



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 326 458**

⑫ Número de solicitud: 200800951

⑬ Int. Cl.:

C09K 11/06 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

A61K 31/69 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **04.04.2008**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **09.10.2009**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
09.10.2009

⑱ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 85 %) **c/ Serrano, 117**
28006 Madrid, ES
Universidad de Valladolid (Titular al 10 %) y
Universidad San Pablo CEU (Titular al 5 %)

⑲ Inventor/es: **Acuña Fernández, A. Ulises;**
Amat Guerri, Francisco;
Carrillo Gallego, Eugenia;
Hornillos Recuero, Valentín;
Marcos Celestino, Susana;
Requejo Isidro, José María;
Rivas López, Luis Ignacio;
Saugar Cruz, José María;
Águila de la Puente, Carmen del y
Merayo Lloves, Jesús

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Compuestos fluorescentes para diagnóstico de infecciones, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.**

㉒ Resumen:

Compuestos fluorescentes para diagnóstico de infecciones, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

La presente invención describe nuevos compuestos fluorescentes análogos de alquilfosfolípidos, que contienen en su estructura grupos fluorescentes de alta fotoestabilidad y que emiten en la zona de longitudes de onda del espectro visible. Dichos compuestos se incorporan fácilmente a microorganismos, permitiendo la detección e identificación de estos organismos mediante microscopia de fluorescencia. Asimismo, los nuevos compuestos fluorescentes permiten diagnosticar de forma rápida y sencilla la presencia de microorganismos patógenos caracterizados por ser resistentes al tratamiento con alquilfosfolípidos.

ES 2 326 458 A1

DESCRIPCIÓN

Compuestos fluorescentes para diagnóstico de infecciones, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

5 Sector de la técnica

Composiciones farmacéuticas para el diagnóstico clínico de enfermedades infecciosas, preferentemente oculares y para identificar la presencia de microorganismos.

10 Estado de la técnica

La prevención y el correcto tratamiento de algunas de las enfermedades que afectan al ojo requiere la identificación de una gran variedad de microorganismos susceptibles de producir infecciones en dicho órgano. Muchas de estas infecciones oculares pueden tener consecuencias muy graves para la visión del paciente infectado, si no se diagnostican y tratan tempranamente. Con este fin es necesario en algunos casos llevar a cabo la detección del agente infeccioso directamente en el órgano infectado, extrayendo del ojo fragmentos representativos del tejido susceptible de infección (biopsia) o analizando fluidos fisiológicos en contacto con dichos tejidos (lágrima, en este caso). Los métodos habituales para la detección de microorganismos en las muestras citadas se basan, frecuentemente, en realizar cultivos que incrementen la población del posible microorganismo patógeno, para facilitar su posterior identificación. Estos cultivos pueden requerir períodos de tiempo prolongados, de 1-4 días, durante los cuales no se puede tratar al paciente con medicamentos específicos para su infección, al desconocerse el organismo causal de la misma. Estos tiempos de espera tan dilatados pueden llegar a tener consecuencias de extrema gravedad para el órgano infectado, por lo que sería de gran utilidad disponer de métodos alternativos de detección que disminuyan considerablemente el tiempo necesario para realizar el correcto diagnóstico.

Por otra parte, para la prevención de este tipo de infecciones es muy importante que aquellos elementos que eventualmente puedan estar en íntimo contacto con el ojo durante largos períodos de tiempo, tales como las lentes de contacto y los líquidos de lavado correspondientes, se conserven y utilicen en condiciones de higiene elevada que aseguren su esterilidad. De forma análoga a lo descrito más arriba, para poder obtener información fiable sobre la posible contaminación de dichas prótesis oculares y de los medios de conservación de las mismas, frecuentemente es necesario recurrir a laboriosos métodos de cultivo de microorganismos. La complejidad de las actuales técnicas de diagnóstico de estos materiales, basadas en cultivos celulares limitan en este caso tanto la frecuencia como la extensión de su aplicación, con el consiguiente aumento del riesgo de infección para los usuarios.

Asimismo, se han desarrollado técnicas alternativas de detección de microorganismos infecciosos de tipo fluorimétrico, basadas en el uso de un compuesto marcador fluorescente que se adiciona directamente al medio donde se sospecha la existencia del microorganismo. Si el compuesto marcador fluorescente se incorpora al microorganismo infeccioso, es posible determinar la presencia y morfología del mismo utilizando diversos dispositivos de visualización de fluorescencia, tales como microscopios o citómetros de flujo (Kawamoto, F., Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter. *Lancet* **1991**, 337, 200-202). Como estos dispositivos permiten detectar intensidades muy pequeñas de fluorescencia, en principio es posible realizar un diagnóstico correcto con un número de células muy reducido, disminuyendo de manera considerable el tiempo requerido para dicha operación. Desgraciadamente, la utilización de este método directo de marcado fluorescente para la detección de infecciones en el ojo queda gravemente limitado por la falta de especificidad en el marcado fluorescente, causado porque la afinidad de los marcadores fluorescentes tradicionales por numerosos microorganismos patógenos de interés oftalmológico es muy similar a la afinidad por células y tejidos del ojo sano, dificultando la discriminación de la fluorescencia correspondiente a los organismos patógenos.

El objetivo de la presente invención consiste precisamente en utilizar un nuevo método sencillo y económico que permite aumentar la afinidad del marcador fluorescente por el organismo infeccioso. El nuevo método se basa en utilizar un marcador fluorescente unido a un tipo de compuestos de estructura molecular relativamente simple, que muestran mucha más afinidad por el organismo patógeno que por las células normales sanas del ojo. Estos compuestos, que se utilizan en la presente invención para la incorporación selectiva en el organismo patógeno del marcador fluorescente, pertenecen a la familia de los alquilfosfolípidos, y entre los mismos se encuentran por ejemplo miltefosina (MT), edelfosina (ET) e ilmofosina (IM) (Croft, S. L.; Engel, J., Miltefosine-discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2006**, 100 Suppl 1, S4-8).

Miltefosina (MT) se usa actualmente en el tratamiento de metástasis cutáneas de cáncer de mama, y se comercializa bajo el nombre de MILTEX. Además, miltefosina muestra una potente actividad antiparasitaria, por lo que se utiliza para tratamiento de la leishmaniasis humana (Soto, J.; Soto, P., Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2006**, 4, (2), 177-85) comercializándose bajo el nombre de IMPAVIDO (Zentaris S. A.) en Colombia, India y Alemania. Recientemente se ha iniciado también la utilización de MT para el tratamiento de leishmaniasis canina, utilizándose con este fin la composición comercial MILTEFORAN (Virbac). Por otro lado, se ha observado que la actividad citotóxica de MT se extiende a otros protozoos, tales como *Trichomonas* (Blaha, C.; Duchene, M.; Aspöck, H.; Walochnik, J., *In vitro* activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against metronidazole-resistant and -susceptible strains of *Trichomonas vaginalis*. *J Antimicrob Chemother* **2006**, 57, (2), 273-8), *Entamoeba histolytica* (Seifert, K.; Duchene, M.; Wernsdorfer, W. H.; Kollaritsch, H.; Scheiner, O.; Wiedermann, G.; Hottkowitz, T.; Eibl, H., Effects of miltefosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*.

Antimicrob Agents Chemother **2001**, 45, (5), 1505-10), amebas de vida libre, como *Acanthamoeba sp.* o *Naegleria sp.* (Schuster, F. L.; Guglielmo, B. J.; Visvesvara, G. S., *In-vitro* activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba spp.*, and *Naegleria fowleri*. *J Eukaryot Microbiol* **2006**, 53, (2), 121-6; Walochnik, J.; Duchene, M.; Seifert, K.; Obwaller, A.; Hottkowitz, T.; Wiedermann, G.; Eibl, H.; Aspöck, H., Cytotoxic activities of alkyphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba spp.* *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, (3), 695-701) patógenas para el hombre así como a otros microorganismos patógenos humanos, incluyendo hongos, levaduras (Obando, D.; Widmer, F.; Wright, L. C.; Sorrell, T. C.; Jolliffe, K. A., Synthesis, antifungal and antimicrobial activity of alkyphospholipids. *Bioorg Med Chem* **2007**, 15, (15), 5158-65; Widmer, F.; Wright, L. C.; Obando, D.; Handke, R.; Ganendren, R.; Ellis, D. H.; Sorrell, T. C., Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, 50, (2), 414-21) y *Streptococcus pneumoniae* (Llull, D., Rivas, L., García, E. *In vitro* bactericidal activity of the antiprotozoal drug miltefosine against *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*. **2007**, 51,(5):1844-8).

Se conoce muy poco sobre el mecanismo detallado mediante el cual miltefosina ejerce sus propiedades citotóxicas en los organismos citados. Los estudios más recientes sobre algunos parásitos específicos indican que posiblemente dicho mecanismo sea del tipo multi-diana, ya que la concentración intracelular de MT en los mismos es muy elevada, alcanzando en *Leishmania* valores en el rango milimolar (Luque-Ortega, J. R.; Rivas, L., Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, (4), 1327-32;Saugar, J. M.; Delgado, J.; Hornillos, V.; Luque-Ortega, J. R.; Amat-Guerri, F.; Acuña, A. U.; Rivas, L., Synthesis and Biological Evaluation of Fluorescent Leishmanicidal Analogues of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) as Probes of Antiparasite Mechanisms. *J Med Chem* **2007**, 50, (24), 5994-6003). Esta hipótesis también se apoya en la aparición de cepas de *Leishmania* resistentes a MT que se caracterizan porque dicha resistencia procede únicamente de defectos funcionales en los translocadores específicos del fármaco en el parásito (Seifert, K.; Perez-Victoria, F. J.; Stettler, M.; Sanchez-Canete, M. P.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Croft, S. L., Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*. *Int J Antimicrob Agents* **2007**, 30, (3), 229-35; Perez-Victoria, F. J.; Sanchez-Canete, M. P.; Seifert, K.; Croft, S. L.; Sundar, S.; Castanys, S.; Gamarro, F., Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* **2006**, 9, (1-2), 26-39; Perez-Victoria, F. J.; Sanchez-Canete, M. P.; Castanys, S.; Gamarro, F., Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* **2006**, 281, (33), 23766-75; Perez-Victoria, F. J.; Gamarro, F.; Ouellette, M.; Castanys, S., Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* **2003**, 278, (50), 49965-71). Estos transportadores específicos pertenecen a la familia de aminofosfolípido translocasas; sin embargo la identificación precisa de dicho transportador sólo se ha realizado en *Leishmania donovani* (Perez-Victoria, F. J.; Gamarro, F.; Ouellette, M.; Castanys, S., Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* **2003**, 278, (50), 49965-71), como LdMT3, y en *Saccharomyces cerevisiae* como Lem3 (Hanson, P. K.; Malone, L.; Birchmore, J. L.; Nichols, J. W., Lem3p is essential for the uptake and potency of alkylphosphocholine drugs, edelfosine and miltefosine. *J Biol Chem* **2003**, 278, (38), 36041-50). En *Leishmania* las mutaciones del transportador suponen la aparición de resistencia a miltefosina y edelfosina, cursando con una inhibición concomitante de la incorporación de miltefosina radioactiva al parásito; sin embargo, en el caso de pérdida de función de Lem3 de *S. cerevisiae*, aparece inhibida la incorporación del fosfolípido fluorescente NBD-PC, asociada a un fenotipo de resistencia a edelfosina, que se debe a una incorporación defectuosa del fármaco, aunque tal efecto no ha sido medido experimentalmente (Hanson, P. K.; Malone, L.; Birchmore, J. L.; Nichols, J. W., Lem3p is essential for the uptake and potency of alkylphosphocholine drugs, edelfosine and miltefosine. *J Biol Chem* **2003**, 278, (38), 36041-50).

Las conclusiones que se derivan de los anteriores estudios y que son relevantes para la presente invención se pueden resumir en la forma siguiente: i) MT y otros alquilfosfolípidos similares se incorporan selectivamente a eucariotas inferiores y a células transformadas; ii) la acción letal de estos compuestos está asociada a una incorporación intracelular masiva de dichos fármacos y iii) los mecanismos de resistencia a MT que se han identificado hasta el presente en varios tipos de parásitos están asociados exclusivamente a la acumulación defectuosa de dicho fármaco a dichos organismos.

Recientemente se ha iniciado el empleo masivo de MT en pacientes infectados por leishmaniasis visceral en la India y Nepal, especialmente en pacientes infectados con cepas resistentes al tratamiento con fármacos antimoniales (Sundar, S.; Chatterjee, M., Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* **2006**, 123, (3), 345-52); la misma estrategia se utiliza también en varios países de América del Sur, en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea (Soto, J.; Soto, P., Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2006**, 4, (2), 177-85). Debido a las dificultades para el correcto control hospitalario del tratamiento en estos entornos, es predecible la rápida aparición de cepas del parásito resistentes a MT. Experimentos en modelos animales han demostrado que la virulencia de los parásitos resistentes, debido a la deficiencia en el translocador de MT, es la misma que la de los parásitos sensibles al fármaco (Seifert, K.; Perez-Victoria, F. J.; Stettler, M.; Sanchez-Canete, M. P.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Croft, S. L., Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*. *Int J Antimicrob Agents* **2007**, 30, (3), 229-35). La disponibilidad de un reactivo y de un procedimiento rápido y manejable, como el que se propone en la presente invención, permitirá detectar tempranamente y atajar la aparición de cepas resistentes.

Por otro lado, el diagnóstico precoz de la presencia en el ojo de *Acanthamoeba*, infección amebiana con una incidencia especialmente elevada en usuarios de lentes de contacto con hábitos de higiene defectuosos, se realiza actualmente tras descartar previamente posibles infecciones por herpes y fúngicas, con el consiguiente daño ocasionado por dicho retraso, que lleva a veces a la pérdida irreversible de visión (Hammersmith, K. M., Diagnosis and management of *Acanthamoeba keratitis*. *Curr Opin Ophthalmol* **2006**, 17, (4), 327-31).

La aplicación adicional de los compuestos descritos en la presente invención en el control de calidad de los líquidos de preservación y lavado de lentes de contacto, así como de los medios de almacenamiento de córneas para trasplante, se basa en los mismos principios. Recientemente, una contaminación por *Fusarium* del líquido de preservación de lentes afectó seriamente a un elevado número de pacientes, con las consiguientes pérdidas económicas para el fabricante (Chang, D. C.; Grant, G. B.; O'Donnell, K.; Wannemuehler, K. A.; Noble-Wang, J.; Rao, C. Y.; Jacobson, L. M.; Crowell, C. S.; Sneed, R. S.; Lewis, F. M.; Schaffzin, J. K.; Kainer, M. A.; Genese, C. A.; Alfonso, E. C.; Jones, D. B.; Srinivasan, A.; Fridkin, S. K.; Park, B. J., Multistate outbreak of *Fusarium keratitis* associated with use of a contact lens solution. *JAMA* **2006**, 296, (8), 953-63; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Update: *Fusarium keratitis*-United States, 2005-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2006**, 55, (20), 563-4).

Las poblaciones de protozoos de vida libre constituyen organismos centinelas de la calidad del agua, así como de la contaminación ambiental (Martin-Cereceda, M.; Perez-Uz, B.; Serrano, S.; Guinea, A., Dynamics of protozoan and metazoan communities in a full scale wastewater treatment plant by rotating biological contactors. *Microbiol Res* **2001**, 156, (3), 225-38), por lo que la detección y visualización de estos microorganismos mediante el compuesto de la invención se facilitarían tras su concentración e incorporación del análogo fluorescente.

Existen estudios previos en los que se han sintetizado y utilizado análogos fluorescentes de alquilfosfolípidos:

1.- Se han preparado previamente análogos de un compuesto similar (edelfosina), marcados con grupos feniltetraeno, y se ha observado que dicho marcador no altera sustancialmente la bioactividad del fármaco original (Quesada, E.; Delgado, J.; Gajate, C.; Mollinedo, F.; Acuña, A. U.; Amat-Guerri, F., Fluorescent phenylpolyene analogues of the ether phospholipid edelfosine for the selective labeling of cancer cells. *J Med Chem* **2004**, 47, (22), 5333-5).

2.- Se han preparado análogos de MT con dichos grupos marcadores feniltetraeno o feniltrienino que mantienen las propiedades antiparasitarias del fármaco original y, además, se incorporan específicamente a parásitos procedentes de cepas de *Leishmania* sensibles al fármaco, pero no a los procedentes de cepas resistentes (Saugar, J. M.; Delgado, J.; Hornillos, V.; Luque-Ortega, J. R.; Amat-Guerri, F.; Acuña, A. U.; Rivas, L., Synthesis and Biological Evaluation of Fluorescent Leishmanicidal Analogues of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) as Probes of Antiparasite Mechanisms. *J Med Chem* **2007**, 50, (24), 5994-6003).

3.- Se ha utilizado el análogo fluorescente de pentamidina DB-99 para la detección temprana de organismos resistentes al tratamiento con fármacos arsenicales en la tripanosomiasis africana (Stewart, M. L.; Krishna, S.; Burchmore, R. J.; Brun, R.; de Koning, H. P.; Boykin, D. W.; Tidwell, R. R.; Hall, J. E.; Barrett, M. P., Detection of arsenical drug resistance in *Trypanosoma brucei* with a simple fluorescence test. *Lancet* **2005**, 366, (9484), 486-7). En *Trypanosoma brucei*, el microorganismo causante de dicha infección, la entrada de pentamidina y de DB99 al interior del parásito se realiza a través del mismo transportador de fármacos arsenicales. En consecuencia, la ausencia o disfunción de dicho transportador supone la inhibición de la internalización de pentamidina y de DB-99 y, por tanto, la inhibición del marcado fluorescente del mismo, así como la aparición de un fenotipo de resistencia a fármacos arsenicales.

Descripción de la invención

Descripción breve

Un aspecto de la invención lo constituye un compuesto fluorescente útil para la identificación diferencial de microorganismos, en adelante compuesto de la invención, que comprende un análogo de un alquilfosfolípido con un grupo fluorescente de elevada fotoestabilidad que emite en la zona de longitudes de onda del espectro visible.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “análogo de alquilfosfolípido” se refiere a un compuesto obtenido por síntesis y cuya estructura se parece a la de un alquilfosfolípido. Tal como se utiliza en la presente invención el término “alquilfosfolípido” se refiere a un compuesto que incluye en su estructura un resto lipofílico, formado por combinaciones lineales o cíclicas de átomos de carbono e hidrógeno (parte alquímica) unido a un resto hidrofílico, formado por un grupo fosfato esterificado o libre (fosfolípido). Entre los alquilfosfolípidos se encuentran, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: hexadecilfosfocolina (miltefosina, MT), 1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (edelfosina, EF) y 1-*S*-hexadecil-2-metoximetil-*rac*-glicero-3-fosfocolina (ilmofosina, IM). Ejemplos de análogos de alquilfosfolípidos son, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, *todo*-(*E*)-13-feniltrideca-6,8,10,12-tetraenilfosfocolina y *todo*-(*E*)-13-feniltrideca-8,10,12-trien-6-inilfosfocolina.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “microorganismo” se refiere a cualquier protozoo, ameba, hongo, levadura y bacteria, perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: *Leishmania sp.*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas sp.*, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba sp.*, *Naegleria sp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Fusarium sp.*, *Tetrahymena pyriformis*, *Balamuthia*.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “grupo fluorescente” se refiere a un grupo fluorescente de elevada fotoestabilidad que emite en la zona de longitudes de onda del espectro visible, entre los que se encuentran, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: borodipirrometenos, xantenos, rodaminas, cianinas, oxacinas, porfirinas, cumarinas e hidrocarburos policíclicos, con o sin sustituyentes.

Un aspecto más particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en el que el análogo de alquilfosfolípido es miltefosina (MT), edelfosina (EF) o ilmofofosina (IM).

Un aspecto más particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en el que el análogo de alquilfosfolípido es un análogo de miltefosina (MT), edelfosina (EF) o ilmofofosina (IM).

Un aspecto particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en el que el grupo fluorescente es borodipirrometeno (BDP) libre o sustituido.

Un aspecto particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en el que el derivado de alquilfosfolípido es miltefosina y el grupo fluorescente es BDP libre o sustituido.

Un aspecto más particular de la invención lo constituye el compuesto de la invención BDP-MT o Et-BDP-MT.

Un aspecto particular de la invención lo constituye un procedimiento de obtención del compuesto de la invención que comprende las siguientes etapas:

i) obtención del correspondiente α -H-pirrol sustituido a partir de un dicetoalcohol y acetoacetato de etilo,

ii) condensación del α -H-pirrol con el adecuado α -formilpirrol,

iii) reacción del dipirrometeno así formado con eterato de trifluoruro de boro,

iv) introducción del grupo fosfocolina.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica útil para un procedimiento de identificación de microorganismos.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de diagnóstico, en adelante composición farmacéutica de diagnóstico de la invención, que comprende un compuesto de la invención, por ejemplo el compuesto BDP-MT o Et-BDP-MT.

Finalmente, otro aspecto particular de la invención es el uso de la composición farmacéutica de diagnóstico de la invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la invención, en un procedimiento de identificación de microorganismos.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de diagnóstico de la invención en un procedimiento de diagnóstico *ex vivo* a partir de muestras biológicas humanas o veterinarias de individuos portadores de enfermedades infecciosas pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: queratitis oculares, leishmaniasis, tripanosomiasis africana y americana, neumonía por *Streptococcus pneumoniae*, amebiasis, trichomoniasis y micosis.

Otra realización más particular lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el que la enfermedad infecciosa está provocada por un microorganismo perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: *Leishmania sp.*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas sp.*, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba sp.*, *Naegleria sp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Fusarium sp.*, *Tetrahymena pyriformis*, *Balamuthia*.

Otra realización más particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de diagnóstico de la invención en el que el procedimiento de diagnóstico se lleva a cabo sobre una muestra biológica de origen ocular, por ejemplo, obtenida por un raspado corneal.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de diagnóstico de la invención en el que el procedimiento se corresponde con la identificación de microorganismos en muestras no humanas ni animales, por ejemplo en aguas, prótesis oculares, lentes de contacto, líquidos de limpieza de lentes de contacto o medios de preservación de córneas.

Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado que análogos bioactivos de alquilfosfolípidos, como por ejemplo los compuestos BDP-MT o Et-BDP-MT, que contienen en su estructura grupos fluorescentes de alta fotoestabilidad y que emiten en la zona de longitudes de onda del espectro visible de 400-700 nm (Slavik, J., *Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology* 1ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2004; p 320), se incorporan

fácilmente a microorganismos, y que esta incorporación es detectable con microscopios de fluorescencia convencionales. Así, un experto en diagnóstico visual podría identificar fácilmente la presencia de microorganismos, por ejemplo hongos, protozoos, e incluso determinadas bacterias, como *Streptococcus pneumoniae* etc., capaces de incorporar dichos compuestos. Asimismo, una vez identificada la especie, el experto podría deducir la posible resistencia a un tratamiento con alquilfosfolípidos, que se relacionaría directamente con una deficiente incorporación del compuesto y un fenotipo de resistencia a la acción citotóxica de alquilfosfolípidos.

Con este fin es suficiente añadir el análogo fluorescente al medio o tejido en el que se sospecha la presencia de microorganismos. Por ejemplo, mediante la aplicación directa sobre la córnea de la composición farmacéutica que comprende el compuesto. En caso afirmativo, dichos microorganismos se marcan rápidamente con el análogo fluorescente, permitiendo su identificación visual mediante los métodos habituales de observación microscópica. Además, si los organismos contienen el transportador específico del fármaco original MT, se observa la rápida aparición de fluorescencia en el interior del mismo. Por el contrario, si el organismo es resistente al fármaco MT, en las mismas condiciones no se observa fluorescencia en el interior del parásito. De esta forma se dispone de un método de diagnóstico rápido y sencillo de la presencia de dichos microorganismos y/o de su resistencia al fármaco MT.

Más concretamente, y como ejemplo particular de la invención, se han sintetizado y ensayado biológicamente una serie de análogos fluorescentes de MT, caracterizados porque incorporan un grupo fluorescente borodipirrometeno (BDP) a la cadena alifática de dicho compuesto (ver ejemplos). Cuando se adicionan dichos análogos emisores a un medio fisiológico en el que están presentes trofozoítos de *Acanthamoeba* e hifas y conidios de hongos, se incorporan rápidamente a ambos tipos de organismos, permitiendo su correcta visualización y la consiguiente identificación individual, basada en sus características morfológicas. Este método facilitaría el diagnóstico diferencial de microorganismos en el ojo, ya que es posible aplicar dichos compuestos en forma de colirio a dicho órgano, para la observación directa. Asimismo, el método mencionado es aplicable al diagnóstico de la presencia de dichos organismos en muestras procedentes de tejidos o fluidos biológicos, por ejemplo raspados corneales, o para el análisis de líquidos de preservación de trasplantes de córnea o de líquidos de preservación e higiene de lentes de contacto.

A continuación se mencionan aplicaciones posibles de estos compuestos, fundamentadas en los estudios realizados hasta el momento y resumidos en el estado de la técnica:

1.- Diagnóstico rápido y fiable de enfermedades de la visión, como queratitis oculares provocadas por infecciones fúngicas o amebianas (*Acanthamoeba sp.*).

2.- Diagnóstico rápido y fiable de posibles contaminaciones en prótesis oculares (lentes de contacto, etc.), líquidos de limpieza de lentes de contacto o medios de preservación de córneas, a partir de la detección de la presencia de organismos patógenos en dichos medios.

3.- Diagnóstico rápido de pacientes y animales (perro) infectados con cepas de *Leishmania* resistentes al fármaco antiparasitario miltefosina, a partir de la detección de parásitos resistentes, tanto en fluidos fisiológicos, incluyendo sangre periférica, como en muestras y biopsias de tejidos procedentes de dichos pacientes.

4.- Diagnóstico rápido del grado de higiene medioambiental, a partir de la identificación de protozoos de vida libre en medios acuosos de relevancia medioambiental.

5.- Investigación a nivel macroscópico y molecular, mediante técnicas de bioimagen, de propiedades farmacológicas y biológicas de miltefosina y alquilfosfolípidos similares, tanto en estudios celulares como en animales de experimentación, basados en la identificación diferencial de la fluorescencia de dichos análogos en los diferentes órganos y tejidos del animal de experimentación.

Por lo tanto, un aspecto de la invención lo constituye un compuesto fluorescente útil para la identificación diferencial de microorganismos, en adelante compuesto de la invención, que comprende un análogo de un alquilfosfolípido con un grupo fluorescente de elevada fotoestabilidad que emite en la zona de longitudes de onda del espectro visible.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “análogo de alquilfosfolípido” se refiere a un compuesto obtenido por síntesis y cuya estructura se parece a la de un alquilfosfolípido. Tal como se utiliza en la presente invención el término “alquilfosfolípido” se refiere a un compuesto que incluye en su estructura un resto lipofílico, formado por combinaciones lineales o cíclicas de átomos de carbono e hidrógeno (parte alquílica) unido a un resto hidrofílico, formado por un grupo fosfato esterificado o libre (fosfolípido). Entre los alquilfosfolípidos se encuentran, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: hexadecilfosfocolina (miltefosina, MT), 1-O-octadecil-2-O-metil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (edelfosina, EF) y 1-S-hexadecil-2-metoximetil-*rac*-glicero-3-fosfocolina (ilmofosina, IM). Ejemplos de análogos de alquilfosfolípidos son, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, *todo*-(*E*)-13-feniltrideca-6,8,10,12-tetraenilfosfocolina y *todo*-(*E*)-13-feniltrideca-8,10,12-trien-6-inilfosfocolina.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “microorganismo” se refiere a cualquier protozoo, ameba, hongo, levadura y bacteria, perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: *Leishmania sp.*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas sp.*, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba sp.*, *Naegleria sp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Fusarium sp.*, *Tetrahymena pyriformis*, *Balamuthia*.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “grupo fluorescente” se refiere a un grupo fluorescente de elevada fotoestabilidad que emite en la zona de longitudes de onda del espectro visible, entre los que se encuentran, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: borodipirrometenos, xantenos, rodaminas, cianinas, oxacinas, porfirinas, cumarinas e hidrocarburos policíclicos, con o sin sustituyentes.

Un aspecto más particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en el que el análogo de alquilfosfolípido es miltefosina (MT), edelfosina (EF) o ilmofofosina (IM).

Un aspecto más particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en el que el análogo de alquilfosfolípido es un análogo de miltefosina (MT), edelfosina (EF) o ilmofofosina (IM).

Un aspecto particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en el que el grupo fluorescente es borodipirrometeno (BDP) libre o sustituido.

Un aspecto particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en el que el derivado de alquilfosfolípido es miltefosina y el grupo fluorescente es BDP libre o sustituido.

Un aspecto más particular de la invención lo constituye el compuesto de la invención BDP-MT o Et-BDP-MT.

Un aspecto particular de la invención lo constituye un procedimiento de obtención del compuesto de la invención que comprende las siguientes etapas:

i) obtención del correspondiente α -H-pirrol sustituido a partir de un dicetoalcohol y acetoacetato de etilo,

ii) condensación del α -H-pirrol con el adecuado α -formilpirrol,

iii) reacción del dipirrometeno así formado con eterato de trifluoruro de boro,

iv) introducción del grupo fosfocolina.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica útil para un procedimiento de identificación de microorganismos.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de diagnóstico, en adelante composición farmacéutica de diagnóstico de la invención, que comprende un compuesto de la invención, por ejemplo el compuesto BDP-MT o Et-BDP-MT.

Finalmente, otro aspecto particular de la invención es el uso de la composición farmacéutica de diagnóstico de la invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la invención, en un procedimiento de identificación de microorganismos.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de diagnóstico de la invención en un procedimiento de diagnóstico *ex vivo* a partir de muestras biológicas humanas o veterinarias de individuos portadores de enfermedades infecciosas pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: queratitis oculares, leishmaniasis, tripanosomiasis africana y americana, neumonía por *Streptococcus pneumoniae*, amebiasis, trichomoniasis y micosis.

Otra realización más particular lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el que la enfermedad infecciosa está provocada por un microorganismo perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: *Leishmania sp.*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas sp.*, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba sp.*, *Naegleria sp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Fusarium sp.*, *Tetrahymena pyriformis*, *Balamuthia*.

Otra realización más particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de diagnóstico de la invención en el que el procedimiento de diagnóstico se lleva a cabo sobre una muestra biológica de origen ocular, por ejemplo, obtenida por un raspado corneal.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de diagnóstico de la invención en el que el procedimiento se corresponde con la identificación de microorganismos en muestras no humanas ni animales, por ejemplo en aguas, prótesis oculares, lentes de contacto, líquidos de limpieza de lentes de contacto o medios de preservación de córneas.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Síntesis de los análogos fluorescentes de BDP-MT y Et-BDP-MT, a través de los intermedios 1 a 5.

Figura 2.- Detección diferencial de resistencia a miltefosina en promastigotes de *L. donovani* (cepa MHOM/ET/67/L82). Promastigotes de *L. donovani* sensibles (WT) (fila superior) o resistentes a MT (R40) (fila inferior) se incubaron

con BDP-MT 7.5 μ M durante 2 h a 26°C, se lavaron con seroalbúmina bovina (BSA) tres veces, y se examinaron por microscopía confocal utilizando 488 nm como longitud de excitación y 502-555 nm como entorno de lectura de la emisión.

5 Figura 3.- *Tinción diferencial de las dos formas diferenciales de Acanthamoeba castellanii por BDP-MT*. Quistes (a) y trofozoítos (b) de *A. castellanii* se incubaron a 32°C con 5 μ M BDP-MT durante 15 min, se lavaron con una disolución de BSA (10 mg/mL) y se observaron en un microscopio confocal, utilizando 488 nm como longitud de onda de excitación y detectando la emisión en el intervalo 502-555 nm.

10 Figura 4.- *Tinción simultánea diferencial por BDP-MT de Fusarium y las dos formas de Acanthamoeba castellanii*. Trofozoítos (a) y quistes (b) de *A. castellanii* conjuntamente con Hifas de *Fusarium sp.* (c) se incubaron 15 minutos con 5 μ M BDP-MT y se lavaron con BSA. Se observaron en un microscopio confocal utilizando 488 nm como longitud de onda de excitación y detectando la emisión en el intervalo 502-555 nm.

15 Figura 5.- *Tinción simultánea diferencial por Et-BDP-MT de Fusarium y las dos formas de Acanthamoeba castellanii*. Trofozoítos (a) y quistes (b) de *A. castellanii* conjuntamente con hifas de *Fusarium sp* (c) se incubaron 15 minutos a 30°C con 5 μ M Et-BDP-MT y se lavaron con BSA. La fluorescencia se observó mediante un microscopio de epifluorescencia con cámara CCD, y filtro de emisión de 480-520 nm.

20 Figura 6.- *Tinción por BDP-MT de Tetrahymena pyriformis, como protozoo de vida libre. Tetrahymena pyriformis* se incubó con 5 μ M BDP-MT durante 4 h, y se lavó y se fijó con paraformaldehído al 2%, para evitar movimientos durante el proceso de adquisición de imágenes. Las células se observaron en un microscopio confocal utilizando 488 nm como longitud de onda de excitación y detectando la emisión en el intervalo 502-555 nm.

25 Ejemplos de realización

Ejemplo 1

30 *Obtención de dos compuestos análogos de miltefosina que incorporan en su estructura grupos fluorescentes en la zona del visible: BDP-MT y Et-BDP-MT*

Estos dos análogos fluorescentes con el cromóforo borodipirrometeno (BDP) se obtienen por un procedimiento similar en dos pasos, partiendo de los pirroles correspondientes (Figura 1). Así, se condensa el α -H pirrol 3 con 2-formil-3,5-dimetil-1H-pirrol o con 2-formil-3,5-dimetil-4-etil-1H-pirrol en presencia de oxiclورو de fósforo (reacción de MacDonald). Los correspondientes dipirrometenos formados se convierten *in situ* en los respectivos colorantes BDP sustituidos 4 y 5 mediante reacción con eterato de trifluoruro de boro en presencia de trietilamina. En un último paso sintético se introduce el grupo fosfocolina por reacción con 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido en presencia de trimetilamina. Los precursores se obtienen como sigue: el dicetoalcohol 1 se alcanza por monoalquilación de acetilacetona con 11-bromo-1-undecanol en acetona, en presencia de carbonato potásico y el éter corona 18-crown-6; el etoxicarbonilpirrol 2 se prepara en dos pasos: 1) acetoacetato de etilo se trata con nitrito sódico, y 2) el hidroxí-imino compuesto obtenido se reduce con zinc/ácido acético (síntesis de Johnson-Knorr) en presencia de 1. El α -H pirrol 3 se obtiene por descarboxilación de 2 por tratamiento con hidróxido sódico en agua/etanol. 2-Formil-3,5-dimetil-1H-pirrol es un producto comercial, mientras que su homólogo 2-formil-4-etil-3,5-dimetil-1H-pirrol se obtiene por formilación de 2,5-dimetil-3-etil-1H-pirrol (kriptopirrol) con oxiclورو de fósforo en dimetilformamida.

Ejemplo 2

50 *Diagnóstico de la presencia de parásitos del género Leishmania sensibles o resistentes al fármaco miltefosina, mediante la incorporación del análogo fluorescente BDP-MT*

Los promastigotes de *L. donovani* cepa MHOM/ET/67/L82 y su cepa resistente a miltefosina fueron proporcionados por el Prof Simon Croft (London School of Tropical Hygiene and Medicine, Londres, UK) y se cultivaron conforme a métodos habituales: 26°C en medio RPMI suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado, gentamicina, penicilina y 2 mM glutamina. La cepa resistente a MT se creció de forma idéntica a la parental sensible a MT, excepto por la adición de 40 μ M MT en el medio de crecimiento. Ambos tipos de parásitos se recogieron en fase estacionaria, se lavaron con medio RPMI 1640 carente de rojo fenol, y se incubaron en dicho medio durante 2 horas a 26°C a una densidad de 2 x 10⁶ parásitos/mL, al que se adicionó 7.5 μ M BDP-MT. A continuación se sometieron a tres lavados con dicho medio en presencia de BSA libre de ácidos grasos, a 10 mg/mL, y finalmente se detectaron *in vivo* en un microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS-UV, utilizando 488 nm como longitud de onda de excitación y 502-555 nm como entorno de lectura de la emisión.

Se puede observar en la Figura 2 que los parásitos de la cepa sensible muestran una intensa fluorescencia intracelular, mientras que los que proceden de la cepa resistente muestran una débil fluorescencia, debido a la escasa incorporación del análogo marcador BDP-MT.

Ejemplo 3

*Diagnóstico diferencial de parásitos oculares mediante BDP-MT*3.1.- Trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba castellanii*

Los trofozoítos y quistes de *A. castellanii* fueron proporcionados por la Dra Carmen del Águila, Universidad San Pablo CEU, Madrid. Los trofozoítos se crecieron en medio CDC suplementado con suero fetal bovino al 5% a 27°C, posteriormente se lavaron en dicho medio en ausencia de suero fetal bovino y se incubaron en el mismo medio durante 15 minutos a una densidad de 7×10^5 trofozoítos a 32°C con 5 μ M BDP-MT. Tras dicha incubación, se lavaron en el mismo medio con 10 mg/mL de BSA y se observaron *in vivo* en un microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS-UV, utilizando 488 nm como longitud de onda de excitación y 502-555 nm como entorno de lectura de la emisión.

Se puede observar en la Figura 3 que los trofozoítos de *A. castellanii*, que constituyen la forma metabólicamente activa del parásito, muestran un intenso marcado fluorescente intracelular debido a la elevada incorporación de BDP-MT. En el caso de los quistes, se observa en dicha figura que la tinción fluorescente se concentra en la superficie. Como este experimento se llevó a cabo con organismos vivos, existen pequeñas diferencias de posición entre las imágenes consecutivas de transmisión y de fluorescencia, debidas a la movilidad de los trofozoítos.

3.2.- Marcado fluorescente simultáneo de quistes y trofozoítos de *A. castellanii* e hifas de *Fusarium*

Las hifas del hongo *Fusarium* se mantuvieron en agarosa con medio de Saboroud. La expansión celular se realizó a 32°C en medio RPMI 1640 con antibióticos y sin suplementar con suero fetal bovino. Tras lavado, las hifas se resuspendieron durante 15 minutos a 32°C en idéntico medio sin rojo fenol y en presencia de BDP-MT 5 μ M. A continuación, se lavaron tres veces con BSA y se observaron *in vivo* en un microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS-UV, utilizando 488 nm como longitud de onda de excitación y 502-555 nm como entorno de lectura de la emisión. Las imágenes fluorescentes que se observan tras la incorporación de BDP-MT son muy diferentes para las tres formas, hifas, trofozoítos y quistes. En el caso de las hifas, se aprecia nítidamente su morfología alargada característica, mientras que en el caso de trofozoítos de *A. castellanii*, de tamaño considerablemente menor, se observan formas irregulares; en ambos casos se aprecia la incorporación intracelular del análogo fluorescente. En el caso de los quistes de *A. castellanii*, de forma esencialmente esférica, se observa el marcado fluorescente únicamente en la superficie del organismo, como ya se comentó en el ejemplo anterior.

Ejemplo 4

Diagnóstico de la presencia de microorganismos patógenos mediante el análogo fluorescente Et-BDP-MT

El método de marcado fluorescente de organismos patógenos demostrado más arriba, en el que se utilizaba el compuesto BDP-MT, puede llevarse a cabo también utilizando otros análogos, en los que, alterando la estructura del grupo fluorescente, se consigue que tanto la longitud de onda de excitación como la de emisión aparezcan en otras zonas diferentes del espectro visible. Para ilustrar esta extensión en el presente ejemplo se utiliza el análogo Et-BDP-MT, en el que tanto la excitación como la emisión ocurren a longitudes de onda desplazadas hacia el rojo, en comparación con las del análogo BDP-MT. Los tres paneles de la Figura 5 contienen ejemplos representativos de organismos teñidos con Et-BDP-MT, y allí se muestran trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* (A), quistes de *Acanthamoeba castellanii* (B), e hifas de *Fusarium* (C). En todos los casos los microorganismos se marcaron manteniéndolos en presencia del análogo Et-BDP-MT, 5 μ M, durante 30 minutos. A continuación se lavaron con medio conteniendo BSA 10 mg/mL y se fotografiaron utilizando una Cámara CCD Digital Leica DFC350FX acoplada a un microscopio Zeiss de epifluorescencia, con un filtro de emisión de 480-520 nm.

En todos los casos se observa un patrón de fluorescencia muy similar al obtenido para BDP-MT; los trofozoítos de *A. castellanii* con marcado intracelular, los quistes del mismo microorganismo no dañados con marcado tenue superficial, y marcado de hifas de *Fusarium*, lo que demuestra que los datos obtenidos para BDP-MT son fácilmente extrapolables a otros compuestos estructuralmente similares.

Ejemplo 5

Marcado fluorescente del protozoo de vida libre Tetrahymena con BDP-MT

Células del protozoo *Tetrahymena pyriformis* se multiplicaron en el medio Proteasa Peptona Glucosa Medium, y se recogieron por centrifugación a una densidad de 10^4 células/mL. A continuación se incubaron con BDP-MT 5 μ M durante 4 h, se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 2% durante 30 minutos y se observaron con un microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS-UV, utilizando 488 nm como longitud de onda de excitación y 502-555 nm como entorno de lectura de la emisión.

Como puede observarse en la Figura 6, el microorganismo incorpora una gran cantidad de compuesto fluorescente, lo que permite su identificación y localización, incluso a concentraciones celulares muy bajas.

REIVINDICACIONES

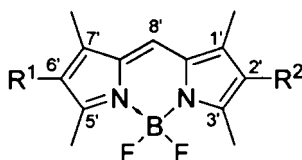
1. Compuesto fluorescente útil para la identificación diferencial de microorganismos **caracterizado** porque comprende un derivado de alquifosfolípido y un grupo fluorescente de elevada fotoestabilidad que emite en la zona de longitudes de onda del espectro visible.

2. Compuesto fluorescente según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el análogo de alquifosfolípido es la miltefosina (MT), edelfosina (EF) o ilmofofosina (IM).

3. Compuesto fluorescente según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el análogo de alquifosfolípido es un análogo de la miltefosina (MT), edelfosina (EF) o ilmofofosina (IM).

4. Compuesto fluorescente según reivindicación 1 **caracterizado** porque el grupo fluorescente es un grupo fluorescente de elevada fotoestabilidad que emite en la zona de longitudes de onda del espectro visible, entre los que se encuentran, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: borodipirrometenos, xantenos, rodaminas, cianinas, oxacinas, porfirinas, cumarinas e hidrocarburos policíclicos, con o sin sustituyentes.

5. Compuesto fluorescente según las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque el grupo fluorescente es borodipirrometeno (BDP) libre o sustituido **caracterizado** por la fórmula general:

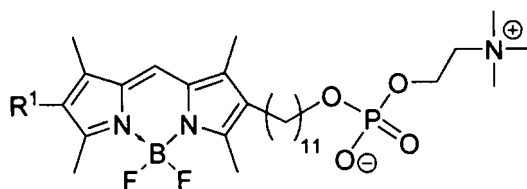


en donde:

$R^1 = H$, alquilo (lineal, no lineal, libre o sustituido), arilo o heteroarilo (libre o sustituido), y $R^2 =$ alquil-, alquenil- o alquilil-fosfolípido.

6. Compuesto fluorescente según reivindicación 5 **caracterizado** porque R^2 es un hidrógeno o un etilo.

7. Compuesto fluorescente según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque el análogo de alquifosfolípido es miltefosina y el grupo fluorescente es BDP libre o sustituido, **caracterizado** por la fórmula general:



en donde:

$R^1 = H$, alquilo (lineal, no lineal, libre o sustituido), arilo o heteroarilo (libre o sustituido).

8. Compuesto fluorescente según reivindicación 7 **caracterizado** porque R^1 es un hidrógeno (compuesto BDP-MT) o un radical etilo (compuesto Et-BDP-MT).

9. Procedimiento de obtención de un compuesto fluorescente **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

i) obtención del correspondiente α -H-pirrol sustituido a partir de un dicetoalcohol y acetoacetato de etilo,

ii) condensación del α -H-pirrol con el adecuado α -formilpirrol,

iii) reacción del dipirrometeno así formado con eterato de trifluoruro de boro,

iv) introducción del grupo fosfocolina.

10. Uso de un compuesto fluorescente según reivindicaciones 1 a 8 en la elaboración de una composición farmacéutica útil para un procedimiento de identificación de microorganismos.

11. Composición farmacéutica de diagnóstico **caracterizada** porque comprende un compuesto según reivindicaciones 1 a 8.

12. Composición farmacéutica de diagnóstico según la reivindicación 11 **caracterizada** porque comprende, al menos, uno de los siguientes compuestos: BDP-MT y Et-BDP-MT.

13. Uso de la composición farmacéutica de diagnóstico según las reivindicaciones 11 y 12 en un procedimiento de identificación de microorganismos.

14. Uso de la composición farmacéutica de diagnóstico según reivindicación 13 en un procedimiento de diagnóstico *ex vivo* a partir de muestras biológicas humanas o veterinarias de individuos portadores de enfermedades infecciosas pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: queratitis oculares, leishmaniasis, tripanosomiasis africana y americana, neumonía por *Streptococcus pneumoniae*, amebiasis, trichomoniasis y micosis.

15. Uso de la composición farmacéutica de diagnóstico según reivindicación 14 **caracterizado** porque la enfermedad infecciosa está provocada por un microorganismo perteneciente al siguiente grupo: *Leishmania sp*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas sp.*, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba sp.*, *Naegleria sp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Fusarium sp.*, *Tetrahymena pyriformis*, *Balamuthia*.

16. Uso de la composición farmacéutica de diagnóstico según reivindicación 14 en un procedimiento de diagnóstico sobre una muestra biológica de origen ocular, por ejemplo, obtenida por un raspado corneal.

17. Uso de la composición farmacéutica de diagnóstico según reivindicación 13 en un procedimiento de identificación de microorganismos en muestras no humanas ni animales, por ejemplo en aguas, prótesis oculares, lentes de contacto, líquidos de limpieza de lentes de contacto o medios de preservación de córneas.

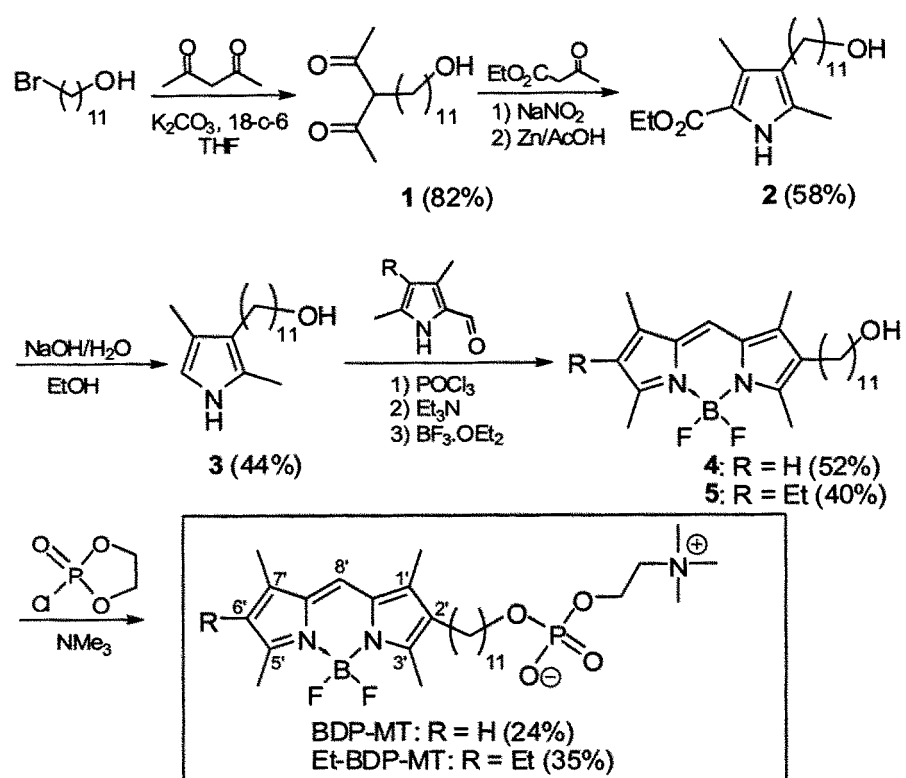


Figura 1

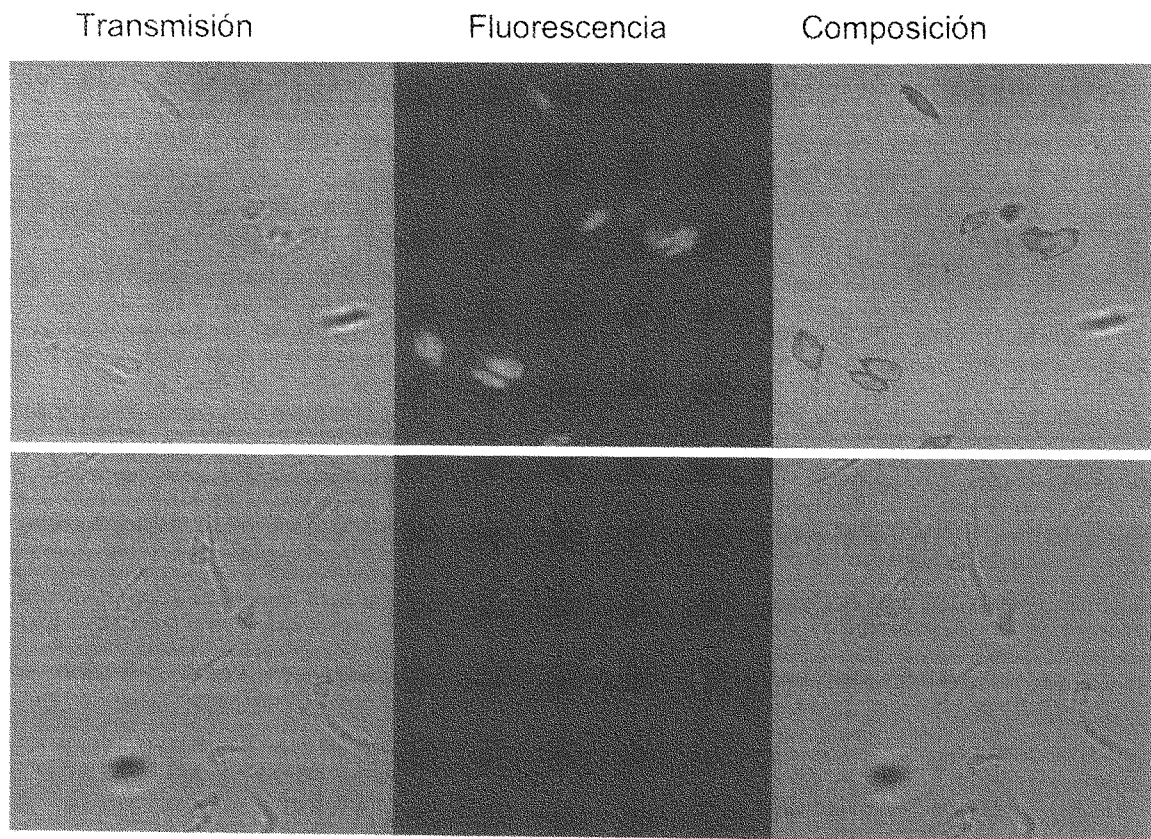


Figura 2

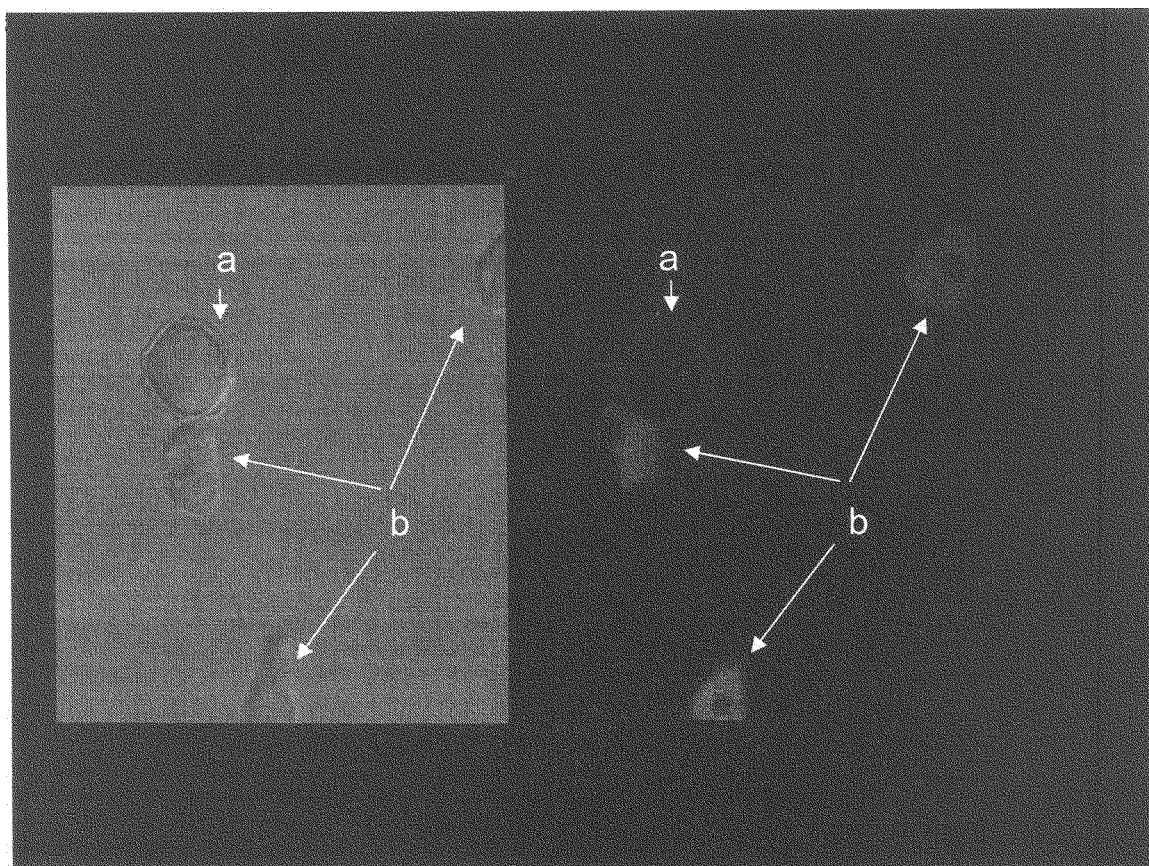


Figura 3

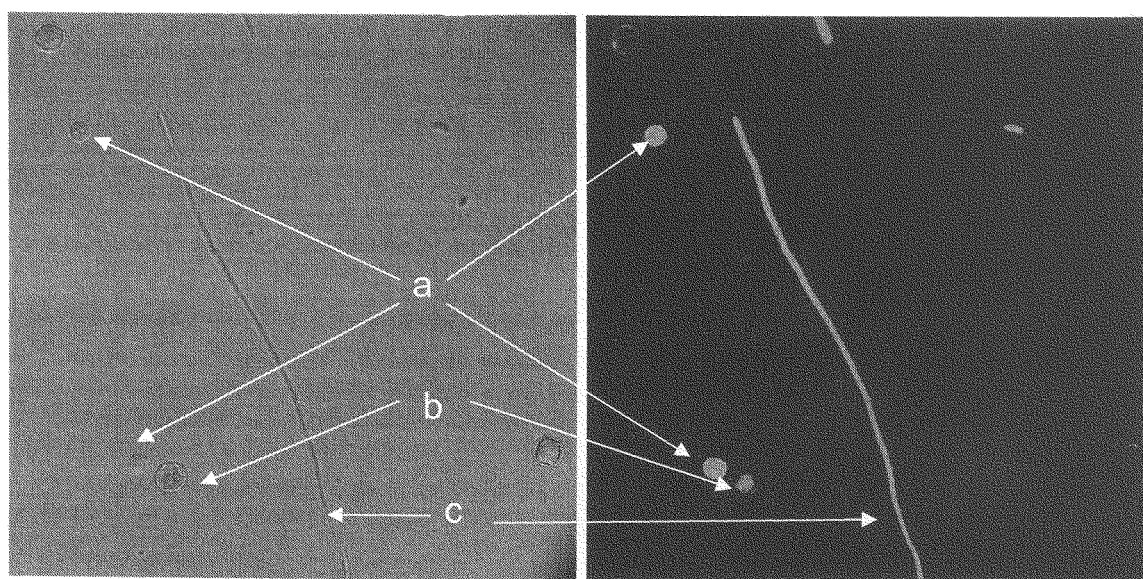


Figura 4

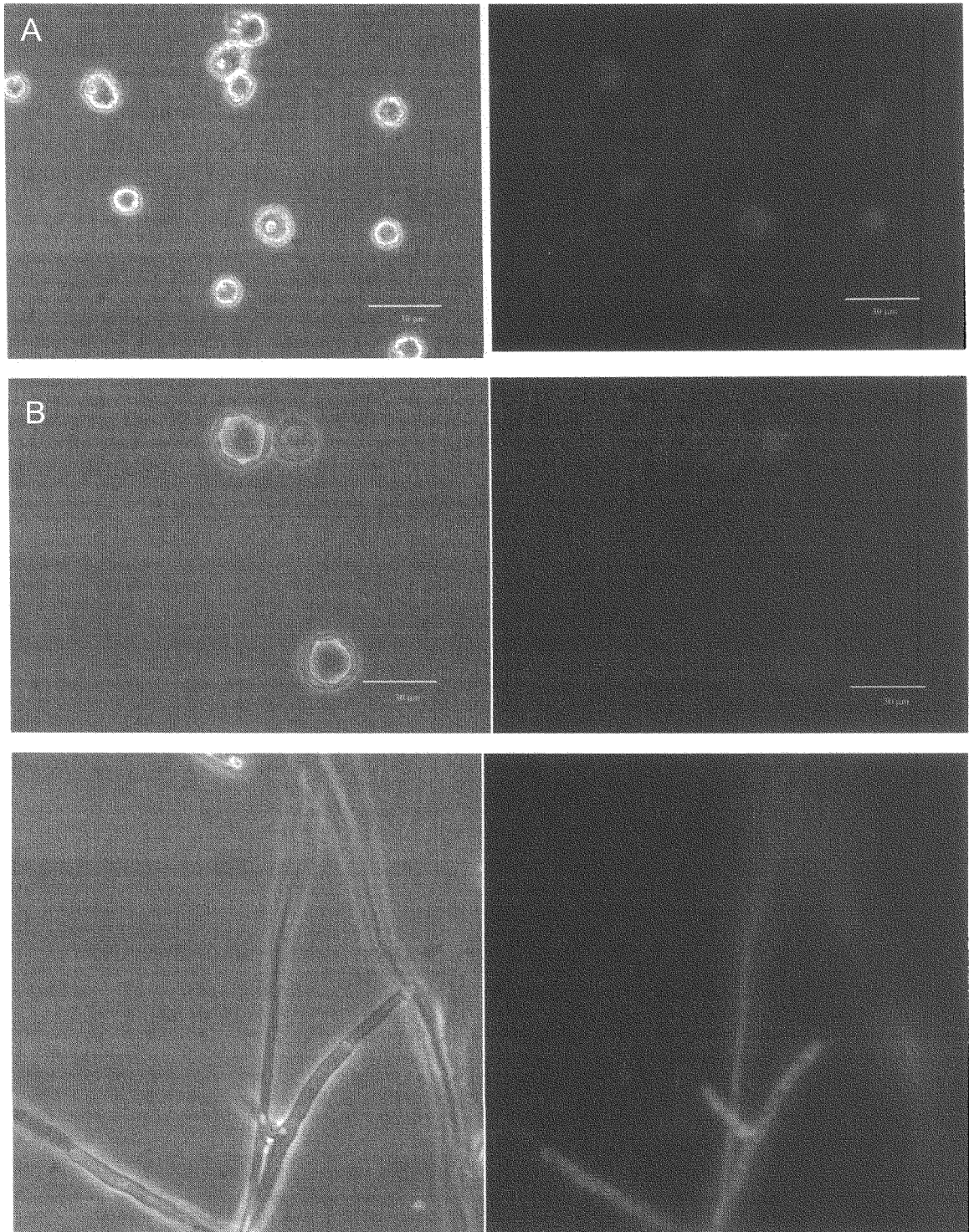


Figura 5

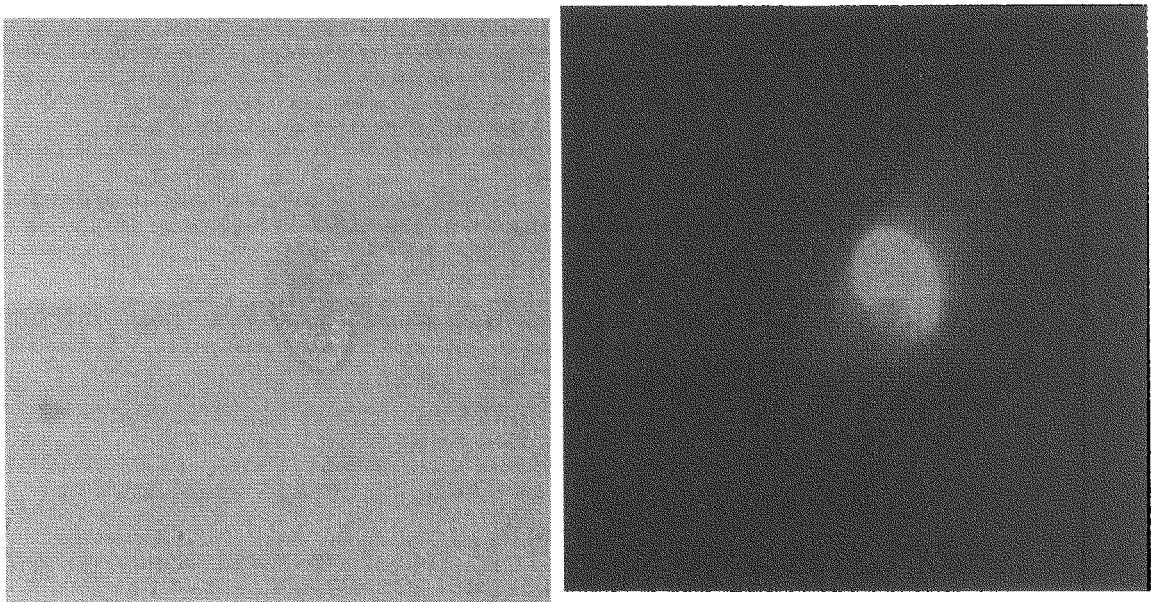


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 326 458

⑫ Nº de solicitud: 200800951

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **04.04.2008**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JOSE M. SAUGAR et al. Synthesis and biological evaluation of fluorescent leishmanicidal analogues of hexadecylphosphocholine (miltefosine) as probes of antiparasite mechanisms. J. Med. Chem 2007, vol, 50, páginas 5994-6003.	1-4,10,11, 13-17
A	US 4774339 A (HAUGLAND et al.) 27.09.1988, columna 1, líneas 15-35; columna 3, líneas 13-22; Tabla 1.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.09.2009

Examinador

S. González Peñalba

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C09K 11/06 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

A61K 31/69 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C09K, A61K, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.09.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	5-9, 12	SÍ
	Reivindicaciones	1-4, 11	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	5-9, 12	SÍ
	Reivindicaciones	1-4, 10, 11, 13-17	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Synthesis and biological evaluation	22-05-2007
D02	US4774339	27-09-1988

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente tal y como ha sido presentada se refiere a un compuesto fluorescente útil para la identificación diferencial de microorganismos caracterizado porque comprende un derivado de alquilfosfolípido tal como miltefosina, edelfosina o ilmofofosina y un grupo fluorescente tal como borodipirrometenos, xantenos, cianinas etc; al procedimiento para su obtención, al uso de dicho compuesto, a la composición que comprende el compuesto fluorescente y al uso de dicha composición.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 y 8 LP

El documento D01 hace referencia a la evaluación de compuestos análogos de miltefosina fluorescentes como sondas para conocer su mecanismos de acción en Leishmaniasis, y a la aplicación de estos análogos para estudios fármaco químicos y de diagnóstico de Leishmaniasis. Los compuestos análogos de miltefosina fluorescentes son el feniltetraeno miltefosina (PET-MT) y el feniltrienino miltefosina (PTRI-MT). Y hace referencia también al procedimiento de obtención de tales análogos.

El documento D02 se refiere a compuestos fluorescentes de borodipirrometeno que contienen grupos funcionales capaces de formar productos fluorescentes estables con otros grupos funcionales que se encuentren en biomoléculas o polímeros como son aminas, fenoles, tioles, ácidos, aldehidos y cetonas.

Por lo tanto, a la vista de lo divulgado en el documento D01, las reivindicaciones 1-4 referentes a compuestos fluorescentes que comprenden un derivado de alquilfosfolípido y un grupo fluorescente, siendo el derivado de alquilfosfolípido miltefosina, edelfosina o ilmofofosina y el grupo fluorescente borodipirrometeno, xanteno, etc, carecen de novedad por encontrarse recogido ese mismo tipo de compuesto en dicho documento.

En relación al uso del compuesto fluorescente para elaborar una composición farmacéutica útil para un procedimiento de diagnóstico de identificación de organismos (reivindicación 10), aunque no se ha encontrado en los documentos citados dicho uso, en el documento D01 se hace referencia a que la estabilidad metabólica y propiedades de emisión de los compuestos análogos de miltefosina fluorescentes son apropiados para visualizar su localización dentro de los parásitos vivos (Leishmaniasis) por microscopía confocal, por lo que resultaría obvio, tal y como está redactado, para un experto en la materia la utilización de los compuestos de la solicitud para el diagnóstico de Leishmaniasis. En consecuencia dicha reivindicación 10 carece de actividad inventiva. La reivindicación 11 referente a la composición farmacéutica tampoco tiene novedad, porque al ser conocido el compuesto alquil fosfolípido fluorescente (reivindicaciones 1-4), también lo sería una composición que incluye este compuesto. En cuanto al uso de dicha composición (reivindicaciones 13-17) en un procedimiento de diagnóstico tampoco tendría actividad inventiva por el mismo razonamiento dado para la reivindicación 11.