



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 694**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02785384 .5**

96 Fecha de presentación : **12.11.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1444358**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2004**

54 Título: **Procedimiento para la caracterización y/o identificación de mecanismos activos de sustancias de prueba antimicrobicas.**

30 Prioridad: **12.11.2001 DE 101 55 185**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.01.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.01.2010**

73 Titular/es: **Synthon KG.**  
**Karl-Christ-Str. 39**  
**69118 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es: **Labischinski, Harald;**  
**Schiffer, Guido;**  
**Schmitt, Jürgen y**  
**Udelhoven, Thomas**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 331 694 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

Procedimiento para la caracterización y/o identificación de mecanismos activos de sustancias de prueba antimicrobicas.

La presente invención comprende un procedimiento para la caracterización y/o identificación de mecanismos activos, especialmente, sustancias de prueba de acción antimicrobiana, mediante análisis IR (infrarrojo), FT-IR (infrarrojo por transformada de Fourier), Raman o FT-Raman (Raman por transformada de Fourier).

Estudios epidemiológicos han demostrado que las tasas de resistencia de microorganismos patógenos, por ejemplo, de gérmenes bacterianos, contra sustancias inhibitoras e inhibidores usuales en el mercado, por ejemplo, antibióticos, antimicóticos y otros agentes quimioterapéuticos, se han incrementado en el transcurso de las dos últimas décadas [Levy S.B. (2001) Antibiotic resistance: consequences of inaction. (Resistencia a antibióticos: consecuencias de la inacción. Clin Infect Dis Sep 15; 33 Suppl 3: páginas 124-9)]. Para seguir garantizando también en el futuro el tratamiento terapéutico de infecciones bacterianas, en este contexto de tasas de resistencia contra antibióticos conocidos, en todo el mundo se realizan esfuerzos para identificar y desarrollar nuevos compuestos cabeza de serie (leads) para la terapia con antibióticos. Para ello, es de central importancia la investigación y el desarrollo del mecanismo activo de tales compuestos cabeza de serie antimicrobianos. Por el término mecanismo activo (información de diana -target-) se entiende, en este caso, la identificación de las rutas metabólicas hasta los procedimientos moleculares individuales que se encuentran en relación causal con el efecto antimicrobiano de un nuevo compuesto cabeza de serie. Por un lado, el conocimiento de la estructura microbiana de destino, de la diana, permite una optimización rápida y eficiente del compuesto cabeza de serie *in vitro*, por ejemplo, en un análisis subcelular de la diana (target-assay); por otro lado, pueden reconocerse ya tempranamente potenciales efectos secundarios toxicológicos basados en la inhibición de una diana homóloga que posiblemente también se encuentre en el huésped, en una contraprueba correspondiente. En el caso del conocimiento de la diana molecular o del dominio de la diana, se puede impedir, por otro lado, el desarrollo de una sustancia antimicrobica de prueba con mecanismo activo no selectivo (por ejemplo, acción detergente general destructora de membrana, destrucción del potencial de membrana a través de ionóforos, intercalación en ácidos nucleicos), gracias a lo cual se pueden ahorrar, entre otros, costos de investigación.

Los antibióticos utilizados hoy en día en la terapia de humanos se caracterizan por el efecto específico sobre un metabolismo esencial para la supervivencia de la bacteria (compárese, por ejemplo, con Graefe U. (1992) Biochemie der Antibiotika (Bioquímica de los antibióticos), páginas 15-39, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, New York). La mayor cantidad de las clases conocidas de antibióticos inhibe o desregula la biosíntesis de macromoléculas bacteriales, por ejemplo, ADN (ejemplos: quinolonas, novobiocina), ARN (ejemplos: rifampicina, estreptolidigina, lipiarmicina, holomicina), proteínas (ejemplos: macrólidos/quetólidos, aminoglucosidos, tetraciclinas, oxazolidinonas) o peptidoglicano (ejemplos:  $\beta$ -lactamas, fosfomicina, vancomicina, moenomicina). Otros antibióticos actúan sobre la inhibición de rutas metabólicas del metabolismo intermedio (por ejemplo, sulfonamidas y trimetoprima como inhibidores del metabolismo de C<sub>1</sub>; cerulenina como inhibidor de la biosíntesis de ácidos grasos).

Frecuentemente, el efecto antibiótico puede ser atribuido directamente a la inhibición de una enzima definida o una familia de enzimas; por ejemplo, las  $\beta$ -lactamas inhiben de manera irreversible la familia de enzimas de las proteínas de enlace de la penicilina indispensables para la síntesis de las paredes celulares y finalmente, inician con ello la autólisis de la célula bacteriana. En otros casos, las estructuras macromoleculares mayores, como los ribosomas-complejos de ribonucleoproteína que catalizan la traslación de ARNm en una secuencia de proteína- sirven como puntos de ataque de antibióticos (por ejemplo, macrólidos) (Graefe U. (1992) Biochemie der Antibiotika (Bioquímica de los antibióticos), páginas 15-39, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, New York, Russell A.D., Chopra I. (1996) Understanding Antimicrobial Action and Resistance (Comprender el efecto y la resistencia antimicrobianos), segunda edición, páginas 28-83, Ellis Horwood, London).

Según el estado actual de la técnica, para aclarar el mecanismo activo de sustancias de acción antimicrobiana se utilizan, especialmente, los siguientes métodos, individualmente o combinados:

- 1) En el experimento de extinción (Rybak M.J. *et al.* (2000) *In vitro* activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against Staphylococci and Enterococci, including vancomycin-intermediate and -resistant strains. (Acciones *in vitro* de daptomicina, vancomicina, linezolid y quinupristina-dalfopristina contra estafilococos y enterococos, incluyendo cepas intermedias y resistentes a vancomicina) Antimicrob. Agents Chemother (Quimioterapia con agentes antimicrobianos) 44(4):1062-1066) la cantidad de bacterias sobrevivientes se determina dependiendo del tiempo de acción de la sustancia por evaluar en comparación con el cultivo de control, no tratado, por lo demás, en las mismas condiciones de crecimiento. Sin embargo, esto sólo permite una diferenciación gruesa entre sustancias bacteriostáticas (que inhiben el crecimiento) y bactericidas (que destruyen las bacterias).
- 2) En la prueba de incorporación de metabolitos (Oliva B. *et al.* (2001) Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin (Propiedades antimicrobianas y modo de acción de pirrotina holomicina). Antimicrob. Agents Chemother. (Quimioterapia con agentes antimicrobianos) 45, páginas 532-539) las células bacteriales son incubadas en condiciones adecuadas de cultivo, en presencia del compuesto cabeza de serie a evaluar con precursores marcados radiactivamente para rutas importantes metabólicas (por ejemplo, [14C]-timidina, [14C]-uridina, [14C]-leucina, [14C]-N-acetilglucosamina), se incorporan de ma-

nera selectiva con material de alto peso molecular, precipitable con ácidos o solventes orgánicos (ADN, ARN, proteína, peptidoglicano). Tras la separación de la sustancia con marcador radioactivo de alto peso molecular de la de bajo peso molecular a través de filtración o centrifugación, la radioactividad en la fracción de alto peso molecular representa una medida para la potencia de síntesis de la célula en la ruta respectiva del metabolismo. Esta prueba se puede automatizar (Renick P. J. y Morris, T. W. (2000) Simultaneous parallel assays for inhibition of major metabolic pathways in intact cells of *Staphylococcus aureus* (Análisis simultáneos paralelos para la inhibición de rutas mayores de metabolismo en células intactas de *staphylococcus aureus*). Poster F-2023 Sesión 211, 40th Interscience Conference on Antibacterial Agents and Chemotherapy, (40ª Conferencia interciencia sobre agentes antibacteriales y quimioterapia) Toronto) pero detecta exclusivamente dianas en el área de la biosíntesis macromolecular. Las dianas en el área de las rutas metabólicas intermedias en general no son registradas. Otra restricción del procedimiento es la dependencia de la disponibilidad de etapas previas selectivas marcadas radioactivamente.

- 3) en el caso de los métodos genéticos (Zhang L. *et al.* (2000) Regulated gene expression in *Staphylococcus aureus* for identifying conditional lethal phenotypes and antibiotic mode of action. (Expresiones reguladas de genes en *staphylococcus aureus* para la identificación de fenotipos condicionales letales y modos de acción antibióticos). *Gene (Genes)* 255(2):297-305) se utiliza, sobre todo, en la construcción de mutantes de sobreexpresión o infraexpresión (cepas de cultivo o bibliotecas de mutantes individuales) que frecuentemente producen una modificación de la sensibilidad respecto del compuesto cabeza de serie a evaluar, en tanto la mutación afecta a un gen de la ruta metabólica. Otro modo de proceder consiste en la selección de mutantes resistentes a la sustancia de prueba. A partir del ADN genómico de estos mutantes se puede obtener una biblioteca de vectores en base a, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, bacteriófagos, entre otros. Mediante técnicas usuales de genética molecular y microbiología es posible identificar la mutación y limitar, con ello, la diana o identificar un gen relacionado con la diana. Estos métodos significan un trabajo muy intenso, no pueden ser automatizados y por ello cuestan mucho tiempo y muchos recursos.
- 4) Los experimentos de enlace, para comprobar directamente el enlace del compuesto cabeza de serie a evaluar a su diana, frecuentemente son indicaciones muy directas del mecanismo activo (Spratt B.G. (1977) Properties of penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12 (Propiedades de proteínas de enlace de penicilina de *escherichia coli* K12). *Eur. J. Biochem.* 72:341-352). A su vez, se aprovecha el hecho de que la interacción entre sustancias de acción antimicrobiana y sus puntos de acción en general son muy fuertes (por ejemplo, enlace covalente en el caso de beta-lactamas) y, con ello, frecuentemente superan las manipulaciones analíticas para el aislamiento y la detección del complejo inhibidor de la diana. Sin embargo, es desventajoso que, en general, deban estar a disposición inhibidores marcados adecuados (por ejemplo, radioactivamente) que frecuentemente no se pueden conseguir o se consiguen con un costo elevado y, especialmente en el caso de interacciones más débiles, no covalentes, el complejo deseado no puede ser aislado. A ello se añade que, para cada caso individual se establece un procedimiento nuevamente adaptado (por ejemplo, dependiendo de la localización subcelular de la diana, de la naturaleza del enlace entre la diana y el inhibidor).

El método descrito para la caracterización de la diana presenta la desventaja de que, como en el caso del experimento de extinción, sólo brindan una cantidad reducida de información, o no pueden ser aplicados en general y de manera uniforme en los diferentes dominios de la diana y, además, requieren de mucho tiempo. En ciertos casos particulares, la aclaración del mecanismo activo puede extenderse durante varios años. Es así que incluso 14 años tras la primera descripción de la daptomicina (Allen N. E. *et al.* (1987) Inhibition of peptidoglycan biosynthesis in gram-positive bacteria by LY146032 (Inhibición de biosíntesis de peptidoglicano en bacterias grampositivas por LY146032). *Antimicrob. Agents Chemother.* (Quimioterapia con agentes antimicrobianos) 31, 1093-1099) aún no se ha esclarecido completamente el mecanismo activo molecular.

La memoria WO 91/05238 comprende un procedimiento para la caracterización de microorganismos. Como punto de partida de la categorización, se utilizan características espectrales del microorganismo. Como otros parámetros que sirven para la clasificación del microorganismo, se utiliza la sensibilidad a los antibióticos. El antibiótico se utiliza como agente para provocar una reacción del microorganismos, a partir de la cual se analizan las características espectrales del microorganismo y de ese modo, de clasifica el microorganismo.

D. NAUMANN: "Infrared and NIR Raman Spectroscopy in Medical Microbiology" (Espectroscopia infrarroja y NIR Raman en microbiología médica), *PROCEEDINGS OF SPIE* (Actas de SPIE), H.H. MANTSCH Y M., JACKSON (EDS.), vol. 3257, - 1998 páginas 245-257, comprende la investigación de células intactas mediante análisis FT-IR y FT-Raman. La huella espectral se utiliza para hallar información acerca del microorganismo analizado. Para diferenciar los espectros de los microorganismos se utiliza un análisis estadístico multivariado o una red neuronal.

N. A. NGO THI *et al.* "FT-IR microspectrometry: a new tool for characterizing microorganisms" (Microespectroscopía FT-IR: una nueva herramienta para caracterizar microorganismos), *BIOMEDICAL SPECTROSCOPY: VIBRATIONAL SPECTROSCOPY AND OTHER NOVEL TECHNIQUES* (Espectroscopia médica: espectroscopia vibracional y otras técnicas novedosas), SAN JOSE, CA, USA, 26-27 JAN. 2000, vol. 3918, páginas 36-44, 2000, SPIE-Int. Soc. Opt. Eng, USA, también describe el análisis espectral de microorganismos. Cultivos tratados con oxacilina son comparados con cultivos no tratados, para analizar más de cerca los cultivos.

ZEROUAL WIDAD *ET AL.*: “FT-IR spectroscopy study of perturbations induced by antibiotic on bacteria (*Escherichia coli*)” (Espectroscopia FT-IR Estudio de perturbaciones inducidas por antibióticos en bacterias (*escherichia coli*). *PATHOLOGIE BIOLOGIE* (Biología patológica, vol. 43 N° 4, 1995, páginas 300-305, describe la espectroscopia FT-IR para el análisis de los efectos de los antibióticos sobre una bacteria expuesta a diferentes antibióticos. Las modificaciones espectrales del cultivo se utilizan para analizar más de cerca los mecanismos de reacción de la bacteria. El objeto del estudio es analizar la capacidad de la espectroscopia FT-IR, detectar las modificaciones espectrales a través de los antibióticos y esclarecer estas modificaciones. Finalmente se menciona que se puede estudiar la respuesta fisiológica de microorganismos a los antibióticos.

En C. KIRSCHNER *ET AL.*: “FT-IR Spectroscopic Investigations of Antibiotic Sensitive and Resistant Microorganisms”, (Investigaciones espectroscópicas de FT-IR acerca de microorganismos sensibles y resistentes a antibióticos) POSTER: 8TH EUROPEAN CONFERENCE ON THE SPECTROSCOPY OF BIOLOGICAL MOLECULES, (Sesión de Poster: 8a Conferencia europea de espectroscopia de moléculas biológicas) ENSCHEDE, Países Bajos, se describe el uso de investigaciones FT-IR y NIR Raman, para detectar espectros de microorganismos. FT-IR se utiliza para analizar la sensibilidad de los microorganismos ante los antibióticos, para clasificar el microorganismo. Se utiliza un solo antibiótico conocido para distinguir organismos resistentes a antibióticos de los organismos no resistentes a antibióticos.

En D. NAUMANN: “Biophysikalische Strukturanalysen” (Análisis estructurales biofísicos), ROBERT KOCH INSTITUT FORSCHUNGSPROJEKTE (Proyectos de investigación del Instituto Robert Koch), PROF. DR. D. NAUMANN, 2000, páginas 1-4 se describen investigaciones FT-IR para microorganismos, para analizar los microorganismos en lo que respecta a su resistencia a los antibióticos. Las investigaciones se utilizan para analizar los mecanismos activos dentro de los microorganismos. Los mecanismos activos dentro de los microorganismos deben ser útiles a la optimización de antibióticos; el objeto de las observaciones son los mecanismos activos.

La memoria WO 94 11526 A describe la identificación de microorganismos mediante espectroscopia UV. Para analizar la resistencia ante antibióticos de los microorganismos se registra la tasa de crecimiento a partir de ribosomas bajo la influencia de antibióticos. Como antibiótico se utiliza solamente una única sustancia activa (rifampina) cuyo efecto ya es conocido.

En MASON DAVID J *ET AL.*: “An inexpensive infrared growth sensor array for detection of bacterial antibiotic susceptibility”, (Un conjunto económico de sensores infrarrojos de crecimiento para la detección de la sensibilidad de las bacterias ante antibióticos) FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGICAL SOCIETIES (Federación europea de sociedades de microbiología), MICROBIOLOGY (Microbiología) vol. III, n° 2-3, 1993, páginas 251-254, se describe la investigación de un cultivo bajo influencia de antibióticos conocidos. La resistencia del cultivo a los antibióticos se determina a partir de las cepas de cultivo de control, con las cuales se compara el cultivo, a partir de la permeabilidad de la luz IR de una longitud de onda individual determinada.

Estos documentos del estado actual de la técnica muestran, con ello, que los cultivos se pueden diferenciar a partir del criterio de la resistencia a antibióticos, asimismo, en principio se utilizan los mismos antibióticos ya conocidos. Además, se describe cómo se deben ilustrar mejor el efecto sobre los cultivos mediante tratamiento con antibióticos, también en este caso se utiliza, en principio, un sólo antibiótico conocido, para fundar los estudios en la misma base y hacer posible la comparación. Todos los documentos citados están orientados a la clasificación/observación de cultivos no analizados completamente, un antibiótico se utiliza, en este caso, como medio para iniciar una reacción y para poder deducir características de los cultivos analizados, a partir de dicha reacción.

Además de los métodos mencionados de identificación de diana, también se describieron los principios de la utilización de técnicas físicas de medición, por ejemplo, la espectroscopia FT-IR para la caracterización del mecanismo activo de sustancias de acción antibacterial (Naumann D. *et al.* (1991) The characterization of microorganisms by Fouriertransform infrared spectroscopy (FT-IR) (La caracterización de microorganismos mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR)). En: Modern techniques for rapid microbiological analysis (Técnicas modernas para el análisis microbiológico rápido), Nelson W. H., VCH, páginas 43-96, Weinheim; EP 0 457 789 B1). El principio de este procedimiento consiste en una comprobación espectroscópica de la modificación de la composición molecular, inducida por la incubación de la célula bacteriana con las sustancias de prueba, en comparación con un cultivo de control no tratado. Este procedimiento se basa en una evaluación de cintas en forma de integrales de superficie comparadas entre sí. Sirve para la interpretación del lugar en que se produjo una modificación molecular en la célula sin poder derivar a partir de ello un típico modelo de acción. El procedimiento puede ser reproducido, pero en la forma descrita no puede ser utilizado de manera general y uniforme, ni puede ser automatizado. Sobre todo, no se pueden analizar, por ejemplo, nuevos mecanismos activos para los cuales no se cuenta, aún, con inhibidores como enlaces de referencia. Además, el procedimiento requiere de diferentes análisis, según el tipo de mecanismo activo.

La presente invención tiene como objeto desarrollar un procedimiento para la caracterización y/o identificación de mecanismos activos de sustancias de prueba antimicrobicas. El procedimiento acorde a la invención debe ser más rápido y permitir una caracterización y/o identificación uniforme de diferentes mecanismos activos y también ser aplicable de manera efectiva, a través de posibilidades de automatización, en la investigación y el desarrollo industriales, así como en laboratorios rutinarios.

## ES 2 331 694 T3

Este objeto se alcanza a través del procedimiento acorde a la invención para la caracterización de una sustancia antimicrobica que contiene los siguientes pasos:

- a) tratamiento de un cultivo microbiano con la sustancia por evaluar;
- b) registro de, al menos, un espectro (espectro de prueba) del grupo de espectros IR, FT-IR, Raman y FT-Raman;
- c) comparación del o de los espectros de prueba de b) con uno o múltiples espectros, clasificados en una, dos o más clases (espectros de referencia) de cultivos microbianos tratados con sustancias de referencia,
- d) asignación de los espectros de prueba a una, dos o múltiples clases de espectros de referencia en el banco de datos de referencia.

En un modo de ejecución preferido de la presente invención, la comparación se realiza con procedimientos matemáticos de reconocimiento de patrones.

En otro modo de ejecución preferido de la presente invención, los espectros de referencia y/o espectros de prueba son procesados de manera tal que se permite un reconocimiento automático de las modificaciones y patrones característicos espectrales.

En otro modo de ejecución preferido de la presente invención, la clasificación se realiza a través de un reconocimiento de patrones, que puede clasificar simultáneamente dos o más clases.

En otro modo de ejecución preferido de la presente invención, la información característica de una muestra espectral para una de las clases es almacenada en un modelo de clasificación o en forma de los pesos en redes neuronales artificiales.

En un modo de ejecución preferido de la presente invención, la comparación de los espectros de prueba se realiza con los espectros de referencia, a través del modelo de clasificación.

Los grupos funcionales de todos los componentes bioquímicos de un cultivo microbiano, como péptidos, proteínas, polisacáridos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y metabolitos intermedios contribuyen a un espectro de este cultivo y arrojan como resultado una huella específica, bioquímica. Los espectros presentan una composición muy compleja debido a la gran cantidad de componentes y reflejan muchos modos diferentes de vibración de la biomolécula de la pared celular, de la membrana citoplasmática, del citoplasma así como de las sustancias polímeras extracelulares (por ejemplo, peptidoglicano, lipopolisacáridos, ácido (lipo) teiconico). Los espectros son muy específicos, a pesar de su complejidad, para una composición, característica o un estado de un cultivo microbiano, que, preferentemente, es un cultivo microbiano puro. Dado que la composición, el estado y las características de cultivos microbianos cambian bajo la influencia de un tratamiento con sustancias antimicrobicas de manera específica, dependiente de la sustancia, la detección espectroscópica de estas modificaciones puede ser utilizada para la identificación y/o caracterización del mecanismo activo. En el caso del mecanismo activo se puede tratar, por ejemplo, de inhibidores de la biosíntesis de proteínas, del metabolismo del ARN o del ADN, del metabolismo de la pared celular o de lípidos, de sustancias membranotropas o intercaladores de ADN. Los mecanismos activos mencionados deben entenderse como ejemplos, y de ninguna manera como exhaustivos, y pueden ser completados fácilmente por cualquier especialista del área.

Gracias al procedimiento acorde a la invención se relacionan las ventajas de una técnica de medición espectroscópica con una evaluación matemática decidida del contenido de información de los espectros.

El banco de datos de referencia es conformado tratando determinados cultivos microbianos con sustancias de prueba cuyo mecanismo activo es conocido, con ajustes exactamente análogos de todas las condiciones de cultivo, como temperatura, valor de pH, medio de cultivo y duración temporal. De los cultivos microbianos así tratados se toman espectros de referencia y estos se asignan en el banco de datos de referencia a la clase a la cual pertenece el correspondiente mecanismo activo.

Los espectros de referencia asignados a una clase presentan una estructura igual o similar en uno o múltiples rangos de longitud de onda seleccionados, que se diferencia de manera significativa de la estructura de los espectros de referencia de otras clases en los rangos de longitud de onda seleccionados.

La selección de rango de longitud de onda para la diferenciación de las clases ("feature selection") se puede llevar a cabo a través de diferentes procedimientos, por ejemplo, por el análisis de variancias, análisis de covariancias, análisis factorial, medición de distancia estadística, como la distancia euclidiana o la distancia de Mahalanobis o una combinación de estos métodos con un procedimiento de optimización, como los algoritmos genéticos. Utilizando o combinando los algoritmos genéticos se puede llevar a cabo una búsqueda automatizada y optimizada de la longitud de onda. Asimismo, las longitudes de onda se componen de manera más rápida y eficiente y óptimas para la clasificación en una clasificación jerárquica (ranking). Lo fundamental es, en este caso, que se lleva a cabo una identificación

## ES 2 331 694 T3

automatizada de los rangos espectrales, que significa una contribución a la modificación espectral. Con estos rangos identificados puede conformarse un sistema de clasificación automatizado. El modo preferido de evaluación es a través de una combinación de algoritmos genéticos y el análisis de covariancias.

5 Antes de la selección de longitud de ondas se puede llevar a cabo un procesamiento previo de los espectros de referencia para incrementar el contraste espectral o a través de la formación de derivaciones, deconvolución, filtrado, supresión de ruidos o reducción de datos a través de la transformación wavelet o descomposición factorial.

10 La división (clasificación) en los espectros de referencia en las clases en el banco de datos de referencia se lleva a cabo a través de métodos matemáticos de clasificación del reconocimiento de patrones, como procedimientos estadísticos multivariados del reconocimiento de patrones, redes neuronales, métodos de la clasificación basada en casos, o del aprendizaje artificial, de algoritmos genéticos o de métodos de la programación evolucionaria. Se utilizan múltiples redes neuronales artificiales como red feed-forward con tres capas y un método de descenso de gradiente como algoritmo de aprendizaje. El sistema de clasificación puede presentar una estructura tipo árbol, asimismo, las tareas de clasificación se descomponen en tareas parciales y los sistemas de clasificación individuales se combinan en una  
15 unidad formando un sistema de clasificación jerárquico y, a su vez, durante la evaluación se recorren automáticamente todas las etapas jerárquicas. En este caso, en las etapas individuales en el sistema de clasificación se puede tratar de redes neuronales optimizadas para tareas especiales.

20 También es posible una combinación de redes neuronales y un algoritmo genético, para llevar a cabo la optimización de la clasificación a través de redes neuronales. La optimización puede, por ejemplo, llevarse a cabo a través de la mejora de la arquitectura de red o el algoritmo de aprendizaje.

25 El banco de datos de referencia también puede presentar la forma de una red neuronal artificial, en la cual están almacenadas las informaciones espectrales en forma de pesos neuronales y pueden ser utilizadas para la evaluación.

30 En principio, sólo se requiere una única vez la conformación del banco de datos de referencia para la caracterización y/o identificación de los mecanismos activos en un cultivo microbiano. Por otro lado, en todo momento es posible ampliar la base de datos de referencia. Esto puede ocurrir, por ejemplo, incluyendo otras sustancias en las clases de mecanismos activos que ya están contenidas en el banco de datos de referencia. Independientemente de ello, el banco de datos de referencia también puede ser ampliado con clases de mecanismos activos que hasta ahora no estaban incluidas en él. En estos casos, es necesaria una nueva configuración o añadidura del banco de datos como ya se ha descrito, asimismo, aquellos juegos de datos espectrales que ya han sido utilizados para la conformación del banco de datos anterior, no deben ser elevados nuevamente mientras el microorganismo utilizado, sus condiciones de cultivo y  
35 los parámetros de medición espectral no se hayan modificado.

40 La asignación de un espectro de prueba a una, dos o múltiples clases de los espectros de referencia puede efectuarse a través de los métodos de clasificación matemáticos, basados en el reconocimiento de patrones. Sobre todo los métodos que permiten una clasificación simultánea en múltiples clases, por ejemplo, en el caso de una clasificación a través de redes neuronales artificiales, son adecuados para la clasificación automatizada y eficaz de múltiples clases. También son adecuados, en principio, el procedimiento basado en la función de densidad de probabilidad, de la matriz de correlación, métodos de la clasificación basada en casos o de aprendizaje artificial, algoritmos genéticos o métodos de programación evolucionaria. El sistema de clasificación puede estar conformado por múltiples subunidades, que presentan una estructura tipo árbol, asimismo, las tareas de clasificación se descomponen en tareas parciales y los  
45 sistemas de clasificación individuales se combinan en una unidad, formando un sistema de clasificación jerárquico y, a su vez, durante la evaluación se recorren automáticamente todas las etapas jerárquicas.

50 El espectro de prueba de una sustancia con un mecanismo activo desconocido es realizado con el o los cultivos de exactamente el mismo tipo (cepa idéntica de microorganismos), que también se utilizan en el registro de los datos de referencia. Además, todas las condiciones de cultivo (por ejemplo, temperatura, valor de pH, medio de cultivo y periodo de tiempo) deben coincidir exactamente con aquellos utilizados en la confección del banco de datos de referencia.

55 La asignación de un espectro de prueba a una, dos o múltiples clases de espectros de referencia se lleva a cabo a través de métodos matemáticos de clasificación del reconocimiento de patrones, como procedimientos estadísticos multivariados del reconocimiento de patrones, redes neuronales, métodos de la clasificación basada en casos, o del aprendizaje artificial, de algoritmos genéticos o de métodos de la programación evolucionaria.

60 El tratamiento del cultivo microbiano antes del registro de los espectros puede llevarse a cabo de la siguiente manera: Los microorganismos (gérmenes de prueba) son cultivados en un medio nutritivo adecuado microbiológico, que puede ser líquido o sólido. Luego, la sustancia de prueba o la sustancia de referencia es puesta en contacto con las bacterias. Tras concluir el tiempo de acción adecuado que es, preferentemente, de entre cinco y 500 minutos, las bacterias tratadas son separadas de la sustancia de prueba o la sustancia de referencia, por ejemplo, por centrifugación o filtración en el caso de que se realice el procedimiento en un cultivo líquido, o mediante toma de células de un medio nutritivo sólido mediante un asa de siembra. Para retirar los restos del aparato de verificación, las células son lavadas  
65 una vez en un volumen adecuado, pero mejor aún, reiteradas veces.

## ES 2 331 694 T3

Luego pueden ser registrados los espectros. Los pasos de trabajo de la filtración o centrifugación también pueden ser evitados, llevando a cabo la medición de gérmenes de prueba con sustancia de prueba en comparación con un control no tratado de los gérmenes de prueba. Luego, se lleva a cabo una sustracción automatizada de los espectros. El espectro obtenido de este modo sólo está basado en las modificaciones provocadas por la sustancia activa.

5

El procedimiento acorde a la invención también puede ser realizado con espectros IR, FT-IR, Raman y FT-Raman.

El registro de espectros IR se lleva a cabo, habitualmente, en el rango espectral del denominado infrarrojo medio, entre 500 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ , pero también puede ser medido en un rango infrarrojo cercano, entre 4000 y 10.000  $\text{cm}^{-1}$  o completado en este rango.

10

Para el registro de espectros IR o Raman puede utilizarse cualquier disposición de medición espectroscópica conocida, como transmisión/absorción, reflexión total debilitada, reflexión directa o difusa o técnica de conducción de luz IR. Es especialmente ventajosa la medición en transmisión/absorción.

15

Las muestras del cultivo microbiológico son, preferentemente, sólidas o líquidas. En la medición es ventajosa la implementación de multicubetas para múltiples muestras o la implementación de técnicas microespectrométricas. Entre ellas se cuentan la microscopia FT-IR y Raman, FT-Raman u otros procedimientos de focalización de haz. De este modo, se puede alcanzar una minimización de la cantidad de muestras y llevarse a cabo la implementación de un procesamiento automatizado de muestras, para incrementar el rendimiento de las muestras y posibilitar un establecimiento del high-throughput-screening, o cribado ultrarrápido. También pueden utilizarse soportes de muestras como los utilizados para placas microtiter, o cubetas de flujo. También la implementación de cubetas de flujo, acoplada a un sistema de tarea de prueba HPLC, posibilitaría un incremento del rendimiento de las muestras. También es posible la implementación de conductores de luz infrarroja para una automatización de la medición más independiente de la posición.

25

Como material para las cubetas y soportes de muestras de las variantes de preparación descritas pueden utilizarse todos los materiales ópticos insolubles en agua utilizados usualmente en la espectroscopia IR, por ejemplo, Ge, ZnSe,  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{BaF}_2$ , asimismo, para un elemento multimuestras demostró ser adecuado el ZnSe. Pero también las placas de metal o las rejillas de micrometal son adecuadas como soportes de muestras, especialmente si están concebidas a escala de las placas de microtiter, para una gran cantidad de muestras y como material descartable.

30

Las cantidades de muestra para los registros de espectros IR pueden mantenerse muy reducidas y ser de unos pocos  $\mu\text{l}$  (2-5  $\mu\text{l}$ ). Según las condiciones predeterminadas con o sin focalización de haz, pueden implementarse cantidades de sustancia de  $\mu\text{g}$  a ng. Los diámetros del área de muestra atravesada por el haz varían de entre 1 a 6 mm, en el caso de una microfocalización, entre 5 y 50  $\mu\text{m}$ .

35

En el caso de mediciones Raman, también es adecuada una medición en un cultivo líquido, que se puede efectuar directamente en los recipientes del preparado de la muestra, por ejemplo, en placas de microtiter. De ese modo puede alcanzarse una notable ventaja temporal y un mayor grado de automatización, dado que, de ese modo, se acortan los tiempos de desarrollo y se suprimen pasos de preparación de las muestras. Gracias a la utilización de una conducción confocal de haz puede llevarse a cabo un posicionamiento optimizado de la señal de Raman, para eliminar señales parásitas y mejorar la relación señal/ruido. Una disposición de fuentes de luz utilizadas simultáneamente o una correspondiente multiplicación de la luz de accionamiento y conducción hacia la muestra para la medición Raman, así como la utilización de detectores implementados en paralelo (por ejemplo, CCDs) puede incrementar adicionalmente el rendimiento de las muestras y la automatización.

45

La sustancia de prueba puede ser una sustancia inhibidora. La concentración de la sustancia inhibidora con la cual es tratado el cultivo bacteriano, se encuentra, preferentemente, en el rango de 0,1 a 20 veces la concentración mínima para la sustancia inhibidora (MHK) para la sustancia de prueba. La concentración mínima de la sustancia inhibidora (MHK) es una concentración mínima de un antibiótico, con el cual es inhibido el crecimiento de un germen de prueba durante 18-24 h. La concentración de la sustancia inhibidora puede ser determinada, a su vez, acorde a determinados procedimientos microbiológicos estándar (véase, por ejemplo, The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard fifth edition (Comité nacional de estándares de laboratorio clínico. Métodos para pruebas de susceptibilidad de la dilución del antimicrobiano para bacterias de crecimiento aeróbico, quinta edición estándar aprobada). NCCLS, documento M7-A5 [ISBN 1-56238-394-9]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 EE.UU., 2000.). Los espectros de prueba son tomados por un cultivo microbiano que había sido tratado respectivamente con la sustancia inhibidora, o bien en una concentración, pero, preferentemente, en múltiples concentraciones diferentes.

60

El procedimiento acorde a la invención es adecuado para el análisis de diferentes cultivos celulares. Un grupo preferido de cultivos son los cultivos microbianos celulares como bacterias, hongos, levaduras, arqueobacterias y similares. Pero la invención también comprende el análisis de cultivos celulares de origen no microbiano, por ejemplo, células cancerígenas, células con función inmunológica, células epiteliales, células vegetales y similares. Con ello, acorde a la invención están cubiertas tanto las utilizaciones en el área de la caracterización celular funcional como así también el área de investigaciones toxicológicas.

65

El procedimiento acorde a la invención se caracteriza porque es sensible y puede ser estandarizado y reproducido. Puede ser aplicado en forma general y uniforme en diferentes mecanismos activos. Es económico y arroja resultados rápidos.

5 Otra ventaja del procedimiento acorde a la invención consiste en la posibilidad de incorporar mutantes del germen de prueba utilizado, asimismo, la mutación produce la subexpresión de determinada diana y, de este modo, ajusta la inhibición de esta diana a través de un inhibidor potencial. Acorde al estado actual de la técnica, hoy en día tales mutantes pueden ser obtenidos fácilmente para cualquier diana (Guzman L.M. *et al.* (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose (Regulación estrecha, modulación y expresión de alto nivel por vectores que contienen la arabinosa) (PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177 (14):4121-30). De esta manera también se puede determinar el mecanismo de las sustancias inhibitoras sin tales dianas, para los cuales aún se desconocen inhibidores de referencia.

## 15 Figuras y ejemplos

Ejemplo

### 20 *Determinación de la concentración mínima de sustancia inhibidora (MHK)*

Para la obtención de un cultivo de una noche se inyectan 22 ml de medio mínimo Belitsky (Stuhlke *et al.* (1993) Temporal activation of beta-glucanase synthesis in *Bacillus subtilis* is mediated by the GTP pool (La activación temporal de la síntesis de beta-glucanasa en el *bacillus subtilis* es mediada por el pool de GTP). *J. Gen. Microbiol.* Septiembre de 1993; 139 (Pt 9):2041-5) con una alícuota del germen de prueba *bacillus subtilis* 168, de un cultivo permanente almacenado a -80°C, y se incuban a 37°C, 200 rpm. El cultivo, que tras 16-18 h presentaba un OD<sub>500</sub> de 1,0-1,6, se diluyó con medio mínimo Belitsky a un OD<sub>500</sub> de 0,01 (corresponde a una cantidad de gérmenes de, aproximadamente, 0,8-2x10<sup>5</sup> gérmenes por ml) y se incubó con los preparados por evaluar, presentados en el mismo medio, a una escala de 1:1 de una placa de microtiter de 96 y una dilución serial de 1:2. Como MHK se indicó la concentración más baja de un inhibidor, en la cual tras 18-24 de incubación a 37°C y no se observó crecimiento bacterial. En la tabla 1 se indican los valores de MHK de las sustancias de referencia utilizadas para confeccionar el banco de datos de referencia.

TABLA 1

35 *Sustancias de referencia, valores MHK contra B. subtilis 168 y las concentraciones utilizadas*

Sustancias de referencia	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Concentración utilizada [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
<b>Tetraciclina</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	<b>64</b>	
<b>Cloroanfenicol</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	
<b>Meticilina</b>	<b>0,125</b>	<b>0,03</b>	<b>0,06</b>	<b>0,125</b>	
<b>Rifampicina</b>	<b>0,25 0,</b>	<b>06 0,</b>	<b>125 0,</b>	<b>25</b>	<b>1</b>
<b>Ciprofloxacina</b>	<b>0,25</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	
<b>Moxifloxacina</b>	<b>0,125</b>	<b>0,03</b>	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>	
<b>Canamicina</b>	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	
<b>Oxacilina</b>	<b>0,5</b>	<b>0,06</b>	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>	
<b>Cefoxitina</b>	<b>2</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	

## ES 2 331 694 T3

	<b>Moxalactam</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	
5	<b>Eritromicina</b>	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>	
	<b>Ácido fusídico</b>	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>	
	<b>Ácido nalidixico</b>	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>32</b>	<b>128</b>	
10	<b>Novobiocina</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	
	<b>Trimetoprima</b>	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>	
15	<b>Vancomicina</b>	<b>0,25</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	
	<b>D-Cicloserina</b>	<b>64</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	
	<b>Clindamicina</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	
20	<b>Gentamicina</b>	<b>0,125</b>	<b>0,02</b>	<b>0,03</b>	<b>0,06</b>	
	<b>Penicilina G</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	
25	<b>Neomicina</b>	<b>0,125</b>	<b>0,03</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	
	<b>Tobramicina</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,02</b>	<b>0,06</b>	<b>0,125</b>	
	<b>Mupirocina</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,02</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	
30	<b>Puromicina</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	
	<b>Ristocetina</b>	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	
35	<b>Teicoplanina</b>	<b>0,125</b>	<b>0,03</b>	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>	
	<b>Espectinomicina</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	<b>64</b>	
40	<b>Estreptomicina</b>	<b>128</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	
	<b>Claritromicina</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,02</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	
	<b>Azitromicina</b>	<b>1</b>	<b>0,25</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	
45	<b>Oxazolidinona BAY 11-5845</b>	<b>0,25</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>1</b>	
	<b>Mitomicina C</b>	<b>0,25</b>	<b>0,03</b>	<b>0,06</b>	<b>0,125</b>	
50	<b>Mersacidina</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	
	<b>Ramoplanina</b>	<b>1</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>	
55	<b>Actinomicina D</b>	<b>1</b>	<b>0,25</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	
	<b>Monesina</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	
	<b>Gramicidina S</b>	<b>1</b>	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	
60	<b>Gramicidina A</b>	<b>4</b>	<b>0,0313</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,125</b>	
	<b>Lasalocid</b>	<b>1</b>	<b>0,25</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	
65	<b>Nigericina</b>	<b>1</b>	<b>0,03</b>	<b>0,06</b>	<b>0,125</b>	

<b>Nitrofurantoina</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	
<b>Bromuro de etidio</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	
<b>Proflavina</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>32</b>	
<b>Cerulenina</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>64</b>
<b>Doxorubicina</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	
<b>Azaserina</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	
<b>Eniatina</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	
<b>5-Fluoruracilo</b>	<b>0,25</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,25</b>	<b>1</b>	
<b>5-Fluor-2-desoxiuridina</b>	<b>0,25</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,25</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>Polymixina B-sulfato</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>

#### 25 *Cultivo de células y tratamiento con las sustancias de referencia o de prueba*

Partiendo de un cultivo de una noche, cuya obtención se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente, se inocularon 50 ml calentados a 37°C de medio mínimo Belitsky con, respectivamente, 1 ml del cultivo de una noche y se incubaron a 37°C, con 200 revoluciones. En la fase exponencial de crecimiento a OD<sub>500</sub> 0,25 - 0,27 se agregaron las sustancias en las concentraciones de la tabla 1 y se incubaron las soluciones durante otros 150 minutos. Como control se llevó a cabo, conjuntamente con cada experimento, un cultivo no tratado para una determinación simple. Para determinar variancias internas, se evaluó cada preparado en cada concentración en cinco determinaciones o análisis. Las concentraciones utilizadas se seleccionaron en el campo previo a partir de un experimento de crecimiento de modo tal que, aunque tras 150 minutos de tiempo de acción se hizo visible un efecto sobre la velocidad de crecimiento, en comparación con un cultivo de control no tratado, no se habían iniciado aún ningún proceso lítico, ni en la curva de crecimiento ni tras el análisis microscópico.

#### 40 *Procesamiento de las muestras para el análisis espectroscópico FT-IR*

Tras el tratamiento de la célula bacterial con las sustancias de referencia o de prueba durante 150 minutos, se separaron por centrifugación, respectivamente, 20 ml de cultivos en una centrífuga Heraeus Sepatech Minifuge T, a 5500 x g (5650 rpm) durante 10 minutos, a 16°C. Los sedimentos celulares se lavaron dos veces con, respectivamente, 1 ml de agua, asimismo, las células se sedimentaron entre los pasos de lavado en una centrífuga Eppendorf a 13000 rpm, durante 10 minutos. Finalmente, las muestras se absorbieron en agua y se resuspendieron cuidadosamente, de modo que tras un secado posterior de 30 minutos de, respectivamente, 35  $\mu$ l de células a 40-50 mbar, a temperatura ambiente, con P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> formaron películas homogéneas de bacterias cuya absorción se hallaba en el rango de 0,345 a 1,245 unidades de absorción (AU). Los espectros FT-IR de los cultivos bacteriales tratados con las sustancias de prueba fueron registrados mediante un espectómetro IFS 28B FT-IR (Bruker, Ettlingen) en el modo de absorción, con un soporte de muestra de ZnSe para 15 posiciones de muestras. Los espectros se registraron con un detector DTGS y 64 escaneos en el rango de longitud de onda de 4000 - 500 cm<sup>-1</sup>. La transformada de Fourier se llevó a cabo en una función de apodización de Blackman-Harris de tres términos así como un factor de llenado de ceros (zero-filling) de 4 para alcanzar una resolución espectral de 6 cm<sup>-1</sup>. Para minimizar los artefactos por vapor de agua en el aire del entorno, al espectómetro se le suministró permanentemente 500-1000 l/h de aire seco, generado mediante un secador de aire Zander. La proporción de vapor de agua fue medida, durante el registro de los espectros, en el rango de 1837 a 1847 cm<sup>-1</sup> y no superó las 0,0003 AU. En estas condiciones, el ruido no fue mayor que 0,0003 AU en el área de 2000 a 2100 cm<sup>-1</sup>. Una prueba para el control de calidad de los espectros FT-IR medidos se aplicó a los espectros, con valores umbral para la absorción mínima (0,345 AU) y la absorción máxima (1,245 AU), lo cual se halla en el área de linealidad del detector. Antes de cada medición en una muestra se tomó un espectro de fondo para compensar de esta manera el fondo. Para cada muestra se realizaron 5 mediciones independientes, para registrar las variancias entre medición y medición para cada muestra. La reproductibilidad del registro de espectros a lo largo de un periodo de tiempo de seis meses está representado en la imagen 2. El control del espectrofotómetro se llevó a cabo mediante el Optics User Software OPUS 3.0 (versión 970717.0) de Bruker, Ettlingen, Alemania. El procedimiento matemático descrito a continuación, para la evaluación de datos, se aplicó para incrementar el contraste espectral en los espectros FT-IR, tras la conformación de la primera derivación, utilizando un algoritmo Savitzki-Golay (Savitzky A. and Golay M.J. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least square procedures (Suavizar y diferencias datos mediante procedimientos de mínimos cuadrados simplificados). Anal. Chem. 36: 1627-1638) teniendo en cuenta 9 puntos de alisado y la realización una normalización vectorial.

## ES 2 331 694 T3

### *Configuración del modelo matemático de clasificación*

Para la configuración del modelo matemático de clasificación se tomaron como base los espectros de referencia tras la formación de la primera derivación. Luego se llevó a cabo una normalización a los fines de obtener una comparabilidad espectral en lo que atañe a las intensidades, mediante una normalización vectorial (manual del software OPUS, página 126, Firma Bruker Ettlingen). Luego se llevó a cabo la clasificación de los datos de referencia en la cantidad deseada de diferentes mecanismos activos, en este ejemplo, una cantidad de 7 grupos principales (véase imagen 1). Los espectros de referencia se clasificaron según su correspondencia con estos 7 grupos principales. El objeto de esta clasificación es descubrir, mediante el procedimiento matemático, la longitud de onda adecuada para una clasificación del modelo espectral de cada grupo (feature selection). Un procedimiento utilizado para la selección de longitud de ondas calcula la distancia euclidiana de cada punto de dato espectral y el centroide (centro de la clase) para cada longitud de onda. Para la clasificación son especialmente adecuadas las longitudes de onda cuya distancia euclidiana respecto de las clases (respecto del centroide) es, en lo posible, reducida, per cuya distancia entre las diferentes clases es, en lo posible, la máxima. Una búsqueda automatizada y optimizada de las longitudes de onda, que presenta estos criterios, se llevó a cabo con un algoritmo genético. Asimismo, las longitudes de onda se componen de manera más rápida y eficiente y óptimas para la clasificación en un ranking. De esta lista con longitudes de onda, ordenadas según su potencial de clasificación, se seleccionaron posteriormente las longitudes de onda para el modelo de clasificación con redes neuronales. Un segundo principio se basa en el cálculo de las variancias (univariancia y covariancia) de cada punto de dato de los espectros de referencia dentro del grupo, que se comparan con la variancia entre los grupos. Posteriormente, se llevó a cabo una clasificación automática en un ranking de las longitudes de onda, en el cual la variancia dentro del grupo es lo más reducida posible y entre los diferentes grupos es lo más grande posible. Las mejores 97 longitudes de onda de este ranking se utilizaron como neuronas de entrada (input) para una red neuronal. La elección de la longitud de onda acorde a este procedimiento está representada en la figura 6. Como modelo de clasificación se utilizó una red feedforward de tres capas, con 97 neuronas de entrada, 22 neuronas ocultas y 7 neuronas de salida. Como algoritmo de aprendizaje se utilizó el algoritmo de backpropagation resiliente (RProp). La activación de emisión se fijó entre 0 y 1.

La figura 7 muestra una concepción del procesamiento de datos.

### *Clasificación de una sustancia X con un mecanismo activo desconocido*

Para la validación externa del procedimiento descrito, las células bacteriales fueron tratadas con la sustancia de acción antibacterial X (MHK 2  $\mu\text{g/ml}$ ) en cinco determinaciones, en las concentraciones de 1, 2 y 4  $\mu\text{g/ml}$ . En todos los casos, la realización del procedimiento de clasificación arrojó como resultado, con un tratamiento con 2 y 4  $\mu\text{g/ml}$ , una asignación inequívoca de los espectros en las clases de las muestras tratadas con cerulenina. En el caso de la cerulenina se trata de un inhibidor del metabolismo de la biosíntesis de ácidos grasos, lo cual hace suponer que la sustancia X presenta un mecanismo activo similar al de la cerulenina. De hecho, la figura 10 muestra que la sustancia X inhibe selectivamente el nuevo agregado de  $[^{14}\text{C}]$ -acetato en fosfolípidos extraíbles en  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ . La evaluación de los espectros de las bacterias tratadas con sólo 1  $\mu\text{g/ml}$  de la sustancia X, no arrojó como resultado ninguna asignación, lo que puede deberse a las modificaciones muy reducidas en la curva de crecimiento y en el espectro FT-IR, debido a la baja dosificación, en comparación con los cultivos de control no tratados.

Las figuras muestran:

Figura 1 La estructura del banco de datos de referencia en base a los mecanismos activos de antibióticos conocidos

Figura 2 La reproductibilidad de la medición de los espectros

Figura 3 La diferenciación de las clases de antibióticos

Figura 4 Los espectros de inhibidores de la biosíntesis de proteínas

Figura 5 El procedimiento para la selección de longitud de ondas

Figura 6 La asignación jerárquica del mecanismo activo

Figura 7 La concepción del procesamiento de datos

Figura 8 El ejemplo de mecanismos activos de la sustancia X

Figura 9 La evaluación del espectro de la sustancia X en un primer rango de longitud de onda

Figura 10 La evaluación del espectro de la sustancia X en un segundo rango de longitud de onda

Figura 11 El ejemplo de mecanismos activos de la sustancia Y

Figura 12 La evaluación del espectro de la sustancia Y

La figura 1 muestra la conformación del sistema de clasificación utilizado para el ejemplo, en forma de redes neuronales jerárquicas, junto con la asignación de los antibióticos de referencia. En un primer paso de clasificación se separan las 7 clases principales de inhibidores (inhibidores de biosíntesis de proteínas, inhibidores de biosíntesis de ARN, inhibidores de biosíntesis de ADN, inhibidores de la biosíntesis de pared celular, inhibidores de la biosíntesis de lípidos, inhibidores de sustancias membranotropas, intercaladores). En un segundo paso se distinguen los subgrupos (por ejemplo, inhibidores de la biosíntesis de ADN con los tres subgrupos 1. sustancias similares a la ciprofloxacina, 2. sustancias similares a la trimetoprima, 3. sustancias similares a la azaserina. Esta clasificación en subgrupos en principio puede continuarse y ampliarse. Las asignaciones establecidas pueden ser comprobadas inmediatamente por el especialista en el área y pueden ser establecidas a partir de obras de referencia pertinentes (por ejemplo, Graefe U. (1992) Biochemie der antibiotica (Bioquímica de los antibióticos), páginas 15-39, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, New York).

La figura 2 muestra la superposición de la primera derivación de 25 espectros seleccionados por azar del microorganismo *Bacillus subtilis*, cepa 168, sin adición de una sustancia inhibidora. Los espectros han sido registrados a lo largo de un periodo de tiempo de 6 meses. Los 25 espectros son prácticamente idénticos y sólo presentan una variación despreciable. Esto demuestra la buena reproducibilidad del registro de espectros de cultivos microbianos. La reproducibilidad es un requisito importante para que resulte el procedimiento acorde a la invención.

La figura 3 muestra la primera derivación de 25 espectros de control, obtenidos en experimentos independientes, de un cultivo bacteriano de *Bacillus subtilis*, cepa 168 sin tratamiento con una sustancia de prueba y superpuesta, respectivamente, 5 veces, la primera derivación de los espectros de cultivos bacteriales de la misma cepa, tratada con los diferentes antibióticos rifampicina, tetraciclina, ciprofloxacina y oxacilina. Los diferentes antibióticos están asignados, acorde a la figura 1, a diferentes mecanismos activos. Correspondientemente con ello, también se diferencian los espectros de los cultivos bacteriales tratados con los diferentes antibióticos. El tiempo de acción fue, respectivamente, de 150 minutos, la concentración fue de cuatro veces la concentración mínima de la sustancia inhibidora (MHK) y 0,25 veces MHK en el caso de tetraciclina. Los valores de MHK de los antibióticos son 0,25 µg/ml para la rifampicina, 16 µg/ml para la tetraciclina, 0,25 µg/ml para la ciprofloxacina y 0,5 µg/ml para la oxacilina.

La figura 4 muestra la primera derivación de 25 espectros de control, obtenidos en experimentos independientes, de un cultivo bacteriano sin tratamiento con una sustancia de prueba y superpuesta, respectivamente, 5 veces, la primera derivación de los espectros de cultivos bacteriales tratada con los diferentes antibióticos tetraciclina (4 µg/ml), cloroanfenicol (4 µg/ml) y canamicina (4 µg/ml). La duración del tratamiento de los cultivos bacteriales es de, respectivamente, 150 minutos. En el caso de los tres antibióticos se trata de inhibidores de la biosíntesis de proteínas. Las primeras derivaciones de los espectros tratados con estos diferentes inhibidores de la biosíntesis de proteínas presentan una buena coincidencia entre sí y diferencias significativas respecto de las primeras derivaciones de los espectros de control.

La figura 5 explica un ejemplo de un procedimiento para la selección de longitud de ondas. En este caso se lleva a cabo el cálculo de la distancia euclidiana de cada punto de dato espectral y se calcula el centroide (centro de la clase) para cada longitud de onda. Para la clasificación son especialmente adecuadas las longitudes de onda cuya distancia euclidiana respecto de las clases (respecto del centroide) es, en lo posible, reducida, por cuya distancia entre las diferentes clases es, en lo posible, la máxima. Una búsqueda automatizada y optimizada de las longitudes de onda, que presenta estos criterios, se lleva a cabo con un algoritmo genético. Asimismo, las longitudes de onda se componen de manera más rápida y eficiente y óptimas para la clasificación en un ranking. De esta lista con longitudes de onda, ordenadas según su potencial de clasificación, se seleccionan posteriormente las longitudes de onda para el modelo de clasificación (por ejemplo, redes neuronales).

La figura 6 muestra la asignación jerárquica del mecanismo activo. La barra negra representa aquellos rangos de longitud de onda que deben ser utilizados para la clasificación de los antibióticos según sus mecanismos activos. En la parte superior de la imagen están representadas las áreas espectrales que presentan una significación especialmente elevada para la separación de los 7 grupos principales (inhibidores de la síntesis de proteína, ARN, ADN, lípidos y pared celular, así como las sustancias membranotropas y los intercaladores).

La parte inferior de la imagen, por el contrario, representa las áreas espectrales utilizadas para la clasificación de los antibióticos en diferentes subgrupos dentro de un grupo principal, en el ejemplo, de la separación de β-lactamas y D-cicloserina dentro del grupo principal de inhibidores de la síntesis de la pared espectral.

La figura 7 muestra una concepción del procesamiento de datos.

La figura 8 muestra el mecanismo activo de una sustancia X. La sustancia X inhibe selectivamente el nuevo agregado de [14C]-acetato en fosfolípidos extraíbles en CHCl<sub>3</sub>/MeOH.

La figura 9 muestra la primera derivación de 25 espectros de control de un cultivo bacteriano sin tratamiento con una sustancia de prueba y superpuesta, respectivamente, 5 veces, la primera derivación de los espectros de cultivos bacteriales tratada con cerulenina (1 vez MHK, 16 µg/ml) y la sustancia X (2 veces MHK; 2 µg/ml). Como se desprende de la figura 1, en el caso de cerulenina se trata de un inhibidor de síntesis de lípidos. La similitud en el modelo FT-IR indica que en el caso de la sustancia de prueba X también se trata de una inhibición de la síntesis de lípidos. La figura 10 muestra los mismos espectros que la figura 9 en otro rango de longitud de onda. Esta área espectral

## ES 2 331 694 T3

es dominada por las transiciones de vibración de la molécula de ácido graso. En esta área espectral las diferencias entre los espectros de referencia y los espectros con las sustancias de prueba inhibitoras de síntesis de lípidos son especialmente significativas.

5 La figura 11 muestra el mecanismo activo de una sustancia Y. La sustancia Y inhibe selectivamente el nuevo agregado de [3H]-leucina en material precipitable en ácido perclórico.

10 La figura 12 muestra la primera derivación de un espectro de control de un cultivo bacterial sin tratamiento con una sustancia de prueba y superpuesta, la primera derivación de los espectros de cultivos bacteriales, tratada con un antibiótico dipéptido (0,5 veces MHK, 0,5  $\mu\text{g/L}$ ) una oxazolidinona (1 vez MHK; 2  $\mu\text{g/L}$ ) y la sustancia Y (16 veces MHK, 3 mg/L). Como se desprende de la figura 1, en el caso de la oxazolidinona se trata de un inhibidor de la síntesis de proteína, lo mismo vale para el antibiótico dipéptido. La similitud en el modelo IR indica que en el caso de la sustancia de prueba Y desconocida también se trata de una inhibición de la síntesis de proteína.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la identificación o caracterización del mecanismo activo de una sustancia antimicrobica, que comprende los siguientes pasos:
- 10 a) Establecer espectros de referencia a través del tratamiento de determinados cultivos microbianos con sustancias de prueba, cuyo mecanismo activo es conocido, y el registro de, al menos, un espectro de grupo de espectros IR, FTIR, Raman y FT-Raman.
  - 15 b) Selección respectiva de, al menos, un rango de longitud de onda de estructura igual o similar, para diferenciar las clases pertenecientes al mecanismo activo correspondiente, y clasificación de los espectros de referencia en las clases en el banco de datos de referencia, asimismo, los espectros de referencia asignados a una clase presentan una estructura igual o similar en el rango de longitud de onda seleccionado, que se diferencia de manera significativa de la estructura de los espectros de referencia de otras clases en el rango de longitud de onda seleccionado
  - 20 c) tratamiento de un cultivo microbiano con la sustancia por evaluar
  - d) registro de, al menos, un espectro (espectro de prueba) del grupo de espectros IR, FT-IR, Raman y FT-Raman;
  - e) comparación del o de los espectros de prueba de d) con uno o múltiples espectros de referencia en el banco de datos de referencia,
  - 25 f) Asignación de los espectros de prueba a una, dos o múltiples clases de espectros de referencia en el banco de datos de referencia e identificación o caracterización del mecanismo activo.
- 30 2. Procedimiento acorde a la reivindicación 1, **caracterizado** porque la comparación e) se realiza mediante un procedimiento matemático de reconocimientos de patrones.
- 35 3. Procedimiento acorde a la reivindicación 1 o 2, **caracterizado** porque los espectros obtenidos en el paso d) son procesados de un modo que permite el reconocimiento automático de las modificaciones y de los patrones espectrales característicos.
- 40 4. Procedimiento acorde a las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la clasificación se realiza a través de un reconocimiento de patrones, que puede clasificar simultáneamente dos o más clases.
- 45 5. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la información característica de un patrón espectral para una de las clases es almacenada en un modelo de clasificación o en forma de los pesos en redes neuronales artificiales.
- 50 6. Procedimiento acorde a las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la comparación de los espectros de prueba con los espectros de referencia se lleva a cabo a través del modelo de clasificación.
- 55 7. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el cultivo microbiano es un cultivo puro.
- 60 8. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque en el caso del mecanismo activo se trata de inhibidores de la biosíntesis de proteínas, del metabolismo del ARN o del ADN, del metabolismo de la pared celular o de lípidos, de sustancias membranotropas o intercaladores de ADN.
- 65 9. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque para la facilitación del banco de datos de referencia se utilizan mutantes del germen microbiano definidos adicionalmente, preferentemente, aquellos con una producción reducida o elevada de un gen diana o aquellos con actividad biológica limitada o incrementada a causa de mutaciones de producto y/o deleciones, asimismo, la mutación del gen diana correspondiente ajusta la interacción del producto de gen con una sustancia hipotética de referencia.
- 70 10. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque la selección de rango de longitud de onda para la diferenciación de las clases (selección de longitud de ondas) se lleva a cabo a través de procedimientos estadísticos multivariados, como el análisis de variancias, análisis de covariancias, análisis factorial, por medición de distancia estadística, como la distancia Euclidiana o la distancia de Mahalanobis, o por una combinación de estos métodos con un procedimiento de optimización, como los algoritmos genéticos.
- 75 11. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque antes de la selección de longitud de ondas se lleva a cabo un procesamiento previo de los espectros de referencia para incrementar el contraste espectral, o a través de la formación de derivaciones, deconvolución, filtrado, supresión de ruidos o reducción de datos a través de la transformación wavelet o descomposición factorial.

## ES 2 331 694 T3

12. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque la clasificación en los espectros de referencia en las clases en el banco de datos de referencia se lleva a cabo a través de métodos matemáticos de clasificación del reconocimiento de patrones, un modelo lineal general, a través de redes neuronales artificiales, métodos de la clasificación basada en casos, de la optimización por vectores o de aprendizaje artificial, de algoritmos genéticos o de métodos de la programación evolucionaria.

13. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque la clasificación en los espectros de referencia en las clases en el banco de datos de referencia se lleva a cabo a través de métodos matemáticos de clasificación del reconocimiento de patrones, como procedimientos estadísticos multivariados del reconocimiento de patrones, redes neuronales, métodos de la clasificación basada en casos, o de aprendizaje artificial, de algoritmos genéticos o de métodos de la programación evolucionaria.

14. Procedimiento acorde a la reivindicación 13, **caracterizado** porque se utilizan múltiples redes neuronales artificiales y modelos de clasificación.

15. Procedimiento acorde a la reivindicación 14, **caracterizado** porque se utilizan múltiples redes neuronales artificiales como red feed-forward con tres capas y un método de descenso de gradiente como algoritmo de aprendizaje.

16. Procedimiento acorde a las reivindicaciones 14 o 15, **caracterizado** porque el sistema de clasificación presenta una estructura tipo árbol, asimismo, las tareas de clasificación se descomponen en tareas parciales y los sistemas de clasificación individuales se combinan en una unidad formando un sistema de clasificación jerárquico y, a su vez, durante la evaluación se recorren automáticamente todas las etapas jerárquicas.

17. Procedimiento acorde a la reivindicación 16, **caracterizado** porque en el caso de los sistemas de clasificación individuales se trata de redes neuronales optimizadas para tareas especiales.

18. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado** porque la asignación de un espectro de prueba a una, dos o múltiples clases de espectros de referencia se lleva a cabo a través de métodos matemáticos de clasificación del reconocimiento de patrones, como procedimientos estadísticos multivariados del reconocimiento de patrones, redes neuronales, métodos de la clasificación basada en casos, o de aprendizaje artificial, de algoritmos genéticos o de métodos de la programación evolucionaria.

19. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque el registro de espectros IR se lleva a cabo en el área espectral de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  y/o de 4000 a 10.000  $\text{cm}^{-1}$ .

20. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque la sustancia de prueba es una sustancia inhibidora.

21. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 20, **caracterizado** porque la concentración de la sustancia inhibidora con la cual es tratado el cultivo bacteriano, se encuentra en el rango de 0,1 a 20 veces la concentración mínima para la sustancia inhibidora para las sustancias de prueba.

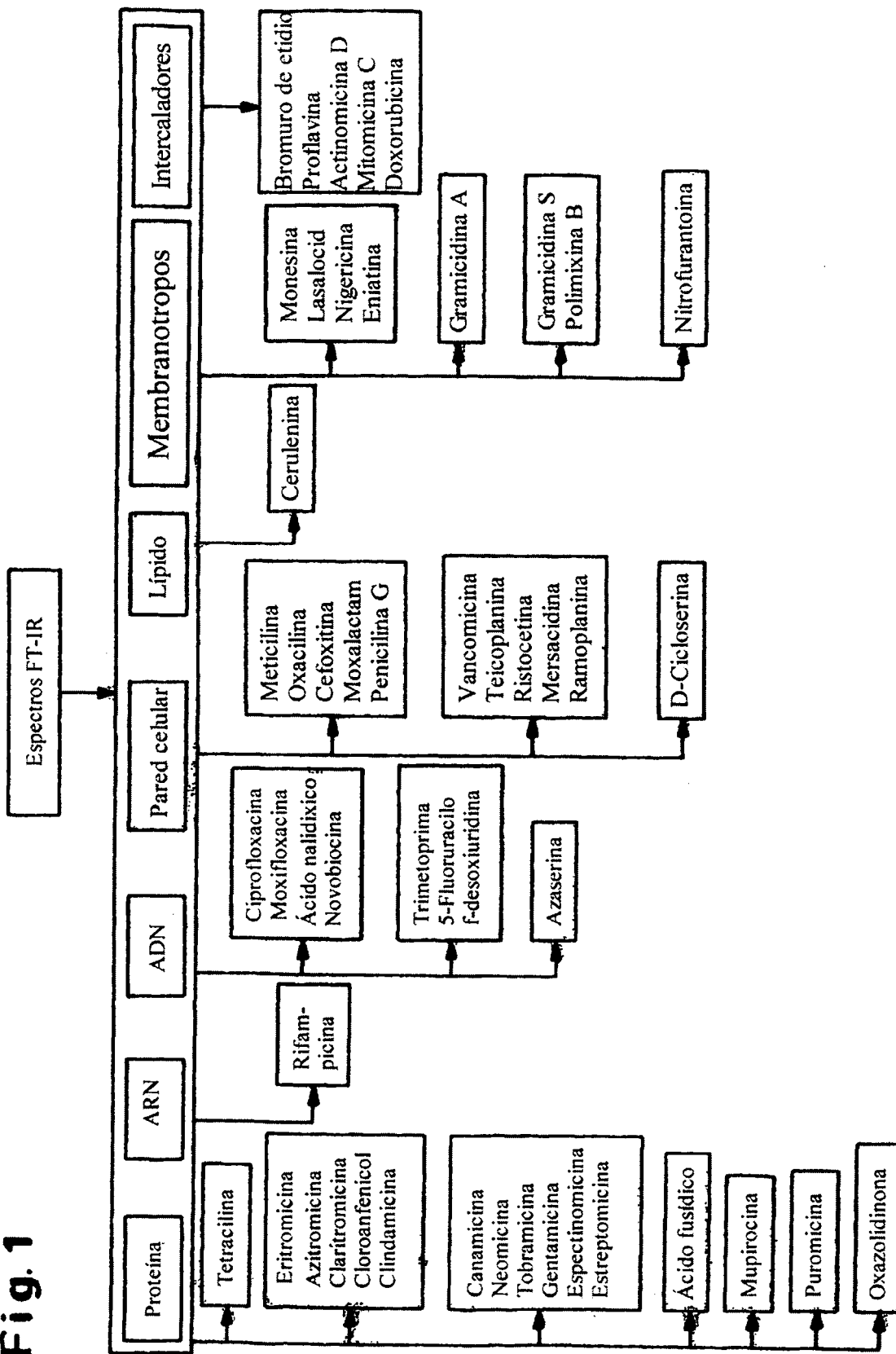
22. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 21, **caracterizado** porque se registran los espectros de prueba de un cultivo microbiano que fueron tratados, respectivamente, con la misma sustancia inhibidora pero con una concentración diferente.

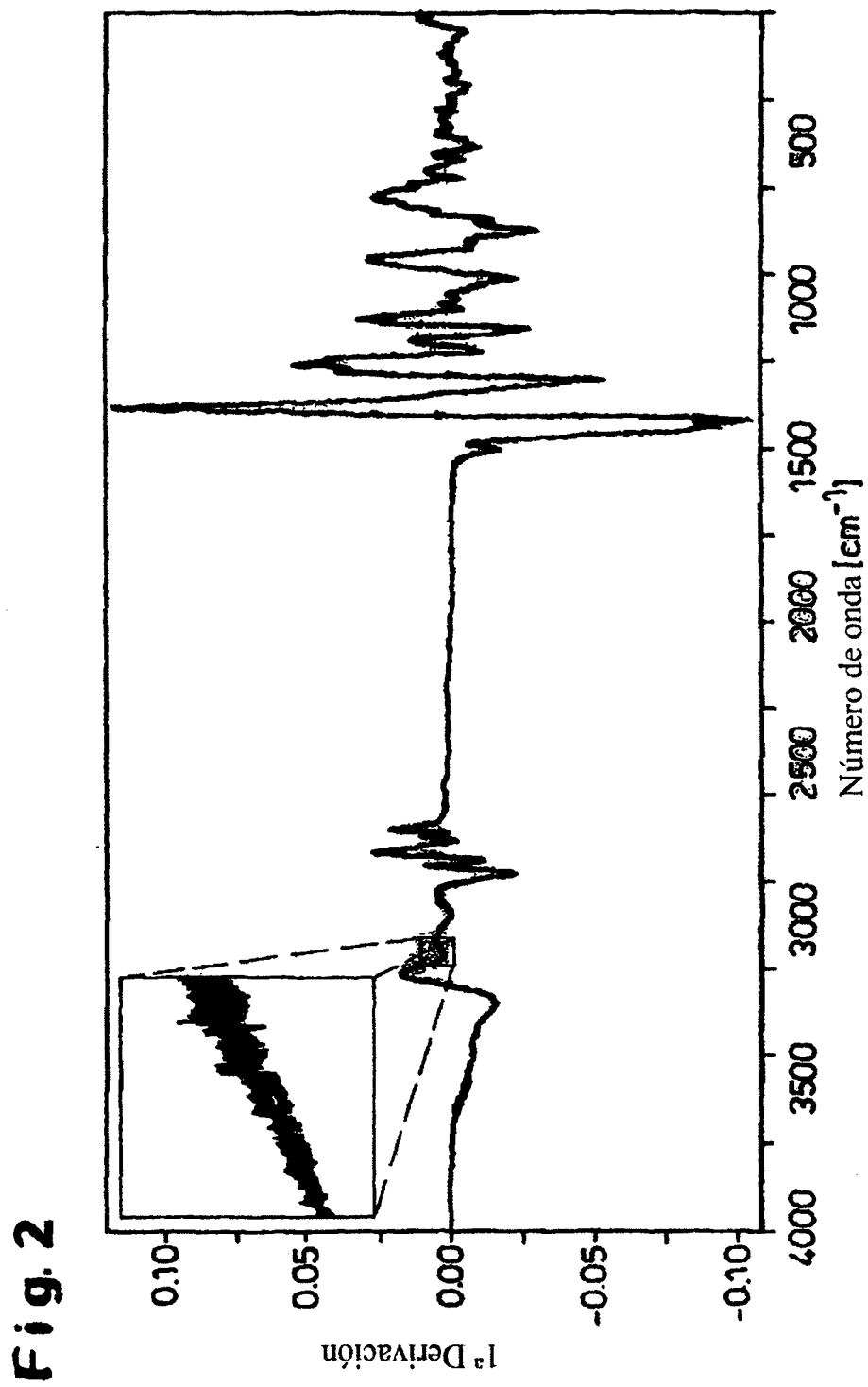
23. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 22, **caracterizado** porque la medición se lleva a cabo en cubetas, cubetas de flujo y microcubetas, que son medidas en transmisión, absorción o reflexión y son adecuadas para las mediciones o mediciones de flujo automatizadas y el high-throughput-screening, o cribado ultrarrápido.

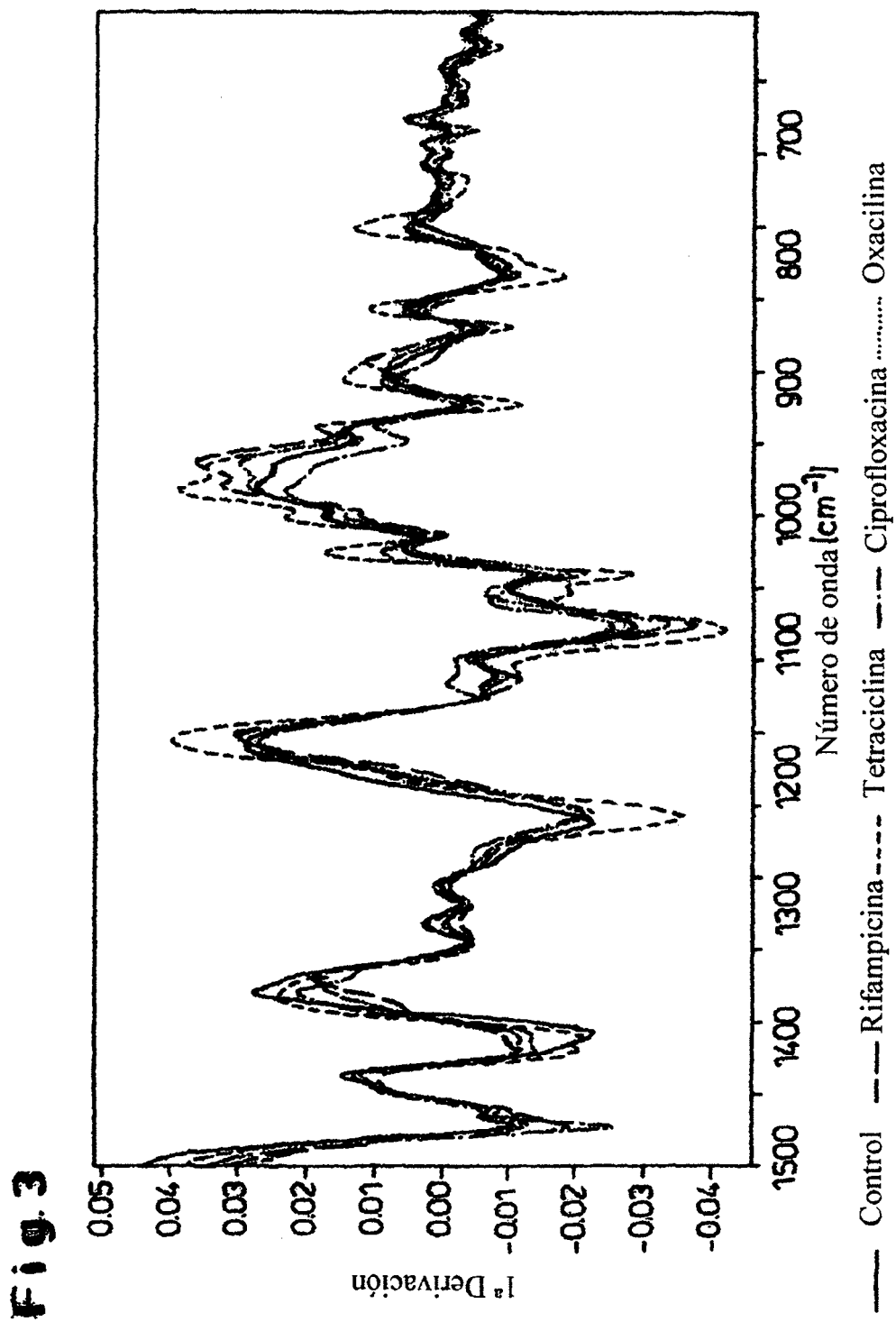
24. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 23, **caracterizado** porque las mediciones FT-IR, IR, Raman y FT-Raman pueden ser medidas directamente en líquidos y recipientes de tratamiento y preparación de las muestras.

25. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 24, **caracterizado** porque como cultivos celulares microbianos se implementan células procariotas o eucariotas, preferentemente, bacterias, hongos, levaduras o arqueobacterias.

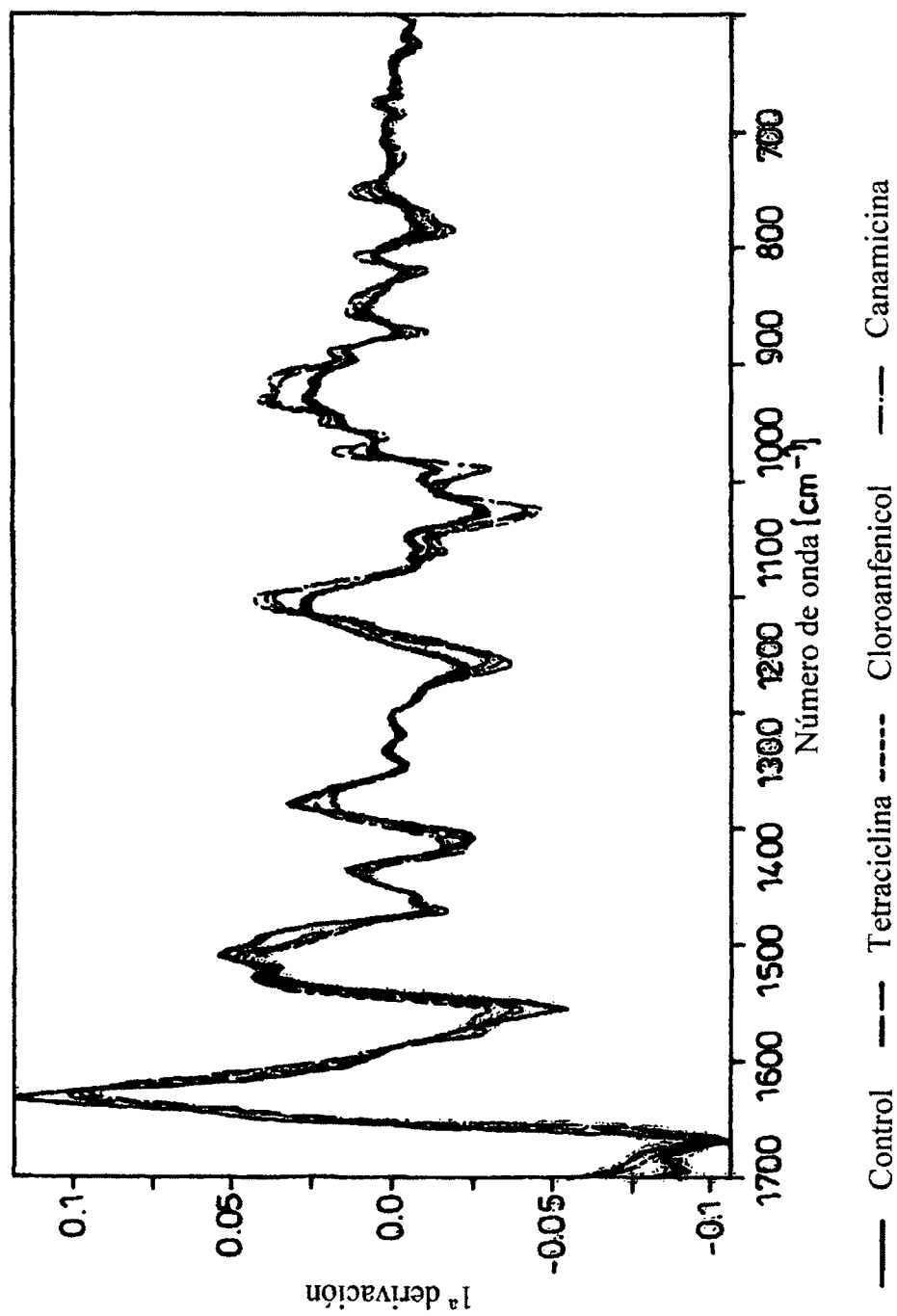
**Fig. 1**



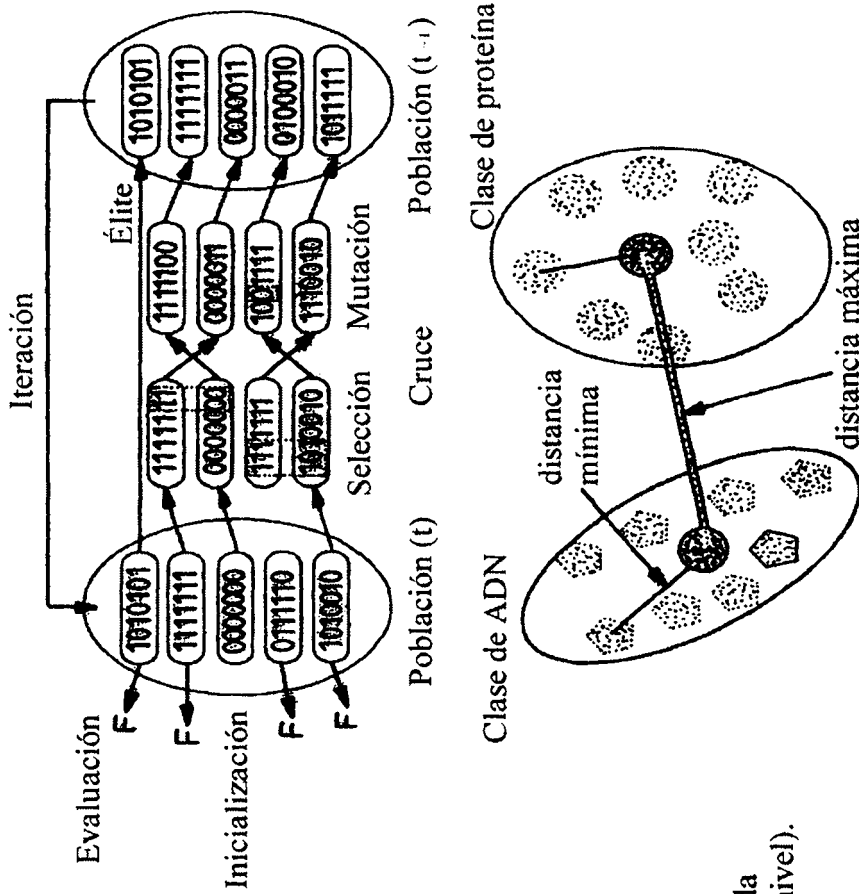




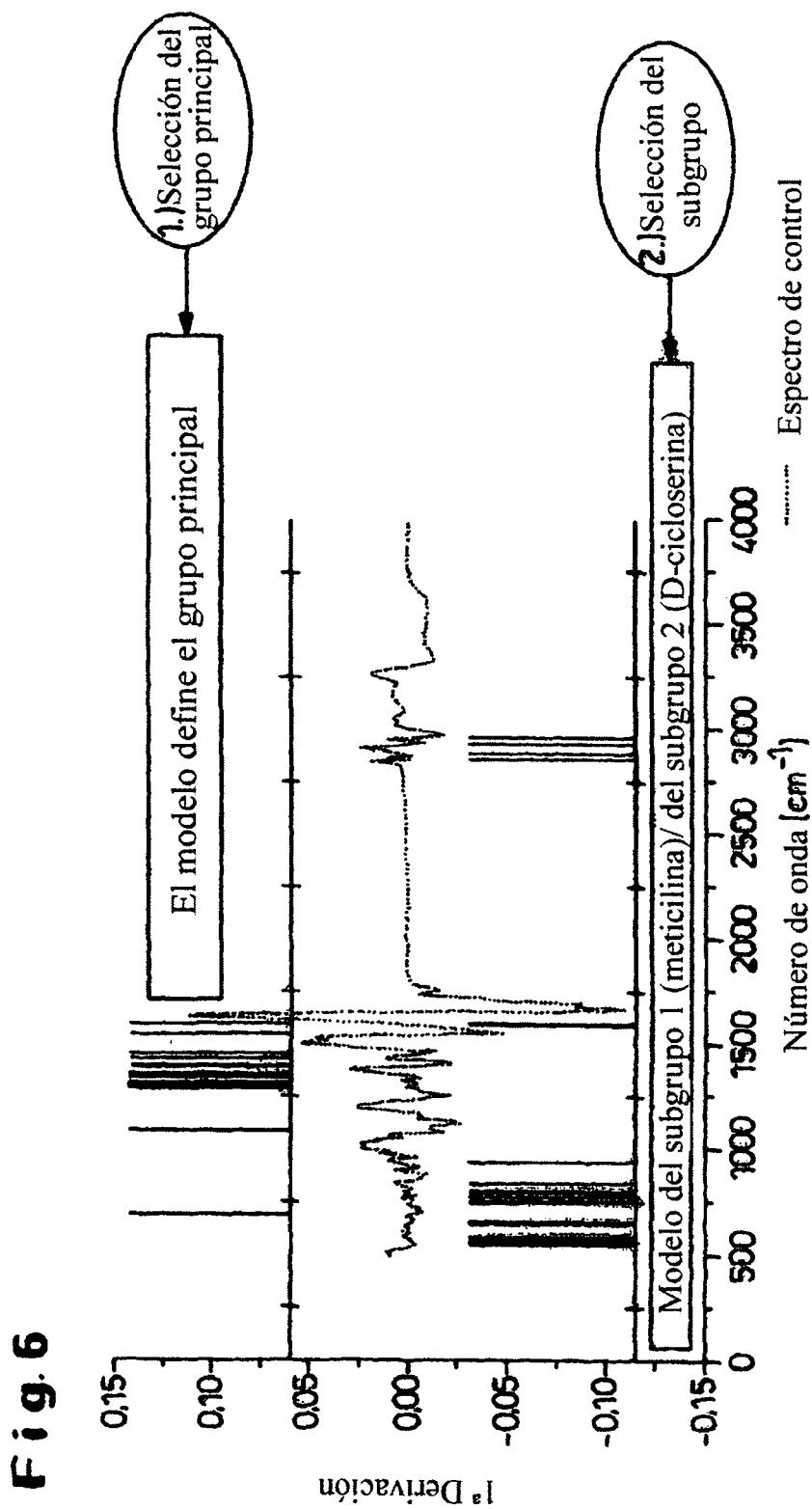
**Fig. 4**



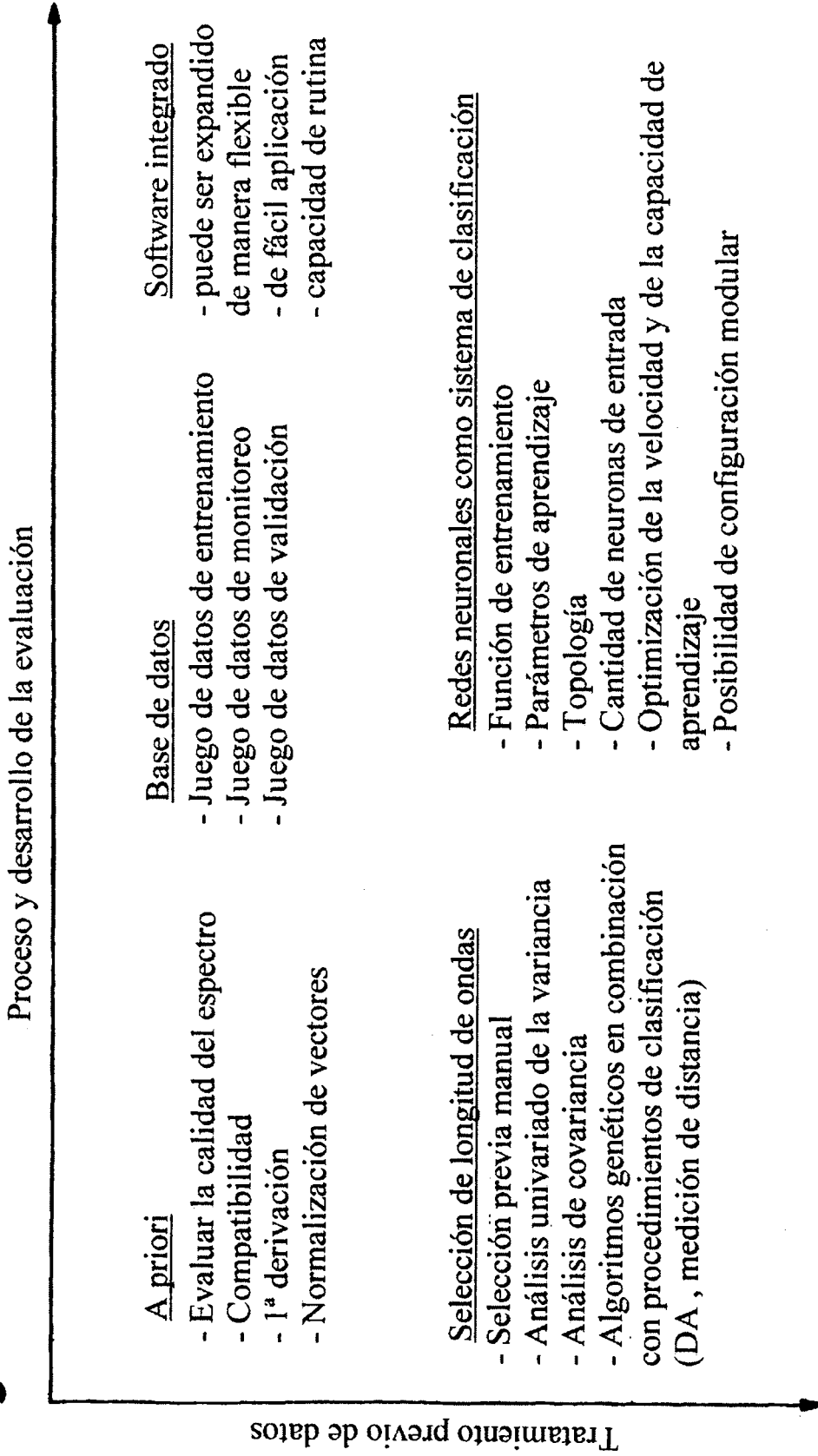
**Fig. 5**

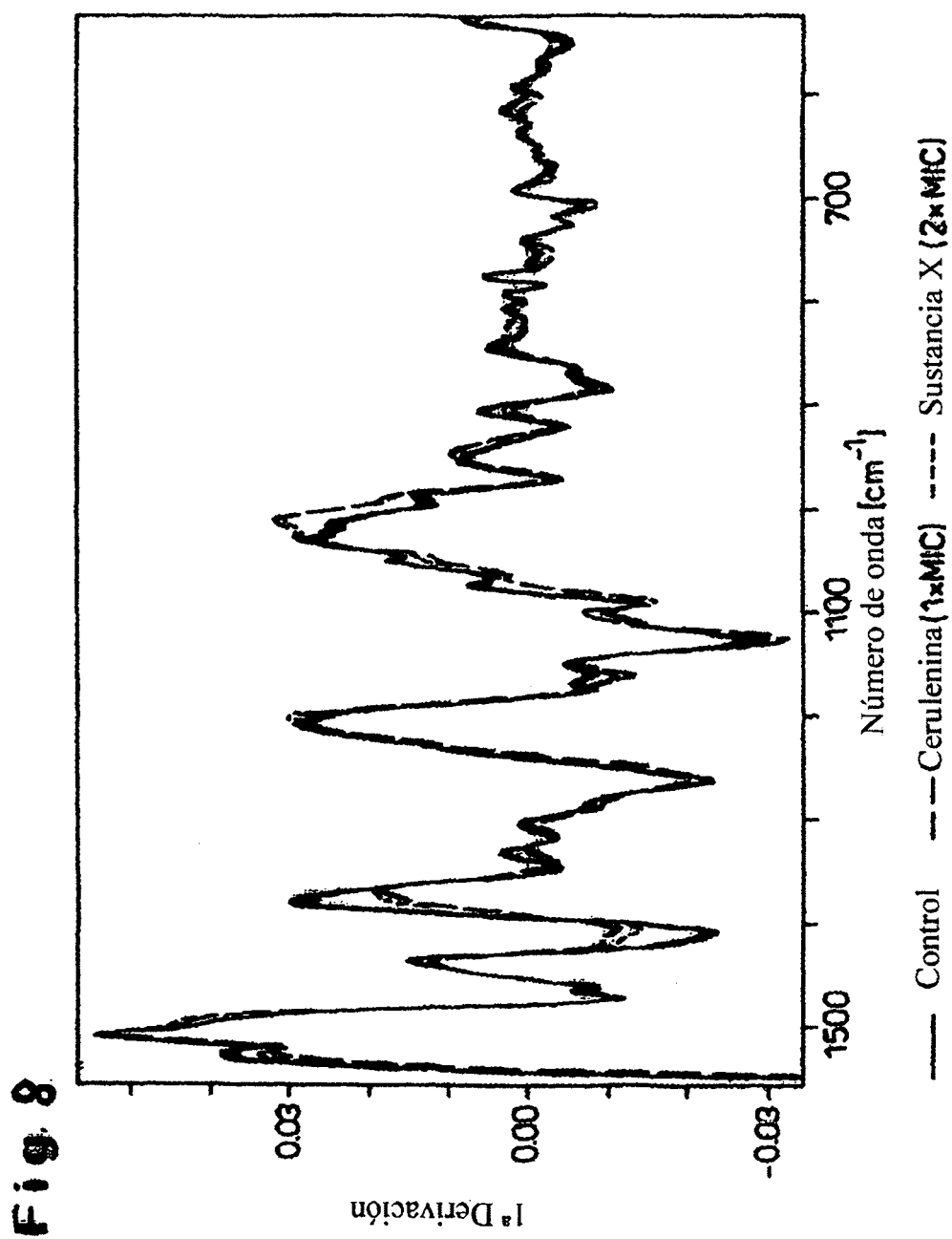


- Selección de la combinación óptima para la clasificación de longitudes de onda estadísticamente significativas.
- Algoritmos genéticos en combinación con procedimientos de clasificación (por ejemplo, distancia Euclidiana).
- 100-1000 ciclos iterativos en el caso de una tasa de mutación de 0.001 y frecuencia de cruce de 0.9.
- 200 (250) longitudes de onda para cada clasificación de nivel principal (o subnivel).

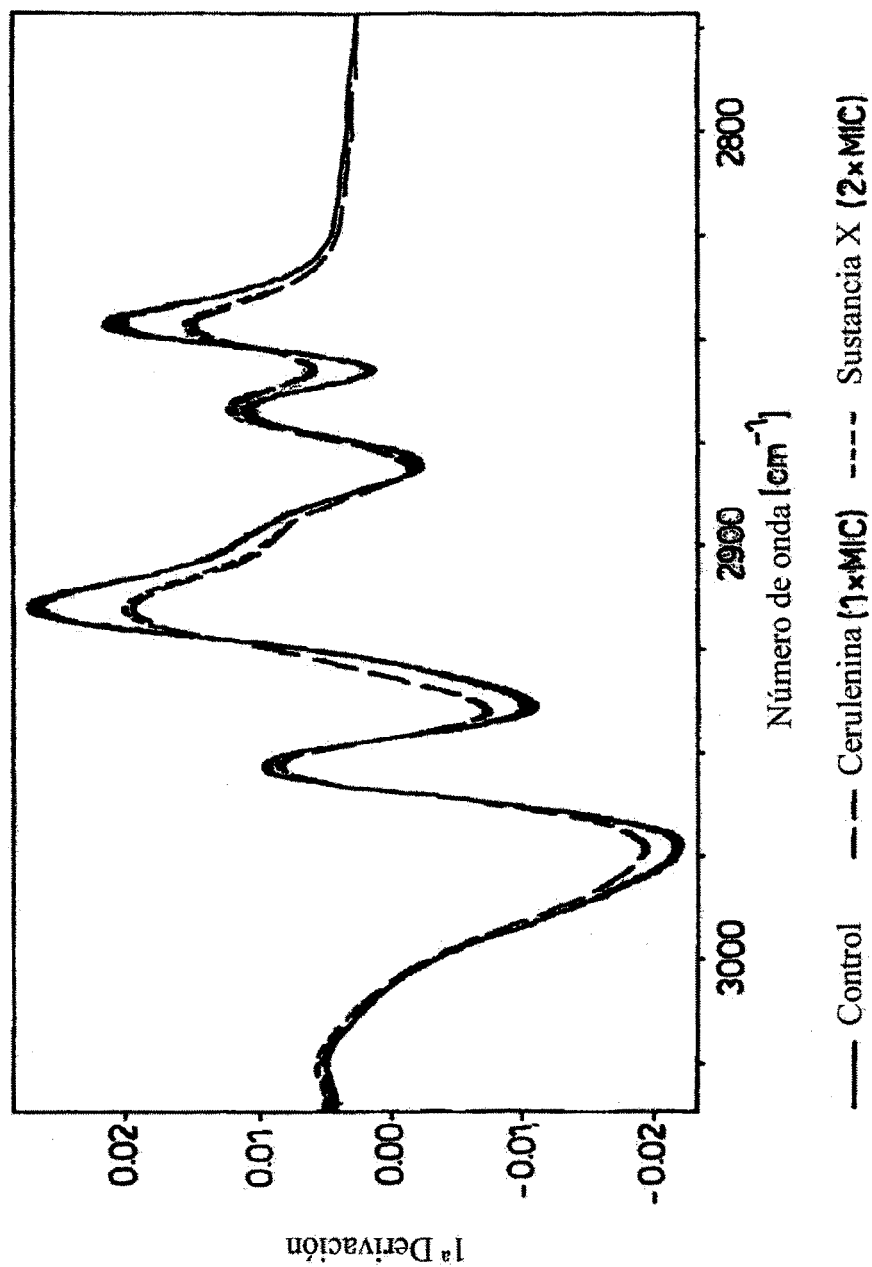


**Fig. 7**

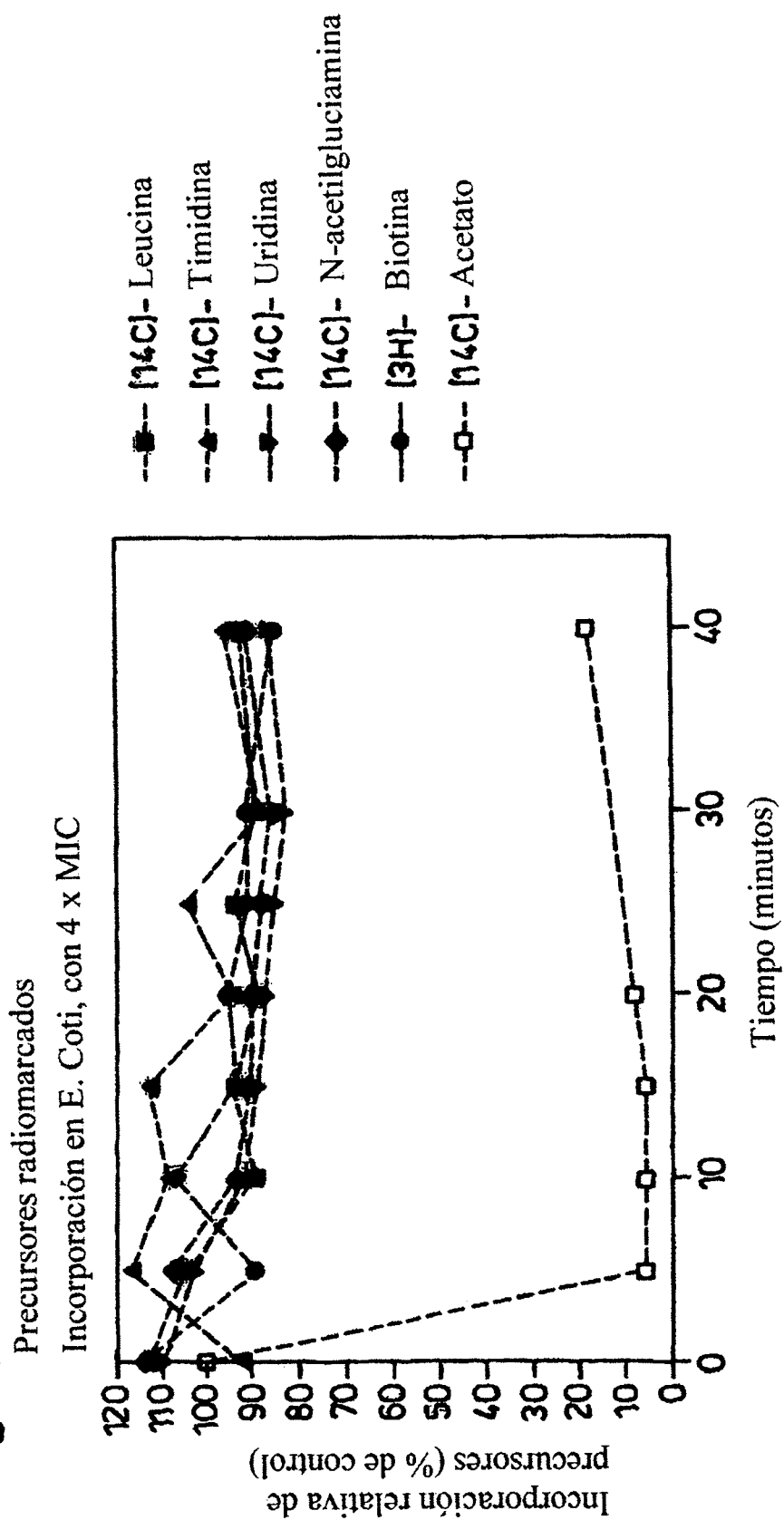




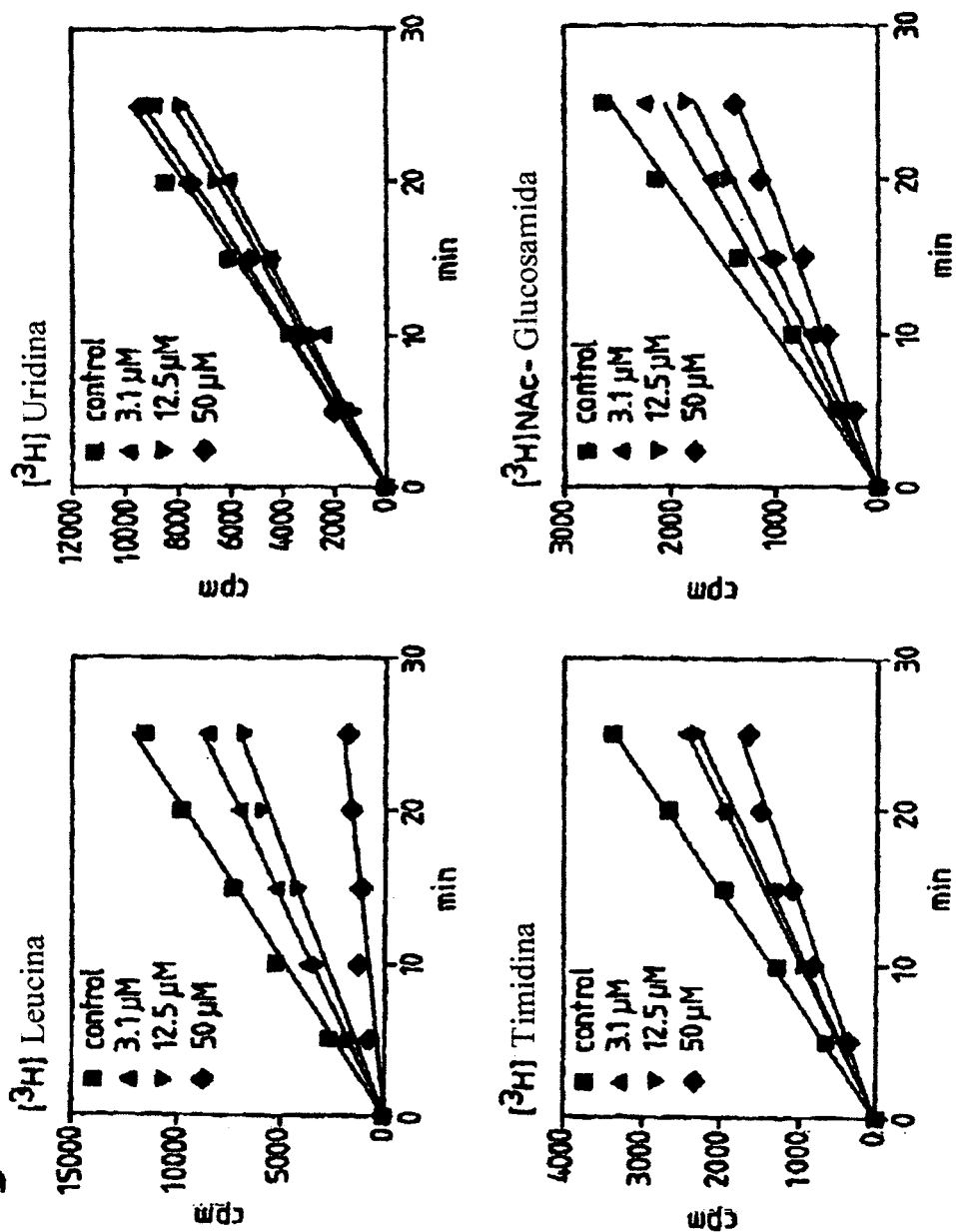
**Fig 9.**



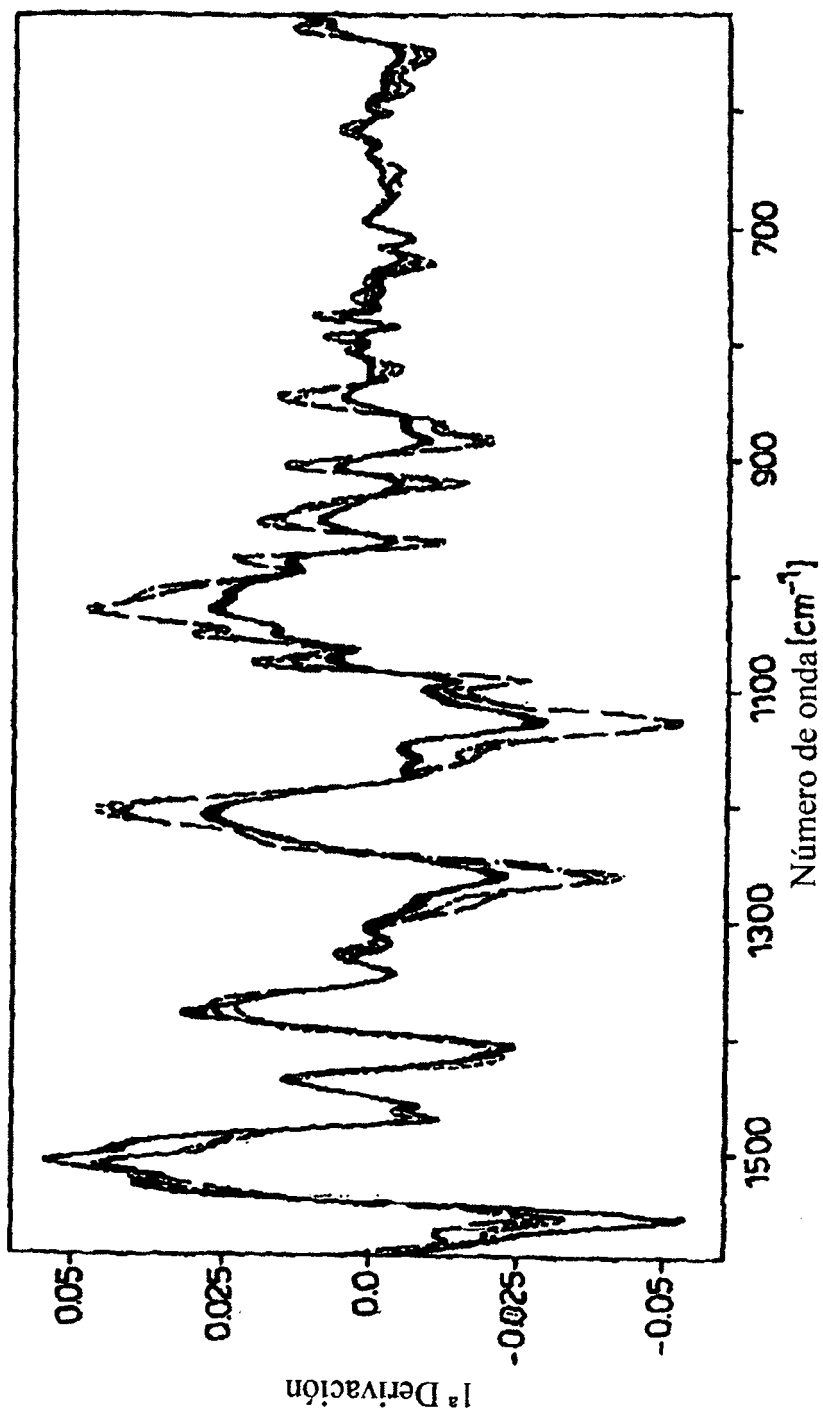
**Fig. 10**



**Fig. 11**



**Fig. 12**



--- Control --- Sustancia Y (16xMIC) --- Antibiótico dipéptido (0.5xMIC) --- Oxazolidinona (1xMIC)