigella flexneri	NCTC 9723	–	++
Shigella flexneri	NCTC 9780	–	++
Shigella sonnei	NCTC 9774	–	++
Shigella sonnei	NCTC 8574	–	++
Shigella sonnei	NCTC 10352	–	++
Shigella sonnei	NCTC 8219	–	++
Shigella sonnei	NCTC 8586	–	++
Hafnia alvei	NCTC 8105	–	++
Hafnia alvei	HAL 2	–	++
K. pneumoniae	NCTC 10896	–*	++

K. pneumoniae	KPN 2	–*	++
K. pneumoniae	KPN 3	–*	++
K. pneumoniae	KPN 4	–*	++
K. oxytoca	KOX 1	+	++
K. oxytoce	KOX 2	+	++
C. freundii	NCTC 9750	+	++
C. freundii	CFR 1	+	++
C. freundii	CFR 2	–	++
C. freundii	CFR 3	–	++
C. freundii	CFR 4	+	++
C. diversus	CDI 1	–	++
C. diversus	CDI 2	–	++
Serratia marcescens	NCTC 10211	+	++
Serratia spp.	SEX 1	+	++
Serratia spp.	SEX 2	+	++
Serratia spp.	SEX 3	–*	++
Serratia spp.	SEX 4	–*	++
Aeromonas hydrophila	NCTC 8049	++	++
Aeromonas caviae	NCTC 10852	++	++
Aeromonas sobria	NCTC 11215	–	0
E. cloacae	NCTC 11936	–*	++
E. cloacae	ECL 1	–*	++
E. cloacae	ECL 2	–*	++
E. cloacae	ECL 3	–*	++
E. cloacae	ECL 4	–*	++
E. aerogenes	NCIMB 10102	+	++
E. aerogenes	EAE 1	+	++
Salmonella typhimurium	NCTC 74	–	++
Salmonella typhi	NCTC 8385	–	++
Salmonella motevideo	SAX 55	–	++
Salmonella orenienburg	SAX 68	–	++
Salmonella hadar	SAX 57	–	++
Salmonella panama	SAX 58	–	++
Salmonella orthmarchen	SAX 59	–	++
Salmonella alachia	SAX 60	–	++
Y. enterocolitica	NCTC 11176	–	–
Y. enterocolitica	NCTC 11177	–	–
Y. enterocolitica	NCTC 11600	–	–
Y. enterocolitica	NCTC 10460	–	–
A. iwoffii	ATCC 15309	–	–
A. baumanii	ATCC 19606	–	–
A. calcoaceticus	ATCC 7844	–	–
P. aeruginosa	NCTC 10662	–	+
P. aeruginosa	ATCC 10145	–	+
M. morganii	NCTC 235	–	–
M. morganii	MMO 1	+	+
M. morganii	MMO 2	+	+
P. rettgeri	NCTC 7475	+	+
Providencia stuartii	PST 1	+	+
Providencia stuartii	PST 2	+	+
Providencia alcalifaciens	PAL 1	+	+
Providencia alcalifaciens	PAL 2	+	–
P. mirabilis	NCTC 10975	–	–
P. mirabilis	PMI 1	–	–
P. mirabilis	PMI 2	–	–
P. vulgaris	PVU 4	–	–
P. vulgaris	PVU 2	–	–
P. vulgaris	PVU 5	–	–
P. penneri	PPE 1	–	–
Vibrio parahaemolyticus	NCTC 12205	–	–

Vibrio parahaemolyticus	NCTC 11344	–	–
Vibrio furnissli	NCTC 11218	–	–
Vibrio hollisae	NCTC 11640	–	–
Vibrio cholera	NCTC 12945	–	–
Vibrio cholere	NCTC 10732	–	–
Vibrio cholera	NCTC 7270	–	–
Vibrio cholera	NCTC 6585	–	–
Vibrio cholera	NCTC 8021	–	–
Vibrio parahaemolyticus	NCTC 10903	–	–
Vibrio cincinnatiensis	NCTC 12012	+	–
Vibrio parahaemolyticus	NCTC 10441	–	–
Vibrio harveyi	NCTC 11346	+	++
Vibrio vulnificus	NCTC 11067	+	–
Vibrio metschnikovii	NCTC 8443	–	++
Vibrio cholerae	NCTC 8042	–	–
Vibrio cholorae	NCTC 10255	–	–
Vibrio cholorae	NCTC 10954	–	–
Vibrio mimicus	NCTC 15435	–	–
Vibrio anguillarum	NCTC 12159	–	–
Vibrio vulnificus	NCTC 11066	+	–
Vibrio fluvialis	NCTC 11327	++	++
Vibrio parahaemolyticus	NCTC 10884	–	–
Vibrio cholerae	NCTC 7254	–	–
Vibrio alcaligenes	NCTC 12160	–	–

Abkürzungen:

NCTC National Collection of Type Cultures (UK)
ATCC American Type Culture Collection

Legende

+ Positive Reaktion mit dem Substrat
++ Stark positive Reaktion mit dem Substrat
– Keine Reaktion nachweisbar
–* positive Reaktion erwartet, gemäß der Bestimmung unter Verwendung von Indoxyl-Glucosiden

[0081]

Tabelle 2: Hydrolyse von 3',4'-Dihydroxyflavon-β-glucosid und 3',4'-Dihydroxyflavon-β-ribosid durch grampositive Organismen

Stamm	Referenznummer	β-Glucosid	β-Ribosid
Streptococcus oralis	NCTC 11427	–	–
Streptococcus sanguis	NCTC 7863	–	–
Streptococcus consteliatus	NCTC 11325	–	–
Streptococcus mitis	NCTC 12261	–	–
Streptococcus salivarius	NCTC 8618	++	–
Streptococcus crista	NCTC 12479	–	–
Streptococcus vestibularis	NCTC 12166	–	–
Streptococcus gordonii	NCTC 7865	–	–
Streptococcus pneumoniae	NCTC 7465	–	–
Streptococcus agalactiae	NCTC 8181	–	–
Streptococcus milleri	wild	–	–
Haemolytic streptococcus A	1	–	–
Haemolytic streptococcus A	2	–	–
Haemolytic streptococcus A	3	–	–
Haemolytic streptococcus B	1	–	–

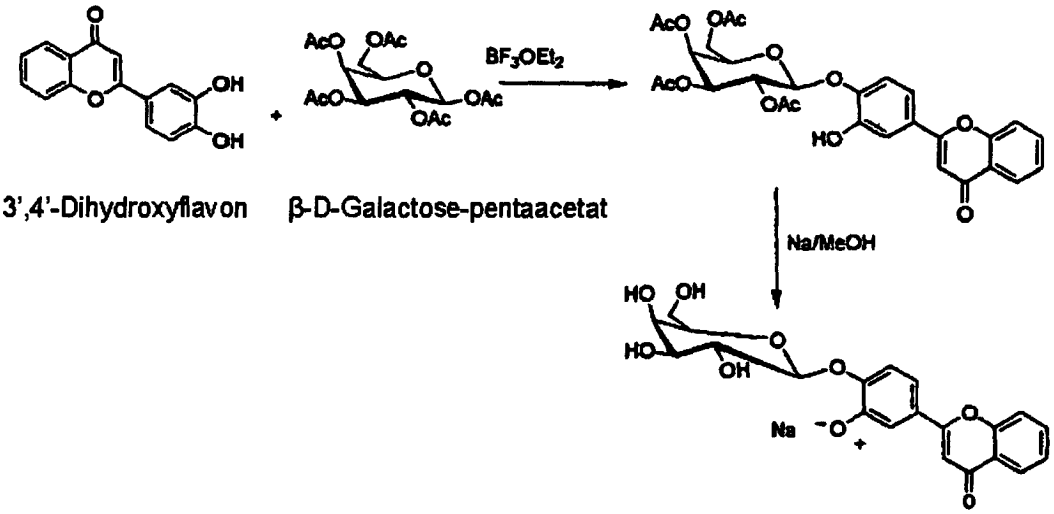
Haemolytic streptococcus B	2	–	–
Haemolytic streptococcus B	3	–	–
Haemolytic streptococcus C	1	–	–
Haemolytic streptococcus C	67736	–	–
Haemolytic streptococcus C	68350	–	–
Haemolytic streptococcus G	1	–	–
Haemolytic streptococcus G	2	–	–
Haemolytic streptococcus G	3	–	+
Listeria seerigeri	PHLS wild	++	–
Listeria innocua	PHLS wild	++	–
Listeria ivanovii	PHLS wild	++	+
Arcanobacterium haemolyticus	NCTC 52	–	+
Bacillus licusniforms	NCIMB 9375	+	–
Bacillus cereus	NCTC	+	–
Corynebacterium diphtheria	NEQAS	–	++
C. diphtheriae	NCTC 10356	–	++
C. diphtheriae	NCTC 11397	–	++
C. diphtheriae	NCTC 3987	–	+
Staphylococcus aureus	1	–	++
Staphylococcus aureus	2	–	++
Staphylococcus aureus	3	–	++
Staphylococcus aureus	4	–	++
Staphylococcus aureus	5	–	++
Staphylococcus haemolyticus	RB 66	–	+
Staphylococcus haemolyticus	RB 67	–	+
Staphylococcus haemolyticus	RB 68	–	+
Staphylococcus haemolyticus	RB 69	–	+
Staphylococcus haemolyticus	RB 70	–	+
Staphylococcus epidermidis	RB 60	–	++
Staphylococcus epidermidis	RB 62	–	+
Staphylococcus epidermidis	RB 63	–	+
Staphylococcus epidermidis	RB 64	++	+
Staphylococcus epidermidis	RB 65	–	+
Staphylococcus saprophyticus	1	–	++
Staphylococcus saprophyticus	2	–	++
Staphylococcus saprophyticus	3	–	++
Staphylococcus saprophyticus	4	–	++
Staphylococcus saprophyticus	5	–	++
Enterococcus raffinosis	NCTC 13192	++	+
Entenococcus mundtii	NCTC 12363	++	+
Enterococcus durans	NCTC 8307	++	–
Enterococcus gallinarum	NCTC 11428	++	+
Enterococcus faecium	121285 – wild '99	++	–
Enterococcus casseflavus	NCTC 12361	++	–
Enterococcus faecalis	1	++	–
Enterococcus faecalis	2	++	+
Enterococcus faecalis	3	++	+
Enterococcus faecalis	4	++	+
Enterococcus faecalis	5	++	+
Enterococcus faecalis	6	++	+
Enterococcus faecalis	7	++	–
Enterococcus faecium	1	++	–
Enterococcus faecium	2	++	–
Enterococcus faecium	3	++	–
Enterococcus faecium	4	++	+
Enterococcus faecium	5	++	–
Enterococcus faecium	6	++	+
Enterococcus faecium	7	++	–
NEGATIVE CONTROL		–	–

Legende

+ Positive Reaktion mit dem Substrat
++ Stark positive Reaktion mit dem Substrat
– Keine Reaktion nachweisbar
–* positive Reaktion erwartet, gemäß der Bestimmung unter Verwendung von Indoxyl-Glucosiden

Beispiel 3: 3',4'-Dihydroxyflavon-4'-β-D-galactopyranosid-Natriumsalz

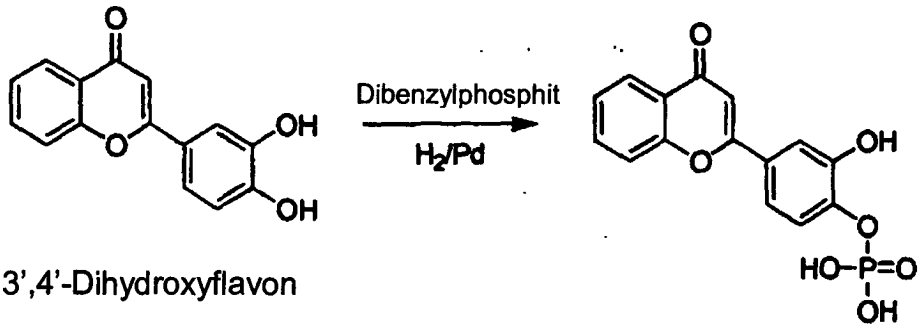
[0082] Natriumhydroxid (0,08 g) wurde in deionisiertem Wasser (2,33 g) gelöst und die resultierende Lösung wurde im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt. Inzwischen wurden 3',4'-Dihydroxyflavon (0,5 g), Acetobromgalactose (0,918 g) und Aceton (5,57 ml) in eine mit einem Magnetrührer versehene 25 ml-Rundbodenflasche gegeben und für 5 Minuten gerührt. Die abgekühlte Natriumhydroxidlösung wurde zu der Suspension von 3',4'-Dihydroxyflavon gegeben und das Gemisch wandelte sich von einer gelben/braunen Suspension in eine tiefrote/braune Lösung. Nach dem Rühren bei Raumtemperatur für 5–10 Minuten wurde das Reaktionsgemisch zu einer orangefarbenen/braunen Suspension. Das Rühren wurde bei Raumtemperatur übernacht fortgesetzt. Das präzipitierte 3',4'-Dihydroxyflavon wurde abfiltriert, mit Aceton (5–10 ml) gewaschen, und das Filtrat wurde unter Verwendung eines Rotationsverdampfers bis zur Ausbildung von zwei deutlichen Phasen eingedampft. Die obere Phase (wässrig) wurde verworfen und die untere Phase mit Dichlormethan (2 ml) trituriert, wodurch unreagiertes 3',4'-Dihydroxyflavon präzipitiert wurde. Nach dem Abfiltrieren des Präzipitats wurde die Dichlormethanlösung mit einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung (3 × 10 ml) und danach mit deionisiertem Wasser (5 ml) gewaschen. Die Dichlormethanlösung wurde von der Wasserphase getrennt, getrocknet (Magnesiumsulfat) und zur Trockenheit abgereichert und lieferte 311 mg des Acetat-Produkts. Methanol wurde zu dem Acetat (310 mg) gegeben und dieses vollständig gelöst. Die Lösung wurde durch die Zugabe einer gesättigten Natriummethoxidlösung in Methanol basifiziert. Bei pH 9 bildete sich ein grobes Präzipitat und das Gemisch wurde weiter basifiziert bis pH 10–11, dann übernacht stehen gelassen. Das Produkt wurde abfiltriert und mit Aceton (ungefähr 10 ml) gewaschen. Ausbeute: 80 mg (roter/brauner Feststoff).



Beispiel 4: 3',4'-Dihydroxyflavon-4'-phosphat

[0083] 3',4'-Dihydroxyflavon (127 mg) wurde in einer 50 ml-Rundbodenflasche mit Stickstoffeinlass und Seitenarm in Acetonitril (15 ml) suspendiert. Nach dem Begasen mit Stickstoff für 10 Minuten wurde die Suspension auf –10°C abgekühlt und Kohlenstofftetrachlorid (0,26 ml), Diisopropylethylamin (0,2 ml) und Dimethylaminopyridin (6 mg) wurden über den Seitenarm zugegeben. Nach dem Rühren für 1 Stunde wurde Dibenzylphosphit (290 mg) zugetropft. Nach 1 Stunde wurde ein Gemisch bestehend aus einer Lösung von Dihydrogenphospat (0,5 Mol) in Wasser (3 ml) und Acetonitril (20 ml) hinzu gegeben und die Lösung mit Ethylacetat (3 × 25 ml) extrahiert. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde die Lösung filtriert und das Filtrat im Vakuum konzentriert. Das so erhaltene orangefarbene Öl wurde in Methanol gelöst (15 ml) und es wurde ein

Katalysator (25 g) aus 10% Palladium auf Aktivkohle zugegeben. Nach dem Begasen mit Stickstoff wurden die Benzylgruppen durch das Einleiten von Wasserstoff in die Lösung für 1 Stunde bei atmosphärischem Druck entfernt. Die Lösung wurde dann filtriert und das Methanol durch Verdampfung entfernt. Der Rückstand wurde dann zwischen Chloroform (50 ml) und Wasser (50 ml) verteilt. Nach der Trennung von der organischen Phase wurde die wässrige Phase mit weiteren Portionen Chloroform (2 × 50 ml) gewaschen, bevor sie zur Trockenheit verdampft wurde. Triturierung mit einer minimalen Menge Diethylether lieferte das Produkt als Feststoff (87 mg).

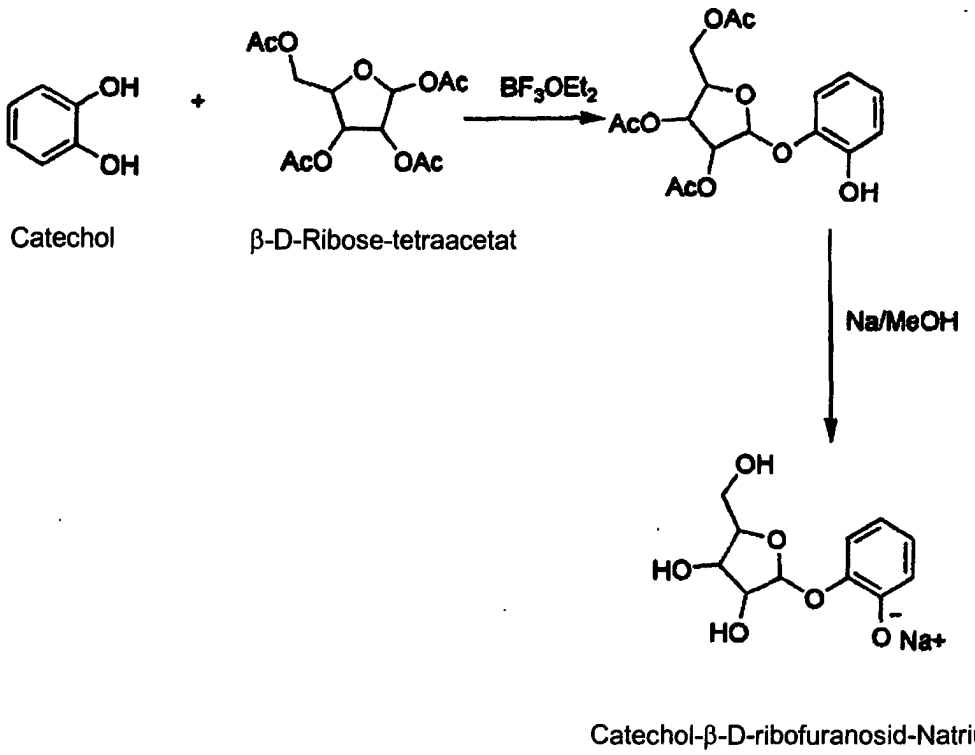


3',4'-Dihydroxyflavon

3',4'-Dihydroxyflavon-4'-phosphat

Beispiel 5: Synthese von Catechol-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz (2-Hydroxyphenyl-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz)

[0084] Ein mit einem Magnetrührer versehener 500-ml-Rundkolben wurde mit Catechol (33 g), einem Molekularsieb 3Å (20 g) und Dichlormethan (200 ml) beschickt. Die Lösung wurde für 10 Minuten gerührt, dann wurde Bortrifluoriddiethyletherat (10 ml) auf einmal hinzu gegeben. Nach 1 Stunde wurde das Reaktionsgemisch filtriert, dann wurde es in einem Scheidetrichter nacheinander mit gleichen Volumen von gesättigter Natriumbicarbonatlösung (fünfmal) und deionisiertem Wasser (zweimal) gewaschen, dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Entfernung des Trocknungsmittels und Verdampfung lieferte ein blassgelbes Öl, das langsam kristallisierte. Der Feststoff wurde in heißem vergällten Ethanol (IMS) (50 ml) gelöst und dann zur Vervollständigung der Kristallisation bei 4°C für 16 Stunden gelagert. Der weiße Feststoff wurde durch Vakuumfiltration gesammelt und mit IMS (20 ml) in zwei Portionen gewaschen. Nach einem Tag Trocknen an der Luft betrug die Ausbeute des geschützten Ribosids 17,1 g. Das geschützte Ribosid (15 g) wurde in Methanol (150 ml) suspendiert und eine Lösung, bestehend aus Natrium (2 g) in Methanol (50 ml), wurde dazu gegeben. Zunächst löste sich der Feststoff, wurde aber bald durch ein grobes Präzipitat ersetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 Stunden beiseite gestellt. Der Feststoff wurde dann durch Vakuumfiltration gesammelt und mit Methanol (5 ml) gewaschen. Der hygroskope Feststoff wurde dann unmittelbar in einen Exsikkator überführt und im Vakuum über Phosphorpentoxid für 6 Stunden getrocknet. Die Ausbeute an weißem Pulver betrug 4,3 g.



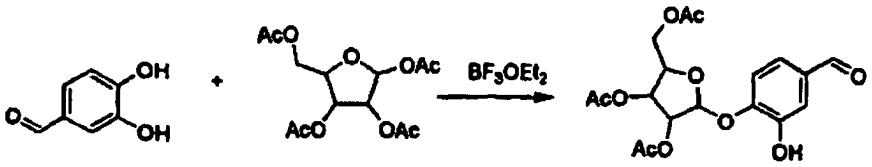
Catechol

β-D-Ribose-tetraacetat

Catechol-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz

Beispiel 6: Synthese von 3,4-Dihydroxybenzaldehyd-4-β-D-ribofuranosid-triacetat

[0085] In einem mit einem Magnetrührer versehenen 3-l-Rundkolben wurden 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (50 g), β-D-Ribose-tetraacetat (47 g), ein Molekularsieb 3Å (350 g) und Dichlormethan (1,4 l) vorgelegt. Nach dem Rühren dieses Gemischs für 5 Minuten wurde Bortrifluoriddiethyletherat (75 ml) auf einmal hinzu gegeben und das Rühren wurde für weitere 20 Minuten fortgesetzt, woraufhin das Molekularsieb durch Filtration entfernt wurde. Das Filtrat wurde mit einem gleichen Volumen gesättigter Natriumbicarbonatlösung viermal gewaschen, über Magnesiumsulfat für 1 Stunde getrocknet und dann zur Trockenheit verdampft. Der zurückbleibende blassgelbe Feststoff wurde in heißem IMS (70 ml) gelöst und bei 4°C für 6 Stunden gelagert. Das Produkt wurde durch Filtration gesammelt. Trocknen über Phosphorpentoxid im Vakuum lieferte 12,4 g eines cremefarbenen Feststoffs.



3,4-Dihydroxy-benzaldehyd

β-D-Ribose-tetraacetat

3,4-Dihydroxybenzaldehyd-β-D-ribofuranosid-triacetat

Beispiel 7: Synthese von 3,4-Dihydroxybenzaldehyd-4-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz

[0086] Zu einem Gemisch von 3,4-Dihydroxybenzaldehyd-4-β-D-ribofuranosid-triacetat (5,0 g), hergestellt wie in Beispiel 6, in Methanol wurde eine Lösung von Natrium (0,5 g) in Methanol (0,5 g) gegeben. Das Triacetat löste sich und wurde durch ein dichtes Präzipitat ersetzt. Nach 5 Stunden wurde dieses mittels Vakuum abfiltriert und auf dem Filter mit Methanol (5 ml) und Diethylether (10 ml) gewaschen. Das Trocknen für 4 Stunden im Vakuum über Phosphorpentoxid lieferte das Produkt als einen blass cremefarbenen Feststoff (3,1 g).

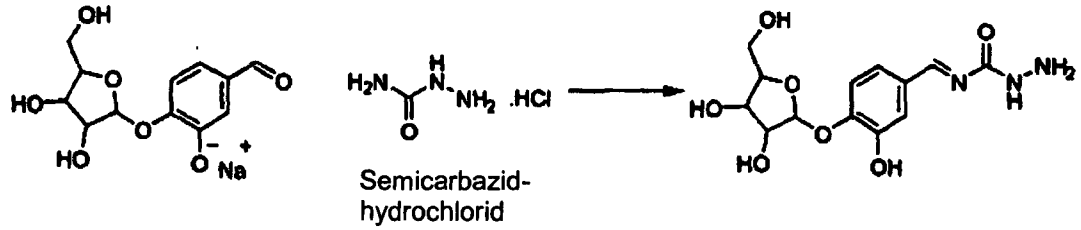


3,4-Dihydroxybenzaldehyd-β-D-ribofuranosid-triacetat

3,4-Dihydroxybenzaldehyd-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz

Beispiel 8: Synthese von 3,4-Dihydroxybenzaldehydsemicarbazon-4-β-D-ribofuranosid

[0087] Zu einer Lösung von 3,4-Dihydroxybenzaldehyd-4-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz (0,5 g), hergestellt wie in Beispiel 7, in deionisiertem Wasser (5 ml) wurde eine Lösung von Semicarbazidhydrochlorid (1 g) und Kaliumsulfat (1,5 g) in Wasser (5 ml) gegeben. Das Gemisch wurde in einem kochenden Wasserbad für 10 Minuten erhitzt, dann abkühlen gelassen. Nach dem Konzentrieren der Lösung auf die Hälfte seines ursprünglichen Volumens durch Verdampfung kristallisierte das Produkt aus. Es wurde durch Vakuumfiltration gesammelt und nach dem Waschen mit Wasser (2 ml) wurde es in einem Exsikkator im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Das Produkt war ein weißer Feststoff (300 mg).



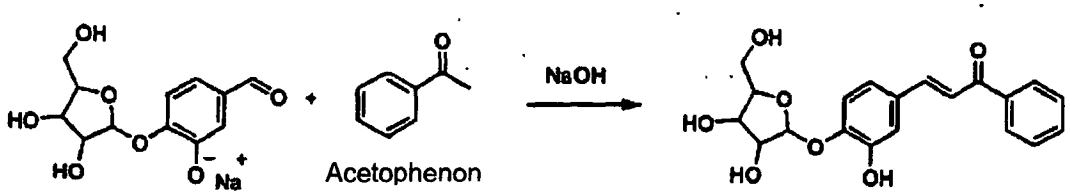
Semicarbazid-hydrochlorid

3,4-Dihydroxybenzaldehyd-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz

3,4-Dihydroxybenzaldehydsemicarbazon-β-D-ribofuranosid

Beispiel 9: Synthese von 3,4-Dihydroxychalcon-4-β-D-rbofuranosid

[0088] Zu einer Lösung von 3,4-Dihydroxybenzaldehyd-4-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz (0,25 g), hergestellt wie in Beispiel 7, in IMS wurde Natriumhydroxid (0,1 g) in deionisiertem Wasser (3 ml) und Acetophenon (0,1 g) gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 9 Tage gerührt; nach dieser Zeit war die Reaktion zur Trockenheit verdampft. Das Produkt wurde als ein roter Feststoff erhalten.



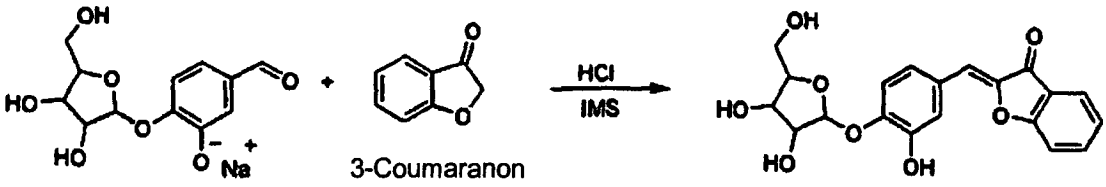
Acetophenon

3,4-Dihydroxybenzaldehyd-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz

3,4-Dihydroxychalcon-β-D-ribofuranosid

Beispiel 10: Synthese von 3',4'-Dihydroxyauron-4'-β-D-ribofuranosid

[0089] Zu einem Gemisch von 3,4-Dihydroxybenzaldehyd-4-β-D-ribofuranosid-triacetat (0,4 g), hergestellt wie in Beispiel 6, und 3-Coumaranon (0,17 g) in IMS (20 ml) wurde eine mit Wasserstoffchloridgas (0,05 ml) gesättigte Lösung von IMS gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 3 Tage gerührt und dann zur Trockenheit verdampft. Der resultierende Feststoff wurde in Methanol (2 ml) gelöst und eine Lösung von Natrium (50 mg) in Methanol (0,5 ml) wurde hinzu gegeben, was eine blutrote Lösung ergab. Diese Lösung wurde zur Trockenheit verdampft und zwischen deionisiertem Wasser (25 ml) und Dichlormethan (50 ml) verteilt. Die wässrige Phase wurde mit zwei weiteren Dichlormethanwaschungen extrahiert, bevor sie zur Trockenheit verdampft wurde. Das Produkt wurde als ein roter Feststoff erhalten.



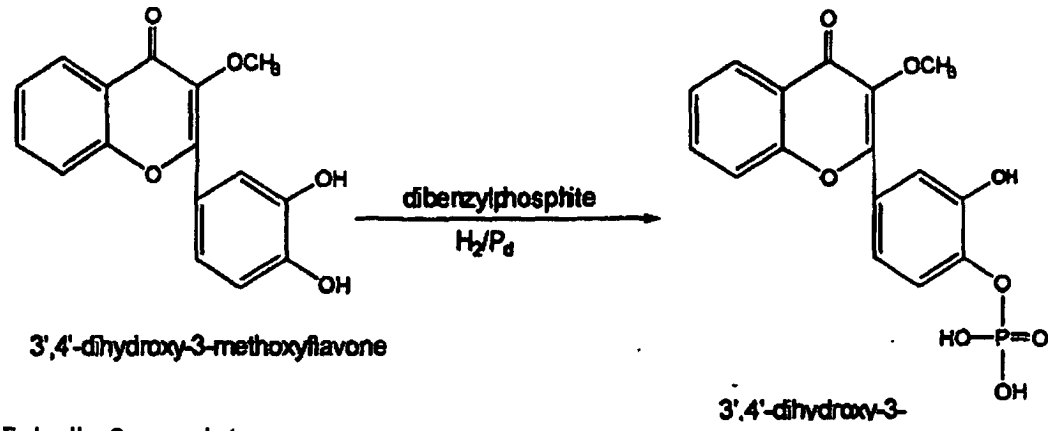
3,4-Dihydroxybenzaldehyd-β-D-ribofuranosid-Natriumsalz

3,4-Dihydroxyauron-β-D-ribofuranosid

Beispiel 11: Synthese und Bewertung von 3',4'-Dihydroxy-3-methoxyflavon-4'-phosphat

[0090] 3',4'-Dihydroxy-3-methoxyflavon (F. A. A. van Acker et al., J. Med. Chem., 43, 3752–3760, (2000)), (143 mg) wurde in einer 50 ml-Rundbodenflasche mit Stickstoffeinlass und Seitenarm in Acetonitril (15 ml) suspendiert. Nach dem Begasen mit Stickstoff für 10 Minuten wurde die Suspension auf –10°C abgekühlt und Kohlenstofftetrachlorid (0,26 ml), Diisopropylethylamin (0,2 ml) und Dimethylaminopyridin (6 mg) wurden über den Seitenarm hinzu gegeben. Nach dem Rühren für 1 Minute wurde Dibenzylphosphit (152 mg) zugetropft. Nach 1 Stunde wurde ein Gemisch, bestehend aus einer Lösung von Kaliumdihydrogenphosphat (0,5 Mol) in Wasser (3 ml) und Acetonitril (20 ml), hinzu gegeben und die Lösung mit Ethylacetat (3 × 25 ml) extrahiert. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde die Lösung filtriert und das Filtrat im Vakuum konzentriert. Das so erhaltene orangefarbene Öl wurde in Methanol (20 ml) gelöst und es wurde ein Katalysator (30 mg) aus 10% Palladium auf Aktivkohle hinzu gegeben. Nach dem Begasen mit Stickstoff wurden durch Einleiten von Wasserstoff in die Lösung für 1 Stunde bei atmosphärischem Druck die Benzylgruppen entfernt. Die Lösung wurde dann filtriert und das Methanol durch Verdampfung entfernt. Der Rückstand wurde dann zwischen Chloroform (50 ml) und Wasser (50 ml) verteilt. Nach der Trennung von der organischen Phase wurde die wässrige Phase mit weiteren Portionen Chloroform (2 × 50 ml) gewaschen, bevor sie zur Trockenheit verdampft wurde. Trituriерung mit der minimalen Menge von Azeton lieferte das Produkt als Feststoff (90 mg).

[0091] Bei der Bewertung wurde dasselbe Verfahren wie in Beispiel 1 verwendet und C. perfringens wurde anaerob inkubiert; die Hintergrundfarbe des Agars war olivgrün und Organismen, die Enzymaktivität zeigten, erzeugten dunkelgrüne Kolonien. Alle getesteten Arten wuchsen gut auf diesem Medium. Die Ergebnisse sind unten in



3',4'-dihydroxy-3-methoxyflavone

3',4'-dihydroxy-3-

Tabelle 3 gezeigt.

Dibenzylphosphit

Tabelle 3			
Stamm	Referenznummer	Kolonieerscheinungsbild	Interpretation
3',4'-Dihydroxy-3-methoxyflavon			
Acinetobacter iwoffii	ATCC 15309	farblos 3',4'-Dihydroxy-3-methoxyflavon-'4-Phosphat	negativ
Yersinia enterocolitica	NCTC 11197	farblos	negativ
Clostridium perfringens	NCTC 8181	dunkelgrün	positiv
Staphylococcus aureus	NCTC 6571	dunkelgrün	positiv
Escherichia coli	NCTC 10418	blassgrün	positiv
Enterococcus faecalis	NCTC 775	klein dunkelgrün/schwarz	positiv

Beispiel 12

3',4'-Dihydroxy-3-methoxyflavon-4'-β-D-galactopyranosid

[0092] Die in der Überschrift bezeichnete Verbindung wird aus 3',4'-Dihydroxy-3-methoxyflavon (wie in Beispiel 11 verwendet) durch ein Verfahren analog zu Beispiel 3 synthetisiert.

[0093] Die Verbindung wurde mit K. pneumoniae in der Gegenwart einer Auswahl verschiedener Metallsalze durch das in Beispiel 1 beschriebene Verfahren bewertet.

[0094] Die Metallsalze waren in einer Konzentration von 500 mg/l alle dem Medium beigesetzt. Das Medium enthielt weiterhin Isopropyl-D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Konzentration von 30 mg/l. Tabelle 4 gibt die Farbe der gebildeten Kolonien an.

Tabelle 4: Bewertung von 3',4'-Dihydroxy-3-methoxyflavon-4'-β-D-galactosid mit chelatbildenden Metallsalzen

Metall	Farbe der K. pneumoniae-Kolonien
Zn	kein Wachstum
Co	kein Wachstum
Mn	Blassorange
Sn	Gelb
Ba	Gelb
Al	Gelb
Sr	Gelb
Bi	Rostorange
Fe	Braun
Kein Metall	diffuses Gelb

Beispiel 13

3',4'-Dihydroxyflavon-4'-β-D-galactopyranosid mit verschiedenen Metallsalzen

[0095] Die Verbindung der Überschrift, synthetisiert wie in Beispiel 3 beschrieben, wurde in der Gegenwart einer Auswahl von Metallsalzen mit einem Inokulum von K. pneumoniae durch das in Beispiel 1 beschriebene Verfahren bewertet. Die Metallsalze wurden in einer Konzentration von 500 mg/l (als Salz) verwendet und das Medium enthielt außerdem 30 mg/l IPTG. Die Kulturen bildeten farbige Kolonien, wie in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5

Metall	Farbe der Kolonien
Zn	(hemmt; kein Wachstum)
Co	(hemmt; kein Wachstum)
Mn	Blassorange
Cu	Orange/braun
Sn	Blassgelb
Ba	Blassgelb
Al	Gelb
Sr	Gelb
Bi	Rostorange
Fe	Dunkelbraun oder Schwarz
Kein Metall	diffuses Blassgelb

Beispiel 14

3',4'-Dihydroxy-3-methoxyvflavon-4'-β-D-ribofuranosid

[0096] Das in der Überschrift bezeichnetet Substrat wurde aus demselben Flavon als Ausgangsmaterial wie in Beispiel 11 durch ein Verfahren analog dem in Beispiel 2 synthetisiert. Das Substrat wurde in der Gegenwart von Metallsalzen durch dasselbe Verfahren wie in Beispiel 1 beschrieben bewertet. Die getestete Art war E. coli. Die Präzipitate waren beinahe identisch zu den entsprechenden in Tabelle 4 genannten Produkten gefärbt. Bei der Verwendung von aluminiumsalzhaltigem Medium mit einer Mischkultur aus E. coli und Yersinia enterocolitica waren die E. coli-Kolonien leuchtend gelb und traten sehr deutlich hervor. Es trat im Wesentlichen keine Diffusion in die Y. enterocolitica-Kolonien (negativ bei diesem Substrat, daher farblos) auf, selbst wenn die Kolonien fast zusammenfielen.

Beispiel 15

3,4-Dihydroxy-2-methoxybenzophenon-4-β-D-glucopyranosid

[0097] Die Verbindung der Überschrift wurde aus 3,4-Dihydroxy-2-methoxybenzophenon und Acetobromglucose durch ein Verfahren analog zu Beispiel 3 hergestellt. Sie wurde als ein blassgelbes Pulver erhalten. 3,4-Dihydroxy-2-methoxybenzophenon wurde auf folgende Weise hergestellt: Zu einer Lösung von Natriumtetraborat (16 g) in Wasser (200 ml) wurde 2,3,4-Trihydroxybenzophenon (4,6 g) gegeben. Zu der gerührten Suspension wurde eine Lösung von Kaliumhydroxid (4,5 g) in Wasser (20 ml) gegeben, sodass eine Lösung mit einem pH von ungefähr 13 erhalten wurde. Dimethylsulfat (10 ml) wurde tropfenweise über 2 Stunden hinzu gegeben, während der pH mit zusätzlicher Kaliumhydroxidlösung nach Bedarf bei 12–13 gehalten wurde. Nach dem Stehenlassen für einen Tag bei 5°C wurde die Lösung durch die Zugabe von 4 M Salzsäure auf pH 3 acidifiziert, um ein gelbes Präzipitat zu erzeugen. Dieser Feststoff wurde durch Saugfiltration gesammelt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Umkristallisierung aus kochendem Ethanol lieferte 3,4-Dihydroxy-2-methoxybenzophenon als feine gelbe Kristalle.

[0098] Die Verbindung wurde in einem Screening von ausgewählten gramnegativen Bakterien unter Verwendung des in Beispiel 1 beschriebenen Verfahrens in der Gegenwart von Eisen(III)-ammoniumnitrat in einer Konzentration von 500 mg/l bewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 gezeigt. Der Hintergrund-Agar war beige.

[0099] Die Kolonien, die farbig waren, wiesen geringe Diffusion auf. Bei dem Test mit grampositiven Organismen schien die Verbindung wachstumshemmend zu sein.

Tabelle 6

Getesteter Organismus	Farbe der Kolonien	Wachstum
E. coli	Creme	++
S. sonnei	Creme	++
E. faecalis	Creme	Sp
L. monocytogenes	Blassschwarz	Sp
K. pneumoniae	Rot/Braun	++
S. aureus	Creme	++

Legende:

++ starkes Wachstum
Sp Spurenwachstum

Beispiel 16

Gemischte Substrate

[0100] Zwei Wachstumsmedien wurden hergestellt, von denen eines (B) ein Gemisch von Substraten enthielt, von denen eines gemäß der vorliegenden Erfindung war. Das andere Medium (A) enthielt ein Vergleichsgemisch oder -substrat. Die Medien wurden unter Verwendung von sechs Bakterienstämmen bewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 gezeigt. Die Synthese von X-β-D-Ribofuranosid ist in der WO-A-03035896 offenbart.

Medium A (Bestandteile pro Liter)

Columbia-Agar (Oxoid Ltd.)	40 g
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (auch bekannt als X-β-D-Ribofuranosid)	80 mg
6-Chlor-3-indolyl-β-D-glucopyranosid	200 mg

Medium B (Bestandteile pro Liter)

Columbia-Agar (Oxoid Ltd.)	40 g
3',4'-Dihydroxyflavon-4'-β-D-ribofuranosid	300 mg
6-Chlor-3-indolyl-β-D-glucopyranosid	200 mg
Eisen(III)-ammoniumcitrat	500 mg

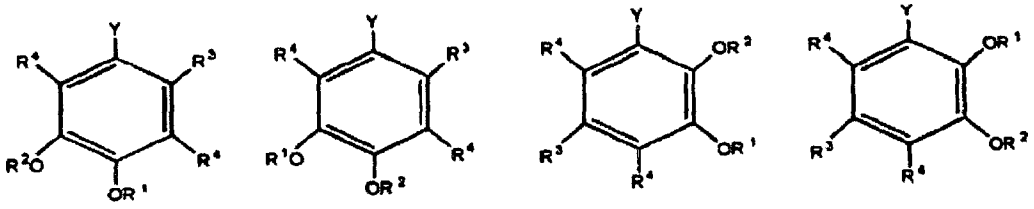
Tabelle 7

	A	B
Enterobacter cloacae NCTC 11936	Purpur	Schwarz
Escherichia coli NCTC 10418	Grün	Schwarz
Klebsiella pneumoniae NCTC 10896	Purpur	Schwarz
Salmonella typhimurium NCTC 74	Grün	Schwarz
Serratia marcescens NCTC 10211	Purpur	Schwarz
Yersinia enterocolitica NCTC 11176	Farblos	Farblos

[0101] Das zitierte Beispiel unter Verwendung von Medium A zeigt, dass das rosafarbene Glucosid (auch verwendet in dem Medium der Erfindung, Medium B) von einigen der Bakterienspezies hydrolysiert wird, und dass einige der Arten positiv für β-D-Ribofuranosidase sind. Medium B zeigt, dass das Produkt der Spaltung der Verbindung der vorliegenden Erfindung in der Gegenwart von Eisen das Spaltprodukt durch die Bildung eines schwarzen Präzipitats maskiert. Diese Fähigkeit könnte für einige Anwendungen von Nutzen sein.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion einer Enzymaktivität auf einem festen Medium, umfassend
a) das Inkontaktbringen eines Enzymsubstrats, das
i) einen chromogenen Anteil, umfassend einen Catechol-Rest, der eine Einheit darstellt, die aus der Entfernung eines oder beider Wasserstoffatome aus einem 1,2-Dihydroxybenzol oder einem substituierten Derivat davon, in welchem die Substituenten kein mit dem 1,2-Hydroxybenzol-Ring fusioniertes Ringsystem bilden, resultiert, und
ii) eine enzymatisch spaltbare Gruppe umfasst, die über eine Ester- oder Etherbindung mit dem Sauerstoffatom verbunden ist, das sich von einer Hydroxylgruppe des Catechol-Rests ableitet, und wobei das Enzymsubstrat eine der folgenden Formeln aufweist:



I II III IV

wobei R^1 und R^2 H oder eine enzymatisch spaltbare Gruppe sind, die aus der Gruppe, bestehend aus Glycosylen und Resten von Phosphat, Sulfat, Aminosäuren, Peptiden, Zuckern, Fettsäuren und Nukleotiden, ausgewählt ist, und
R^1 und R^2 nicht beide H sind,
R^3 und R^4 aus der Gruppe, bestehend aus H, C_1- bis C_6-Alkyl-, -Alkoxy, und
-Hydroxyalkyl-, Halogen-, Nitro-, Acyl-, Acyloxy-, Aralkyl-, Aryl- und Amino-Gruppen, ausgewählt und nicht zu einem fusionierten Ring verbunden sind; und
Y eine organische, weniger als 40 Atome enthaltende Einheit ist, welche die enzymatische Spaltung nicht stört und substituierte oder nicht substituierte Aryl- oder Heteroaryl-Gruppen mit 5 bis 18 Ringatomen umfasst,
mit einer Substanz, von der angenommen wird, dass sie ein Enzym enthält, das zur Spaltung der enzymatisch spaltbaren Gruppe befähigt ist, um eine gespaltene Verbindung herzustellen,
b) das Inkontaktbringen der gespaltenen Verbindung gegebenenfalls nach Zwischenreaktionen mit einem Metallion, das durch die gespaltene Verbindung chelatisierbar ist, oder das Produkt beliebiger Zwischenschritte, zur Herstellung eines im Wesentlichen nicht diffundierbaren, farbigen Präzipitats, das in Gegenwart des Substrats und des Metallions sichtbar ist,

c) das Detektieren des Vorhandenseins des nicht diffundierbaren Präzipitats.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Vorhandensein des nicht diffundierbaren Präzipitats unmittelbar das Vorhandensein der zu detektierenden Enzymaktivität anzeigt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das chelatisierbare Metallion während des Schritts a) vorliegt.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, wobei die chelatisierbare Metallion-Verbindung des Schritts b) ein Eisensalz, ein Aluminiumsalz oder ein Bismutsalz ist.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, wobei das farbige Präzipitat des Schritts c) mit dem Auge detektierbar ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Detektion durch einfallenden sichtbares Licht erfolgt.

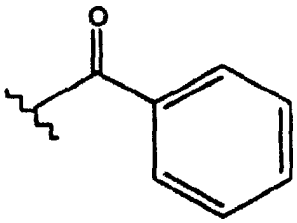
7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Catechol eine derivatisierende Gruppe aufweist, die sich in para-Stellung zum catecholischen Hydoxyl befindet, das durch die enzymatisch spaltbaren Gruppe substituiert ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der chromogene Anteil eine Dihydroxybenzaldehyd-, Dihydroxyflavonoid-, Dihydroxyauron-, Dihydroxychalcon- oder Dihydroxybenzophenon-Struktur umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei R^4 H ist.

10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei R^3 und R^4 H sind.

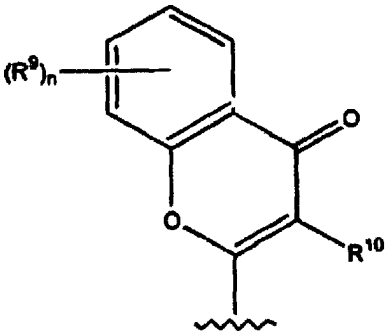
11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Y



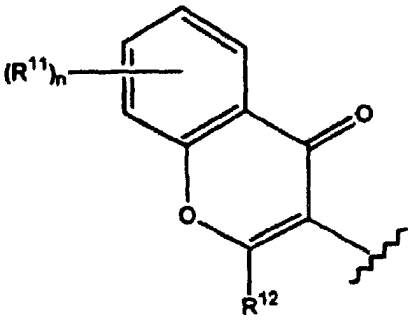
ist und substituierte Derivate davon.

12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Y eine Arylgruppe ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei Y eine Struktur gemäß IX oder X aufweist



IX



X

wobei $(R^9)_n$ und $(R^{11})_n$ einen oder mehrere Substituenten darstellen und R^{10} und R^{12} Substituenten sind, wobei sämtliche dieser die Enzymtätigkeit oder Metallion-Chelatisierung nicht stören.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei R^9 und R^{11} aus der Gruppe, bestehend aus Hydroxyl-, C_{1-24}-Alkyl-, C_{2-12}-Alkenyl-, C_{1-4}-Alkoxy-, Acyl-, einschließlich CHO und COPhe, wobei Phe Phenyl ist, =O-, Halogen-, Nitro-, Aryl- und Acyloxy-Gruppen, ausgewählt sind, und R^{10} und R^{12} aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff,

Hydroxyl-, C_{1-24}-Alkyl-, C_{2-12}-Alkenyl-, C_{1-4}-Alkoxy-, Acyl-, einschließlich CHO und COPhe, wobei Phe Phenyl ist, =O-, Halogen-, Nitro-, Aryl- und Acyloxy-Gruppen, ausgewählt sind.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei Y IX ist, und R^{10} Wasserstoff, Hydroxyl C_{1-4}-Alkoxy oder OR* ist, wobei R* eine enzymatisch spaltbare Gruppe ist.

16. Verfahren nach Anspruch 1, wobei R^3 und R^4 aus Wasserstoff, C_{1-6}-Alkyl-, -Alkoxy-, -Hydroxyalkyl-, Halogen-, Nitro-, Aldehyd-, Aryl- und Amido-Gruppen ausgewählt sind.

17. Verfahren nach Anspruch 1, wobei R^1 die enzymatisch spaltbare Gruppe ist, und R^2 H ist.

18. Verfahren nach Anspruch 1, wobei sowohl R^1 als auch R^2 enzymatisch spaltbare Gruppen sind, die gegebenenfalls gleich oder verschieden sein können.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Substanz, von der angenommen wird, dass sie eine Enzymaktivität enthält, Mikroben umfasst, und ein vorgeschalteter Verfahrensschritt das Züchten der Mikroben auf einem festen Medium einschließt.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Mikroben anaerob sind.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die enzymatisch spaltbaren Gruppen Phosphate sind.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 21, wobei die Mikroben Bakterien sind.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Mikroben Bodenbakterien sind.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die Bakterien Clostridien sind.

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das chromogene Enzymsubstrat und das Metallion in einem festen Medium vorliegen, das das Wachstum von Mikroben unterstützt.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das feste Medium das Wachstum von Bakterien unterstützt.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei das feste Medium eines oder mehrere zusätzliche Selektions- oder Detektionssysteme enthält.

28. Chromogenes Enzymsubstrat, das
i) einen chromogenen Anteil, der aus einem Catechol-Rest gebildet ist, der 3',4'-Dihydroxyflavon ist, und
ii) eine enzymatisch spaltbare Gruppe umfasst, die über eine Ester- oder Ether-Bindung mit dem Sauerstoffatom verbunden ist, das sich von einer Hydroxyl-Gruppe des Catechol-Rests ableitet, wobei die enzymatisch spaltbare Gruppe aus 4'-β-D-Glucuronyl, 4'-β-D-Galactopyranosyl, 4'-α-D-Galactopyranosyl, 4'-Decanoyl, 4'-Octanoyl, 4'-Inosit-1-phosphatyl, 4'-Phosphatyl, 4'-β-D-Ribofuranosyl, 4'-α-L-Arabinopyranosyl, 4'-Butyryl, 4'-Nonanoyl, 4'-Palmitoyl, 4'-Lignoceroyl, 4'-α-L-Fucopyranosyl, 4'-β-L-Fucopyranosyl, 4'-α-D-Fucopyranosyl, 4'-β-D-Fucopyranosyl, 4'-α-D-Mannopyranosyl, 4'-β-D-Mannopyranosyl, 4'-Oleoyl, 4'-Sulphatyl, 4'-α-D-Xylopyranosyl und 4'-β-D-Xylopyranosyl und Derivaten davon ausgewählt ist.

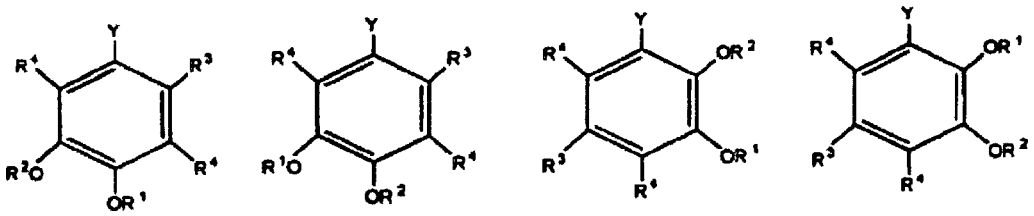
29. Chromogenes Enzymsubstrat, das
i) einen chromogenen Anteil, der aus einem Catechol-Rest gebildet ist, der 3,3',4'-Trihydroxyflavon ist, und
ii) eine enzymatisch spaltbare Gruppe umfasst, die über eine Ester- oder Ether-Bindung mit dem Sauerstoffatom verbunden ist, das sich von einer Hydroxyl-Gruppe des Catechol-Rests ableitet, wobei die enzymatisch spaltbare Gruppe aus 4'-β-D-Glucuronyl, 4'-β-D-Galactopyranosyl, 4'-α-D-Galactopyranosyl, 4'-Decanoyl, 4'-Octanoyl, 4'-Inosit-1-phosphatyl, 4'-Phosphatyl, 4'-β-D-Ribofuranosyl, 4'-α-L-Arabinopyranosyl, 4'-Butyryl, 4'-Nonanoyl, 4'-Palmitoyl, 4'-Lignoceroyl, 4'-α-L-Fucopyranosyl, 4'-β-L-Fucopyranosyl, 4'-α-D-Fucopyranosyl, 4'-β-D-Fucopyranosyl, 4'-α-D-Mannopyranosyl, 4'-β-D-Mannopyranosyl, 4'-Oleoyl, 4'-Sulphatyl, 4'-α-D-Xylopyranosyl und 4'-β-D-Xylopyranosyl und Derivaten davon ausgewählt ist.

30. Chromogenes Enzymsubstrat, das
i) einen chromogenen Anteil, der aus einem Catechol-Rest gebildet ist, welcher aus 3',4'-Dihydroxy-3-C_{1-6}-alkoxyflavon oder 3,7-Dimethylquercetin gebildet ist, und
ii) eine enzymatisch spaltbare Gruppe umfasst, die über eine Ester- oder Ether-Bindung mit dem Sauerstoffa-

tom verbunden ist, das sich von einer Hydroxyl-Gruppe des Catechol-Rests ableitet, wobei die enzymatisch spaltbare Gruppe aus 4'-β-D-Glucuronyl, 4'-β-D-Galactopyranosyl, 4'-α-D-Galactopyranosyl, 4'-Decanoyl, 4'-Octanoyl, 4'-Inosit-1-phosphatyl, 4'-Phosphatyl, 4'-β-D-Ribofuranosyl, 4'-α-L-Arabinopyranosyl, 4'-Butyryl, 4'-Nonanoyl, 4'-Palmitoyl, 4'-Lignoceroyl, 4'-α-L-Fucopyranosyl, 4'-β-L-Fucopyranosyl, 4'-α-D-Fucopyranosyl, 4'-β-D-Fucopyranosyl, 4'-α-D-Mannopyranosyl, 4'-β-D-Mannopyranosyl, 4'-Oleoyl, 4'-Sulphatyl, 4'-α-D-Xylopyranosyl und 4'-β-D-Xylopyranosyl und Derivaten davon ausgewählt ist.

31. Verbindung nach einem der Ansprüche 28 bis 30 in Form eines geeigneten Salzes oder eines Hydrats.

32. Kit aus Komponenten zur Verwendung bei der Detektion einer Enzymaktivität auf einem festen Medium, umfassend
a) ein Enzymsubstrat, das
i) einen chromogenen Anteil, umfassend einen Catechol-Rest, der eine Einheit darstellt, die aus der Entfernung eines oder beider Wasserstoffatome aus einem 1,2-Dihydroxybenzol oder einem substituierten Derivat davon, in welchem die Substituenten kein mit dem 1,2-Hydroxybenzol-Ring fusioniertes Ringsystem bilden, resultiert, und
ii) eine enzymatisch spaltbare Gruppe umfasst, die über eine Ester- oder Etherbindung mit dem Sauerstoffatom verbunden ist, das sich von einer Hydroxylgruppe des Catechol-Rests ableitet,
und wobei das Enzymsubstrat eine der folgenden Formeln aufweist:



wobei R^1 und R^2 H oder eine enzymatisch spaltbare Gruppe sind, die aus der Gruppe, bestehend aus Glycosylen und Restesn von Phosphat, Sulfat, Aminosäuren, Peptiden, Zuckern, Fettsäuren und Nukleotiden, ausgewählt ist, und
R^1 und R^2 nicht beide H sind,
R^3 und R^4 aus der Gruppe, bestehend aus H, C_1- bis C_6-Alkyl-, -Alkoxy, und
-Hydroxyalkyl-, Halogen-, Nitro-, Acyl-, Acyloxy-, Aralkyl-, Aryl- und Amino-Gruppen, ausgewählt und nicht zu einem fusionierten Ring verbunden sind; und
Y eine organische, weniger als 40 Atome enthaltende Einheit ist, welche die Enzymspaltung nicht stört und substituierte oder nicht substituierte Aryl- oder Heteroaryl-Gruppen mit 5 bis 18 Ringatomen umfasst, und
b) eine Metallion-Verbindung, die durch die Verbindung, welche aus dem gespaltenen chromogenen Anteil hervorgeht, chelatisierbar ist.

33. Kit nach Anspruch 32, wobei das Enzymsubstrat die zusätzlichen Merkmale nach einem der Ansprüche 7 bis 18 aufweist.

34. Kit nach Anspruch 32 oder 32, in welchem die Komponenten fertig gemischt oder in getrennten Behältern vorliegen.

35. Kit nach einem der Ansprüche 32 bis 34, das ein festes Medium umfasst, das das Wachstum von Mikroben unterstützt und das Substrat und das Metallion enthält.

36. Kit nach einem der Ansprüche 32 bis 35, in welchem das Metall ein Eisen-, Aluminium- oder Bismutsalz ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen