



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 031**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03769947 .7**

96 Fecha de presentación : **29.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1557473**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2005**

54 Título: **Composición de reactivos para discriminar β -lactamasas, kit y método asociados.**

30 Prioridad: **29.10.2002 JP 2002-314681**

73 Titular/es: **Showa Yakuhin Kako Co., Ltd.**
17-11 Kyobashi 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-0031, JP
Hideaki Hanaki

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.07.2009

72 Inventor/es: **Murata, Atsushi**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.07.2009

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 324 031 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición de reactivos para discriminar β -lactamasas, kit y método asociados.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición de reactivos para discriminar β -lactamasa, a un equipo o "kit" para detectar β -lactamasa, y a un método para discriminar β -lactamasa.

10 Técnica anterior

Las β -lactamasas, que son una familia de enzimas que hidrolizan el anillo de β -lactama contenido en una molécula de agente antibacteriano basado en β -lactama, se clasifican en las clases A, B, C y D en función de la homología de la secuencia aminoacídica de las proteínas de enzima. La β -lactamasa de espectro extendido (siglas inglesas ES-BL) es una enzima que tiene un conjunto más amplio de sustratos (es decir, agentes antibacterianos basados en β -lactama) que la enzima puede descomponer, en comparación con la clase A convencional de β -lactamasa. Estas β -lactamasas desactivan la acción antibacteriana de los agentes antibacterianos basados en β -lactama. En particular, se ha reconocido a la ESBL como causa de infecciones nosocomiales, y es considerada un grave problema. La administración de agentes antibacterianos basados en β -lactamas contra bacterias que han desarrollado resistencia a agentes antibacterianos basados en β -lactamas no sólo constituye una cura infructuosa, sino que podría conducir también a la diseminación de nuevas bacterias resistentes. Por tanto, es necesario detectar las β -lactamasas de manera rápida y precisa para establecer dicha cura.

Los métodos que se emplean actualmente para detectar las β -lactamasas se dividen a grandes rasgos en los cuatro métodos siguientes: (1) método cromogénico de cefalosporina, (2) método acidimétrico, (3) método yodimétrico, y (4) método UV. Además, se puede utilizar un método de cultivo para comparar las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC). Para los productos comercialmente disponibles destinados a la detección de β -lactamasas son fundamentales: un producto capaz de indicar si está presente o ausente β -lactamasa mediante el método cromogénico con cefalosporina, un producto capaz de detectar las β -lactamasas pertenecientes a la clase A y a la clase C empleando el método acidimétrico; un producto capaz de detectar β -lactamasa de la clase B o ESBL empleando el método de cultivo; y similar.

El método cromogénico con cefalosporina utiliza cefalosporina, que produce un cambio de color cuando su anillo β -lactámico es escindido por la aplicación de una β -lactamasa a la misma. Este método presenta la ventaja de que la sensibilidad de detección es excelente ya que el mismo reactivo da lugar al cambio de color. Sin embargo, los productos convencionales comercialmente disponibles que utilizan el método cromogénico con cefalosporina emplean como sustrato para la detección la nitrocefina (es decir, el ácido 3-[2,4-dinitroestiril]-7-(2-tienilacetamido)-3-cefem-4-carboxílico de la publicación de Patente Japonesa no examinada (JP Kokai) Sho 48-50787). Este producto no puede reaccionar con todas las clases de β -lactamasas, y no puede distinguir las clases entre sí, aunque la detección se puede realizar en un breve período de tiempo, es decir aproximadamente 30 minutos. Además, entre los productos basados en el método cromogénico con cefalosporina, no se conoce convencionalmente ningún producto que se caracterice por el empleo de nitrocefina en combinación con un inhibidor de β -lactamasa.

En el documento WO 02/24707 se describe un nuevo compuesto capaz de detectar la ESBL, basado en el método cromogénico con cefalosporina. Sin embargo, este documento no describe el uso combinado de un compuesto y un inhibidor de β -lactamasa particular, ni sugiere la posibilidad de detectar otras clases de β -lactamasas además de la ESBL.

Descripción de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición de reactivo para discriminar β -lactamasa, un kit para detectar β -lactamasa, y un método para discriminar β -lactamasa, que permitan la rápida discriminación de las β -lactamasas.

Los inventores de la presente invención han hallado que el objeto antes mencionado se puede lograr mediante el uso combinado de un sustrato particular para detección de β -lactamasa y un inhibidor de β -lactamasa, en donde el inhibidor de β -lactamasa está seleccionado del grupo consistente en una combinación de aztreonam y ácido etilendiaminotetraacético; una combinación de ácido clavulánico y ácido etilendiaminotetraacético; una combinación de aztreonam y ácido clavulánico.

En concreto, la presente invención proporciona una composición de reactivo para discriminar β -lactamasa, para uso con un método cromogénico con cefalosporina, que comprende un sustrato para detección de β -lactamasa y un inhibidor de β -lactamasa.

La presente invención proporciona también un kit para discriminar β -lactamasa que comprende una o más composiciones de reactivo para detección, seleccionadas del grupo consistente en (a) hasta (d) que se indica a continuación:

(a) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo como un sustrato para detección de β -lactamasa, y

ES 2 324 031 T3

una combinación de aztreonam y ácido etilendiaminotetraacético como un inhibidor de β -lactamasa;

(b) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo como un sustrato para detección de β -lactamasa, y

una combinación de ácido clavulánico y ácido etilendiaminotetraacético como un inhibidor de β -lactamasa;

(c) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo como un sustrato para detección de β -lactamasa, y

una combinación de aztreonam y ácido clavulánico como un inhibidor de β -lactamasa;

(d) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (2) o derivado de carboxilato del mismo como un sustrato para detección de β -lactamasa, y

una combinación de aztreonam y ácido etilendiaminotetraacético como un inhibidor de β -lactamasa.

La presente invención proporciona también un kit para discriminar β -lactamasa que comprende una o más composiciones de reactivo para detección seleccionadas del grupo consistente en (f), (g), (h) e (i) que se indican a continuación:

(f) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo como un sustrato para detección de β -lactamasa, y

aztreonam como un inhibidor de β -lactamasa;

(g) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo como un sustrato para detección de β -lactamasa, y

ácido clavulánico como un inhibidor de β -lactamasa;

(h) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (2) o derivado de carboxilato del mismo como un sustrato para detección de β -lactamasa, y

aztreonam como un inhibidor de β -lactamasa; e

(i) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (2) o derivado de carboxilato del mismo como un sustrato para detección de β -lactamasa, y

una combinación de aztreonam y ácido clavulánico como un inhibidor de β -lactamasa;

Además, la presente invención proporciona un método para detección de β -lactamasa que comprende el paso de poner en contacto una muestra líquida que contiene una sustancia diana que se ha de analizar, con la composición de reactivo para detectar β -lactamasa antes mencionada.

Además, la presente invención proporciona un método de discriminación de β -lactamasa que comprende el paso de poner en contacto una muestra líquida que contiene una sustancia diana que se ha de analizar, con la composición de reactivo para detectar β -lactamasa antes mencionada, contenida en una porción porta-muestras de un kit para detectar β -lactamasa.

La presente invención proporciona también un método de discriminación de β -lactamasa que comprende el paso de poner en contacto una muestra líquida que contiene una sustancia diana que se ha de analizar, con una composición de reactivo para detectar β -lactamasa contenida en una porción porta-muestras del kit para detectar β -lactamasa antes mencionado.

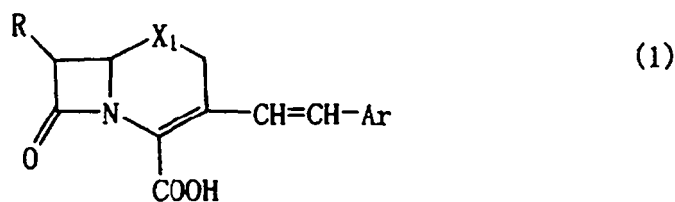
Breve descripción del dibujo

La Figura 1 es una vista esquemática en perspectiva que muestra una realización del kit para discriminar β -lactamasa de acuerdo con la presente invención.

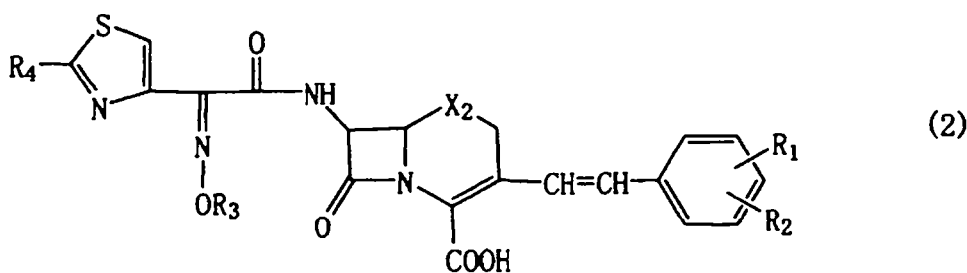
Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se basa en el método cromogénico con cefalosporina.

Un compuesto representado por la siguiente fórmula general (1) o sales fisiológicamente aceptables del mismo, descrito en el documento JP Kokai Sho 48-50787, o un compuesto representado por la siguiente fórmula general (2) o derivados de carboxilato del mismo, descrito en el documento WO 02/24707, documentos de patente que quedan incorporados por completo en el presente por referencia, se puede utilizar como sustrato para detectar las β -lactamasas para uso en la presente invención.



10 En la fórmula general (1), R es un grupo formamida o un grupo representado por la fórmula R^uCH_2CONH , R^uOCH_2CONH , R^uCONH , $R^uCH_2(NH_2)CONH$ ó $R^uC(=NOH)CONH$, en donde R^u es grupo tienilo, grupo fenilo o grupo naftilo; Ar es un grupo fenilo que tiene una sustitución con grupo ciano o grupo nitro en la posición 2-, 4-, ó 2,4-; y -X₁- es -S- ó -SO-.



20 En la fórmula general (2), R₁ y R₂, que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno átomo de hidrógeno, grupo nitro o grupo ciano; R₃ es un grupo alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono que puede tener un sustituyente de grupo carboxilo; R₄ es átomo de hidrógeno o grupo amino; y -X₂- es -S- ó -SO-, siempre que R₁ y R₂ no representen átomo de hidrógeno al mismo tiempo.

25 El compuesto representado por la fórmula general (1), que sirve como un sustrato para detección de β-lactamasa puede ser preferiblemente ácido 3-[2,4-dinitroestiril]-7-(2-tienilacetamido)-3-cefem-4-carboxílico o sales fisiológicamente aceptables del mismo.

30 Los compuestos preferibles representados por la fórmula general (2) incluyen un compuesto en el cual -X₂- es -S-; un compuesto en donde R₃ es grupo metilo que puede estar sustituido con grupo carboxilo o grupo propilo sustituido con grupo carboxilo; un compuesto en donde R₄ es grupo amino; y un compuesto en el cual -X₂- es -S-, R₃ es grupo metilo que puede estar sustituido con grupo carboxilo o grupo propilo sustituido con grupo carboxilo, y R₄ es grupo amino.

35 Los siguientes compuestos y derivados de carboxilato de los mismos son preferibles:

40 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

45 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(2,6-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

50 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(4-nitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

55 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(2,4-dicianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

60 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(4-cianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

65 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(2-cianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

ácido 7-[2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)-2-(tiazol-4-il)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico-1-óxido,

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(4-nitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

ES 2 324 031 T3

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(2,4-dicianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(2,6-dicianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

5 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(2-cianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiiminoacetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

10 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiiminoacetamido]-3-(2,6-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiiminoacetamido]-3-(4-nitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiiminoacetamido]-3-(2-nitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

15 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiiminoacetamido]-3-(2,4-dicianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiiminoacetamido]-4-(4-cianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

20 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiiminoacetamido]-4-(2-cianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

ácido 7-[2-carboximetoxiimino-2-(tiazol-4-il)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, y

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiiminoacetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico-1-
óxido.

25

En particular, los siguientes compuestos y derivados de carboxilato de los mismos son preferibles:

30 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(4-nitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

35 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(4-cianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(4-nitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

40 ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiiminoacetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, y

ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiiminoacetamido]-3-(4-nitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico.

45 En particular, es preferible ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico ó ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiiminoacetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico.

50 Se puede emplear como un inhibidor de β -lactamasa al menos uno seleccionado del grupo consistente en ácido clavulánico o aztreonam. El agente quelante - que es capaz de quelar ión zinc - es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

55 En particular, es preferible que el inhibidor de β -lactamasa esté seleccionado del grupo consistente en ácido clavulánico; aztreonam; una combinación de aztreonam y ácido etilendiaminotetraacético; una combinación de ácido clavulánico y ácido etilendiaminotetraacético; una combinación de aztreonam y ácido clavulánico.

Son ejemplos del uso combinado del sustrato para detección de β -lactamasa y el inhibidor de β -lactamasa, preferiblemente empleado en la presente invención los siguientes:

60 una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (1) antes mencionada o sal fisiológicamente aceptable del mismo en calidad de sustrato para detección de β -lactamasa, y al menos un inhibidor de β -lactamasa seleccionado del grupo consistente en ácido clavulánico, aztreonam, y ácido etilendiaminotetraacético; y

65 una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (2) antes mencionada o derivado de carboxilato del mismo en calidad de sustrato para detección de β -lactamasa, y al menos un inhibidor de β -lactamasa seleccionado del grupo consistente en ácido clavulánico, aztreonam, y ácido etilendiaminotetraacético.

ES 2 324 031 T3

Además, también es preferible una composición de reactivo para detección que incluye la composición (c) antes mencionada y además una o más composiciones seleccionadas del grupo consistente en (f) hasta (i) que se indican a continuación:

5 (f) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo como el sustrato para detección de β -lactamasa, y aztreonam como el inhibidor de β -actamasa;

10 (g) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo como el sustrato para detección de β -lactamasa, y ácido clavulánico como el inhibidor de β -actamasa;

15 (h) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (2) o derivado de carboxilato del mismo como el sustrato para detección de β -lactamasa, y aztreonam como el inhibidor de β -lactamasa; e

20 (i) una composición de reactivo para detección que comprende un compuesto representado por la fórmula general (2) o derivado de carboxilato del mismo como el sustrato para detección de β -lactamasa, y una combinación de aztreonam y ácido clavulánico como el inhibidor de β -lactamasa.

25 En la composición de reactivo para detección de la presente invención, la proporción en masa del sustrato para detección de β -lactamasa respecto al inhibidor de β -actamasa puede situarse preferiblemente en el intervalo de (1:10) a (100:1), más preferiblemente en el intervalo de (1:1) a (50:1), y más preferiblemente en el intervalo de (1:1) a (1:10).

30 La composición de reactivo para detección de la presente invención se puede preparar en forma de una disolución, disolviendo el sustrato para detección de β -actamasa y el inhibidor de β -lactamasa en un disolvente, por ejemplo agua, disolución tampón de fosfato, dimetilsulfóxido, o una mezcla de los mismos. De estos disolventes, es especialmente preferiblemente una mezcla de dimetilsulfóxido y disolución tampón de fosfato, y en este caso la proporción de mezcla no está particularmente limitada. Para ser más específico, se pueden disolver el sustrato para detección de β -lactamasa y el inhibidor de β -lactamasa en un disolvente de manera tal que la concentración del sustrato para detección de β -lactamasa puede situarse preferiblemente en el intervalo de 0,025 a 62,5 mg/mL, más preferiblemente 1,25 a 12,5 mg/mL, y que la concentración del inhibidor de β -lactamasa puede situarse preferiblemente en el intervalo de 0,0125 a 12,5 mg/mL, más preferiblemente 1,25 a 12,5 mg/mL, obteniendo así una disolución que contiene una composición de reactivo para detectar β -lactamasa.

40 Es preferible usar la composición de reactivo para detección de la presente invención ajustada para tener pH de 6,0 a 8,0. Preferiblemente se puede ajustar la composición de reactivo para detección a pH aproximadamente 5,5 a 8,5 en caso de que se utilice como un sustrato para detección de β -lactamasa el compuesto representado por la fórmula general (1) antes mencionada. Cuando se utiliza como el sustrato para detección de β -lactamasa el compuesto representado por la fórmula general (2) antes mencionada, la composición de reactivo para detección puede estar preferiblemente ajustada a pH aproximadamente 6,0 a 8,0.

45 La disolución que contiene composición de reactivo para detección, así preparada, puede contener además polímeros o similares, tales como polivinilpirrolidona, hidroximetilcelulosa, poli(cloruro de vinilo) y copolímero de ácido metacrílico) en una cantidad tal que no puedan perturbar los efectos de la presente invención. La adición de tales polímeros o similares es ventajosa porque la disolución que contiene la composición de reactivo para detección de la presente invención se hace más estable. De estos polímeros es particularmente preferible el copolímero de ácido metacrílico.

50 La muestra empleada en la presente invención se puede tomar, por ejemplo, de la faringe o de la cavidad nasal de los pacientes con una torunda de algodón y, además, de la orina, esputo, pus y similares. La muestra se puede preparar en forma líquida disolviendo la muestra en un disolvente tal como el agua, disolución tampón de fosfato, disolución salina fisiológica, y similares. Preferiblemente, se puede preparar la muestra líquida para que tenga una concentración de bacterias de 10^4 a 10^{10} UFC/mL.

55 La muestra líquida así preparada puede contener también oligosacárido, tensioactivo, dextrinas, y similares, en cantidades tales que no perturben los efectos de la presente invención.

60 El kit para discriminar β -lactamasa de la presente invención puede encontrarse en cualquier forma, siempre que la composición de reactivo para detección antes mencionada esté contenida en el mismo, por ejemplo en forma de un disco, combinación de un disco y una plancha, una placa, una tira, o similares. La forma preferiblemente usada es la de disco.

65 Cuando sea necesario, el kit de la presente invención puede incluir un líquido testigo positivo compuesto por una disolución que contiene β -lactamasa y la composición de reactivo para detección de la presente invención, y un líquido testigo negativo compuesto por una disolución que contiene el sustrato para detección de β -lactamasa.

ES 2 324 031 T3

La Figura 1 es una vista en perspectiva esquemática que muestra un kit para discriminar β -lactamasas de acuerdo con la presente invención, pero la presente invención no está limitada a ello. Haciendo referencia a la Figura 1, un kit de discriminación de acuerdo con la presente invención incluye un recipiente para muestras 1, y un elemento base 3 que se aloja en el recipiente y contiene diversas porciones portamuestras 2. La porción portamuestras 2 tiene una abertura sobre la cual se añade por goteo una muestra preparada (una muestra líquida o líquido testigo). Los materiales para el recipiente de muestras, elemento base, y las porciones portamuestras, que constituyen el kit de detección de la presente invención, no están particularmente limitados. No hay limitación para el tamaño y forma de dichas piezas.

Uno de los kits de acuerdo con la presente invención, preferibles, es el que contiene como una composición esencial la composición de reactivo para detección (c) antes mencionada, y contiene además una o más composiciones de reactivo para detección seleccionadas del grupo consistente en las composiciones (a), (b) y (d).

También se prefiere el kit para detectar β -lactamasa que contiene como una composición esencial la composición de reactivo para detección (d), y contiene además una o más composiciones de reactivo para detección seleccionadas del grupo consistente en las composiciones (a), (b) y (c).

En particular, es preferible el kit para detectar β -lactamasa que contiene todas las composiciones de reactivo para detección (a) hasta (d).

Además, se emplea preferiblemente el kit de acuerdo con la presente invención que contiene una o más composiciones de reactivo para detección seleccionadas del grupo consistente en las composiciones (c) y (f) hasta (i).

Se emplea más preferiblemente el kit de acuerdo con la presente invención que contiene como composición esencial la composición de reactivo para detección (c), y contiene además una o más composiciones de reactivo para detección seleccionadas del grupo consistente en las composiciones (f), (g), (h) e (i).

También se emplea preferiblemente el kit para detectar β -lactamasa de acuerdo con la presente invención que contiene como composición esencial la composición de reactivo para detección (h) antes mencionada, y contiene además una o más composiciones de reactivo para detección seleccionadas del grupo consistente en las composiciones (c), (f), (g) e (i).

En particular, es más preferible el kit para detectar β -lactamasa que contiene todas las composiciones de reactivo para detección (c) y (f) hasta (d) antes mencionadas.

En el kit de discriminación de la presente invención es muy preferible que en las composiciones de reactivo para detección (a) hasta (d) y (f) hasta (i) antes mencionadas esté contenido como sustrato para detectar las β -lactamasas ácido 3-[2,4-dinitroestiril]-7-(2-tienilacetamido)-3-cefem-4-carboxílico o ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-metiletoxiimino)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico (denominado en lo sucesivo "compuesto HMRZ").

Empleando el kit de acuerdo con la presente invención se pueden discriminar rápidamente en una operación las β -lactamasas de clase A, B, C y D, y ESBL. Por tanto, el uso del kit de acuerdo con la presente invención conducirá a la elección de un agente antibacteriano apropiado, lo que puede incrementar adicionalmente los efectos de la cura.

La presente invención se refiere también a un método de discriminación de β -lactamasas que comprende el paso de añadir una muestra líquida que contiene una sustancia diana que ha de ser analizada, a una disolución que contiene cualquiera de las composiciones de reactivo para discriminar β -lactamasas, antes mencionadas.

El método de la presente invención incluye el paso de añadir una muestra líquida que contiene una sustancia diana que ha de ser analizada, a la disolución que contiene la composición de reactivo para detectar β -lactamasas, preparada de la manera antes descrita. Es posible discriminar entre positivo y negativo observando si el tono de color ha cambiado de amarillo a rojo, o no, tras haber transcurrido un tiempo determinado, por ejemplo aproximadamente 30 minutos, a una temperatura predeterminada, por ejemplo a temperatura ambiente. Además, el ensayo de actividad se puede llevar a cabo también midiendo un cambio en el tono de color a una longitud de onda particular.

Empleando el método de la presente invención, es posible detectar rápidamente β -actamasas en la orina y esputo de pacientes con enfermedades causadas, por ejemplo, por bacterias productoras de β -lactamasas, por ejemplo infección uretral y neumonía, e infecciones nosocomiales derivadas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

Ejemplos

1. Preparación de disolución que contiene composición de reactivo para detectar β -lactamasa

Se disolvieron 1,25 mg de sustrato para detección de β -lactamasa y 1,25 mg de un inhibidor de β -lactamasa, mostrados ambos en la siguiente Tabla 1, en un disolvente mezcla de 0,1 mL de dimetilsulfóxido y 0,9 mL de una disolución tampón de fosfato, con el fin de preparar una disolución que contiene composición de reactivo para detectar β -lactamasa.

TABLA 1

Reactivo n°	sustrato para detección de β -lactamasa	inhibidor de β -lactamasa
1	Nitrocefina	--
2	Nitrocefina	AZT, EDTA
3	Nitrocefina	CVA, EDTA
4	Nitrocefina	AZT, CVA
5	compuesto HMRZ	AZT, EDTA
6	compuesto HMRZ	AZT, CVA, EDTA
7	compuesto HMRZ	--
8	Nitrocefina	AZT
9	Nitrocefina	CVA
10	Nitrocefina	AZT, CVA
11	compuesto HMRZ	AZT
12	compuesto HMRZ	AZT, CVA

En la tabla precedente,

nitrocefina indica ácido 3-[2,4-dinitroestiril]-7-(2-tienilacetamido)-3-cefem-4-carboxílico,

compuesto HMRZ indica ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

AZT significa aztreonam, EDTA significa ácido etilendiaminotetraacético, y CVA significa ácido clavulánico.

2. Preparación de la placa

La disolución obtenida que contiene la composición de reactivo para detectar β -lactamasa se aplicó a una microplaca de manera que las cantidades de sustrato para detección de β -lactamasa y de inhibidor de β -lactamasa pudieran ser individualmente 12,5 μ g por pocillo.

3. Preparación de muestra líquida que contiene sustancia diana que ha de ser analizada

Empleando bacterias que no producen β -lactamasa, bacterias que producen β -lactamasa de clase A, bacterias que producen β -lactamasa de clase B, bacterias que producen β -lactamasa de clase C, y bacterias que producen ESBLE, indicadas en la Tabla 2, se preparó cada una de las muestras líquidas inoculando cada tipo de bacteria en una disolución tampón de fosfato para conseguir una concentración de 10^8 UFC/mL.

ES 2 324 031 T3

TABLA 2

Enzima producida	Nombre de la bacteria
no produce enzima	<i>S. aureus</i>
Clase A	<i>K. pneumoniae</i>
Clase B	<i>S. marcescens</i>
Clase C	<i>S. marcescens</i>
ESBL	<i>E. coli</i>

4. Reactividades a β -lactamasas

Se inoculó la muestra líquida en la microplaca anteriormente preparada, en una cantidad de 50 μ L/pocillo. Las reactividades hacia las β -lactamasas se examinaron observando el cambio en el tono de color 30 minutos después de la inoculación.

TABLA 3

Reactividades a β -lactamasas

Enzima producida	Reactivo n°											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ninguna	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Clase A	+	+	--	--	--	--	--	+	--	--	--	--
Clase B	+	--	--	+	--	--	±	+	+	+	±	±
Clase C	+	--	+	--	--	--	±	--	+	--	--	--
ESBL	+	+	--	--	+	--	±	+	--	--	+	--

+: positivo (el color ha cambiado de amarillo a rojo)

-- : negativo (el color amarillo no ha cambiado)

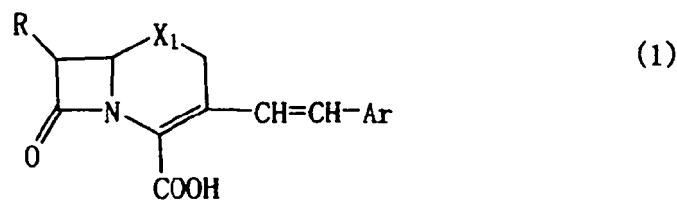
± : (se ha observado un ligero cambio)

De acuerdo con la presente invención, se pueden detectar β -lactamasas rápida y fácilmente, con alta sensibilidad. Además, el uso combinado de una composición de reactivo para detección particular y un inhibidor particular puede posibilitar incluso la detección de la clase de β -lactamasa, con un ligero error de detección en la presente invención. La rápida discriminación de la clase puede conducir a la elección de un agente antibacteriano apropiado, lo que proporciona una cura muy eficaz.

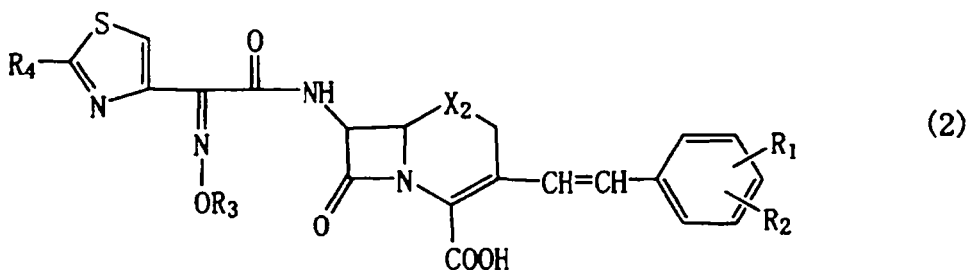
REIVINDICACIONES

1. Una composición de reactivo para discriminar la clase de β -lactamasa para uso con un método cromogénico con cefalosporina, que comprende un sustrato para detección de β -lactamasa y un inhibidor de β -lactamasa, en donde el inhibidor de β -lactamasa está seleccionado del grupo consistente en una combinación de aztreonam y ácido etilendiaminotetraacético; una combinación de ácido clavulánico y ácido etilendiaminotetraacético; una combinación de aztreonam y ácido clavulánico.

2. La composición de reactivo para discriminar la clase de β -lactamasa según la reivindicación 1, en donde el sustrato para detección de β -lactamasa es un compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo, o un compuesto representado por la fórmula general (2) o derivado de carboxilato del mismo:



en donde R es un grupo formamida o un grupo representado por la fórmula $R^u\text{CH}_2\text{CONH}$, $R^u\text{OCH}_2\text{CONH}$, $R^u\text{CONH}$, $R^u\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{CONH}$ ó $R^u\text{C}(=\text{NOH})\text{CONH}$, en donde R^u es un grupo tienilo, grupo fenilo o grupo naftilo; Ar es un grupo fenilo que tiene una sustitución con grupo ciano o grupo nitro en la posición 2-, 4-, ó 2,4-; y $-X_1-$ es $-S-$ ó $-SO-$;



en donde R_1 y R_2 , que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno átomo de hidrógeno, grupo nitro o grupo ciano; R_3 es un grupo alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono que puede tener un sustituyente de grupo carboxilo; R_4 es átomo de hidrógeno o grupo amino; y $-X_2-$ es $-S-$ ó $-SO-$, siempre que R_1 y R_2 no representen átomo de hidrógeno al mismo tiempo.

3. Un kit para discriminar la clase de β -lactamasa que comprende una o más composiciones de reactivo para detección, seleccionadas del grupo consistente en:

(a) una composición de reactivo para detección que comprende como un sustrato para detección de β -lactamasa el compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo según la reivindicación 2, y como un inhibidor de β -lactamasa una combinación de aztreonam y ácido etilendiaminotetraacético;

(b) una composición de reactivo para detección que comprende como un sustrato para detección de β -lactamasa el compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo según la reivindicación 2, y como un inhibidor de β -lactamasa una combinación de ácido clavulánico y ácido etilendiaminotetraacético;

(c) una composición de reactivo para detección que comprende como un sustrato para detección de β -lactamasa el compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo según la reivindicación 2, y como un inhibidor de β -lactamasa una combinación de aztreonam y ácido clavulánico;

(d) una composición de reactivo para detección que comprende como un sustrato para detección de β -lactamasa el compuesto representado por la fórmula general (2) o derivado de carboxilato del mismo según la reivindicación 2, y como un inhibidor de β -lactamasa una combinación de aztreonam y ácido etilendiaminotetraacético.

4. El kit para discriminar la clase de β -lactamasa según la reivindicación 3, que comprende como una composición esencial la composición de reactivo para detección (c) según la reivindicación 3, y comprende además una o más composiciones de reactivo para detección seleccionadas del grupo consistente en las composiciones de reactivo para detección (a), (b) y (d) según la reivindicación 3.

ES 2 324 031 T3

5. El kit para discriminar la clase de β -lactamasa según la reivindicación 3, que comprende como una composición esencial la composición de reactivo para detección (d) según la reivindicación 3, y comprende además una o más composiciones de reactivo para detección seleccionadas del grupo consistente en las composiciones de reactivo para detección (a), (b) y (c) según la reivindicación 3.

6. El kit para discriminar la clase de β -lactamasa según la reivindicación 3, que comprende todas las composiciones de reactivo para detección (a) hasta (d) según la reivindicación 3.

7. Un kit para discriminar la clase de β -lactamasa que comprende una o más composiciones de reactivo para detección, seleccionadas del grupo consistente en:

(h) una composición de reactivo para detección que comprende como un sustrato para detección de β -lactamasa el compuesto representado por la fórmula general (2) o derivado de carboxilato del mismo según la reivindicación 2, y como un inhibidor de β -lactamasa aztreonam; e

(i) una composición de reactivo para detección que comprende como un sustrato para detección de β -lactamasa el compuesto representado por la fórmula general (2) o derivado de carboxilato del mismo según la reivindicación 2, y como un inhibidor de β -lactamasa una combinación de aztreonam y ácido clavulánico.

8. El kit para discriminar la clase de β -lactamasa según la reivindicación 7, que comprende además la composición de reactivo para detección (c) según la reivindicación 3.

9. El kit para discriminar la clase de β -lactamasa según la reivindicación 7, que comprende como una composición esencial la composición de reactivo para detección (h) según la reivindicación 7, y comprende además una o más composiciones de reactivo para detección seleccionadas del grupo consistente en:

(f) una composición de reactivo para detección que comprende como un sustrato para detección de β -lactamasa el compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo según la reivindicación 2, y como un inhibidor de β -lactamasa aztreonam; y

(g) una composición de reactivo para detección que comprende como un sustrato para detección de β -lactamasa el compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo según la reivindicación 2, y como un inhibidor de β -lactamasa ácido clavulánico; e

(i) una composición de reactivo para detección que comprende como un sustrato para detección de β -lactamasa el compuesto representado por la fórmula general (2) o derivado de carboxilato del mismo según la reivindicación 2, y como un inhibidor de β -lactamasa una combinación de aztreonam y ácido clavulánico;

10. El kit para discriminar la clase de β -lactamasa según la reivindicación 7, que comprende todas las composiciones de reactivo para detección (h) hasta (i) según la reivindicación 7 y las composiciones de reactivo para detección (f) y (g) según la reivindicación 9.

11. Un método para discriminar la clase de β -lactamasa, que comprende poner una muestra líquida que contiene una sustancia diana cuya clase se ha de discriminar, en contacto con la composición de reactivo para detectar β -lactamasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

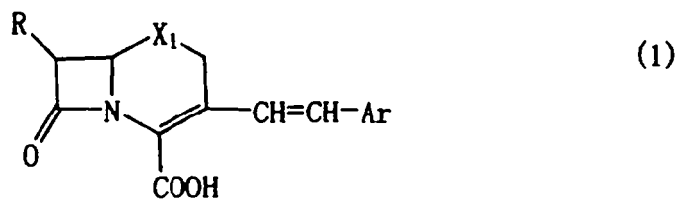
12. Un método para discriminar la clase de β -lactamasa según la reivindicación 11, en donde la composición de reactivo está contenida en una porción porta-muestras de un kit para detectar β -lactamasa.

13. Un método para discriminar la clase de β -lactamasa, que comprende poner una muestra líquida que contiene una sustancia diana que se ha de discriminar, en contacto con una composición de reactivo para detectar β -lactamasa contenida en una porción porta-muestras del kit para detectar β -lactamasa según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10.

14. Uso de un sustrato para detección de β -lactamasa en combinación con un inhibidor de β -lactamasa seleccionado del grupo consistente en: una combinación de aztreonam y ácido etilendiaminotetraacético; una combinación de ácido clavulánico y ácido etilendiaminotetraacético; una combinación de aztreonam y ácido clavulánico para producir una composición de reactivo para discriminar la clase de β -lactamasa, para uso con un método cromogénico con cefalosporina.

15. Uso según la reivindicación 14, en donde el sustrato para detección de β -lactamasa es un compuesto representado por la fórmula general (1) o sal fisiológicamente aceptable del mismo, o un compuesto representado por la fórmula general (2) o derivado de carboxilato del mismo:

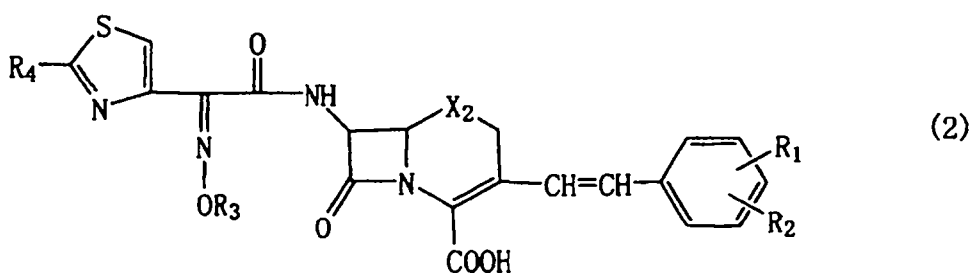
5



10

15 en donde R es un grupo formamida o un grupo representado por la fórmula $R^u\text{CH}_2\text{CONH}$, $R^u\text{OCH}_2\text{CONH}$, $R^u\text{CONH}$, $R^u\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{CONH}$ ó $R^u\text{C}(=\text{NOH})\text{CONH}$, en donde R^u es un grupo tienilo, grupo fenilo o grupo naftilo; Ar es un grupo fenilo que tiene una sustitución con grupo ciano o grupo nitro en la posición 2-, 4-, ó 2,4-; y $-X_1-$ es $-S-$ ó $-SO-$;

20



25

30

en donde R_1 y R_2 , que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno átomo de hidrógeno, grupo nitro o grupo ciano; R_3 es un grupo alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono que puede tener un sustituyente de grupo carboxilo; R_4 es átomo de hidrógeno o grupo amino; y $-X_2-$ es $-S-$ ó $-SO-$, siempre que R_1 y R_2 no representen átomo de hidrógeno al mismo tiempo.

35

40

45

50

55

60

65

FIG.1

