

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 025 759**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2016 PCT/EP2016/059864**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016 WO16177712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2016 E 16721767 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2025 EP 3292211**

54 Título: **Un método para el etiquetado específico de microorganismos vivos que comprende el uso de compuestos monosacáridos modificados**

30 Prioridad:

04.05.2015 EP 15166249

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

09.06.2025

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.33%)**

3, rue Michel Ange

75016 Paris, FR;

UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (33.33%) y

UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY (33.33%)

72 Inventor/es:

DUKAN, SAM;

VAUZEILLES, BORIS;

MAS PONS, JORDI y

BARON, AURÉLIE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 3 025 759 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

Un método para el etiquetado específico de microorganismos vivos que comprende el uso de compuestos monosacáridos modificados

5 La presente invención se refiere a un método para el etiquetado de microorganismos vivos en la incorporación de un residuo compuesto que porta un grupo reactivo en dichos microorganismos, preferiblemente en la superficie de los mismos, más particularmente en la envoltura de los mismos, especialmente cuando dichos microorganismos son bacterias.

10 El término "microorganismo vivo" comprende cualquier organismo unicelular capaz de multiplicarse bajo condiciones de cultivo, más particularmente microorganismos procariontes y eucariontes unicelulares.

15 Los microorganismos procariontes comprenden bacterias (también llamadas eubacterias), así como arqueas (también llamadas arqueobacterias).

Las bacterias comprenden bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas, así como las bacterias que no son gramnegativas ni grampositivas.

20 Los microorganismos eucariontes unicelulares comprenden hongos unicelulares (incluyendo en especial levaduras), amebas y protistas unicelulares.

La presente invención proporciona más particularmente un método que permite el etiquetado de microorganismos que comprenden bacterias, así como hongos unicelulares y amebas.

25 El término « envoltura » en el presente documento incluye cualquier pared, capa o membrana en la superficie del microorganismo, especialmente la pared celular del microorganismo, incluyendo la envoltura más particularmente la membrana plasmática interna y la capa de peptidoglicano para la bacteria, así como la membrana externa para bacterias gramnegativas.

30 Firoz & Emsp14; A; Jaipuri et al.: *Angewandte chemie international edition*, vol.47, no. 4, 18 de enero de 2008, páginas 1707-1710 y Reiko Sadamoto et al.: *Chemistry - A European Journal*, vol. 14, no. 33, 17 de noviembre de 2008, páginas 10192-10195 divulga análogos de manosa acilados y compuestos de glucosamino-6-fosfato, respectivamente, que son, por lo tanto, compuestos de piranosa.

35 El documento US2008/268468 describe principalmente compuestos de piranosa. El compuesto de furanosa divulgado difiere de los análogos reivindicados en el presente documento al tener una fracción Ac de un hidrógeno en la correspondiente posición 1. Además, este se usa para etiquetar y detectar *H. pylori* (bacteria gramnegativa) en muestras gástricas clínicas).

40 El documento WO 2013/107759 (y también el documento EP 2617833) divulga un método de etiquetado de bacterias vivas, más particularmente bacterias gramnegativas. El método consiste esencialmente en la incorporación en la membrana de dicha bacteria mediante asimilación de un compuesto monosacárido endógeno de tipo ácido ulosónico modificado de modo que porte una denominada primera función química reactiva como un grupo azida (-N₃) o alquino (-C≡CH), permitiendo de este modo una reacción del primer grupo reactivo con una molécula que porte el grupo reactivo complementario, especialmente a través de una denominada reacción de química click.

45 Más particularmente, en el documento WO 2013/107759 se ha divulgado que tales análogos modificados de azúcares endógenos que comprenden un residuo ácido ulosónico o ulosonato son particularmente ventajosos por que tales residuos se pueden encontrar en glicanos de la membrana bacteriana, especialmente LPS de todas las bacterias gramnegativas, y además se pueden asimilar directamente en la misma forma en la que se incorporarán en dichos glicanos de los LPS de bacterias gramnegativas.

50 Los ácidos ulosónicos (también llamados ácidos cetoaldónicos o ácidos aldulosónicos) son monosacáridos de la familia de la cetosa, que presentan una función cetona en C-2 y un ácido carboxílico en C-1. Los ácidos octulosónicos y nonulosónicos se encuentran en diversos glicanos naturales, incluyendo diferentes formas de glicanos bacterianos (especialmente LPS, polisacáridos capsulares, glicoproteínas). La vía biosintética que conduce a la elaboración de estos glicanos implica generalmente el ácido ulosónico libre como intermedio, que se activa entonces directamente en la forma de un donador de azúcar CMP. Todos los LPS de bacterias gramnegativas comprenden dichos residuos ulosonato.

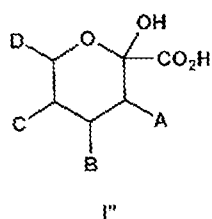
55 Más exactamente, el método divulgado en el documento WO 2013/107759 es un método para el etiquetado específico de bacterias vivas de una categoría dada de bacterias en una muestra que comprende bacterias, comprendiendo el método los pasos de:

65

5 a) incubación de dichas bacterias de dicha muestra con al menos un análogo de un compuesto monosacárido, siendo dicho monosacárido un residuo monosacárido endógeno de glicanos de la membrana exterior de tal categoría dada de bacterias, comprendiendo dicho monosacárido endógeno un residuo ácido ulosónico o sal de ulosonato, siendo dicho análogo de un monosacárido un monosacárido modificado sustituido a una posición dada por un primer grupo químico reactivo capaz de reaccionar con un segundo grupo reactivo de una molécula de etiquetado, y

10 b) puesta en contacto de dicha bacteria con dicha molécula de etiquetado que comprende dicho segundo grupo reactivo para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo de dicho residuo análogo incorporado dentro de dichos glicanos de la membrana exterior de dicha bacteria viva con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula de etiquetado.

15 Particularmente, en el documento WO 2013/107759, dicho monosacárido análogo es un ácido ulosónico sustituido que tiene una de las siguientes fórmulas (I'') o una sal de ulosonato del mismo:



en donde

- 20 • A, B y C pueden ser independientemente H, OH, NH₂, OH y NH₂, estando sustituidos o no por grupos protectores de los mismos, y
- D es una cadena de alquilo en C₂ a C₄, y
- 25 • al menos uno de los grupos A, B, C o D está sustituido por dicho primer grupo reactivo.

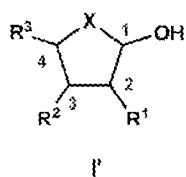
30 En el documento WO 2013/107759, dicho análogo de monosacárido incubado con la bacteria viva en el paso a) y después incorporado a su membrana externa después de asimilación por la bacteria puede ser idéntico al monosacárido endógeno incorporado en la cadena de glicanos de la membrana externa excepto que está modificado solo por sustitución de dicho primer grupo reactivo.

35 El objetivo de la presente invención era descubrir otros compuestos monosacáridos capaces de ser asimilados dentro de un amplio rango de microorganismos unicelulares, especialmente un rango más amplio de bacterias, y especialmente dentro de bacterias tanto gramnegativas como grampositivas, así como microorganismos eucariotas unicelulares, como hongos unicelulares, amebas y protistas unicelulares, y presentando ventajas y diferentes propiedades como su especificidad de incorporación con respecto a la categoría de microorganismo en cuestión.

40 Más exactamente, la presente invención proporciona un método para el etiquetado específico de microorganismos vivos en una muestra que comprende microorganismos, comprendiendo el método los pasos de:

45 a) incubación de dichos microorganismos de dicha muestra con al menos un compuesto monosacárido modificado que comprende un primer grupo químico reactivo capaz de reaccionar con un segundo grupo reactivo, de modo que un residuo que porta dicho primer grupo reactivo se incorpora en dichos microorganismos vivos, preferentemente en la superficie de dichos microorganismos, especialmente se incorpora en la envoltura de dicho microorganismo, y

50 b) puesta en contacto de dicho residuo en dicho microorganismo vivo con una molécula de etiquetado que comprende dicho segundo grupo reactivo para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo de dicho residuo incorporado en dicho microorganismo vivo con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula de etiquetado, dando lugar a un enlace covalente, caracterizado por que dicho compuesto monosacárido modificado tiene la siguiente fórmula (I'), o una sal del mismo:



- o X es O, y
- 5 o R1 es H, OH, NH₂, estando sustituidos o no OH y NH₂ por grupos protectores de los mismos seleccionados a partir del grupo formado por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo e imidoilo, y
- 10 o R2 es H, OH, NH₂, estando sustituidos o no OH y NH₂ por grupos protectores de los mismos seleccionados a partir del grupo formado por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo e imidoilo,
- 15 o R3 es una cadena de alquilo en C₁ a C₄, estando cada carbono sustituido o no sustituido por OH o NH₂ por grupos protectores seleccionados a partir del grupo formado por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, y
- o estando sustituido R3 por dicho primer grupo reactivo Ra; y
- 20 o siendo seleccionado dicho primer grupo reactivo Ra entre grupos formados por o que portan el grupo azido (-N₃) y grupos formados por o que portan el grupo alquino (-C≡C-), y siendo seleccionado dicho segundo grupo entre grupos formados por o que portan alquino y azido, respectivamente,

y en donde las bacterias de etiquetado son seleccionadas entre las siguientes especies de microorganismos:

- 25 a) bacterias: *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus paris*, *Bacillus subtilis*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas fluorescens Migula*, *Pseudomonas fluorescens Paris*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio cholera*, y
- b) hongos: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium* y *Geotrichum candidum*, y
- 35 c) amebas: *Acanthamoebae castellanii*.

En consecuencia, el compuesto de la fórmula I' definido anteriormente no comprende un grupo ácido carboxílico (-CO₂H) en la posición C-1 del ciclo de la fórmula I' al contrario que los compuestos de la fórmula I'' y correspondientemente a la fórmula II en equilibrio del documento WO 2013/ 107759.

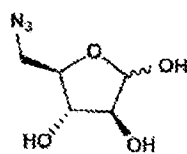
40 Por lo tanto, tal compuesto de la fórmula (I') puede ser asimilado por un amplio rango de categorías de microorganismos vivos.

45 Según la presente invención, los mecanismos precisos por los cuales dicho monosacárido modificado que porta dicho primer grupo reactivo es asimilado por el microorganismo en la incorporación de dicho residuo en el mismo no están completamente determinados.

50 Sin embargo, parece que dicho compuesto monosacárido puede ser diferente a los residuos monosacáridos endógenos de dicho microorganismo, especialmente diferentes de los residuos monosacáridos endógenos de la envoltura de dicho microorganismo y más particularmente, en el caso de bacterias gramnegativas, diferentes a los residuos monosacáridos endógenos de polisacáridos de la membrana externa de tales bacterias, como LPS o polisacáridos capsulares (CPS) de bacterias, y ser, sin embargo, capaz de penetrar e incorporarse en dicho microorganismo.

55 La expresión "residuo monosacárido endógeno" significa un residuo presente naturalmente en dichos microorganismos, especialmente en la envoltura de dichos microorganismos, más particularmente la envoltura de dichas bacterias.

Según la presente invención, al ser modificados por dicho primer grupo reactivo, dichos compuestos monosacáridos podrían comprender análogos de precursores de monosacáridos endógenos en la vía biosintética de los mismos en



Ia

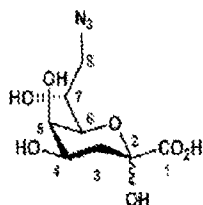
Más particularmente, el grupo protector para OH puede ser de modo preferente un grupo alquilo, hidroxialquilo, acilo o formilo.

Más particularmente, los grupos protectores para NH₂ se pueden seleccionar entre grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo.

NH₂ puede estar protegido por uno o dos grupos protectores, especialmente un grupo CH₃ y un grupo alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, especialmente un grupo acetilo (Ac), acetimidoilo (Am), N-metil-acetimidoilo, N,N-dimetil-acetimidoilo, formilo (Fo) hidroxibutanoilo.

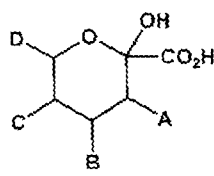
Dicho residuo monosacárido de dicho compuesto monosacárido modificado (Ia) es un análogo de arabinosa del precursor natural arabinosa 5-P (A5P), siendo este último un precursor del residuo monosacárido endógeno denominado Kdo (I-1') en la vía biosintética del mismo en un gran número de bacterias, como se muestra en la vía de la figura 1B del documento WO 2013/107759. En la vía biosintética de Kdo en bacterias en donde la arabinosa-5-P se convierte en Kdo-8-P, que pasa a ser Kdo, la enzima Kdo-8-fosfato (Kdo-8-P) sintasa convierte arabinosa-5-fosfato en Kdo-8-P y la enzima Kdo-8-P fosfatasa convierte el grupo OPO₃²⁻ de Kdo-8-P en hidróxido (OH) para producir Kdo.

Por lo tanto, es probable que el compuesto (Ia) se convierta en un Kdo-N₃ endógeno modificado de la siguiente fórmula (I-1):



I-1

Más generalmente, los compuestos de la fórmula (I) y (I') podrían ser análogos de los precursores de compuestos endógenos de la fórmula (I'') de la membrana externa de bacterias, como se divulga en el documento WO 2013/107759:



I''

Según la representación convencional de la fórmula, los átomos de carbono en las posiciones C-1 a C-n de los diversos ciclos anteriores y sustituyentes H unidos a estos átomos no están representados.

Dicha reacción química entre dichos primer y segundo grupos reactivos da como resultado un enlace covalente que en pocos ejemplos puede ser un enlace de coordinación covalente en un complejo metálico coordinado con ligandos.

Dicho primer grupo reactivo Ra se selecciona entre grupos formados por o que portan el grupo azido (-N₃) y grupos formados por o que portan el grupo alquino (-C≡C-), siendo dicho primer grupo reactivo preferentemente el grupo azido, y seleccionándose dicho segundo grupo reactivo entre grupos formados por o que portan respectivamente los grupos alquino y azido, siendo dicho segundo grupo reactivo preferentemente el grupo alquino, y llevándose a cabo la reacción de dicho grupo reactivo azido con dicho grupo reactivo alquino en la realización de una cicloadición azida alquino.

Más preferentemente, Ra es -N₃ o -C≡CH, preferentemente -N₃.

5 El compuesto de la fórmula (I) y (I') se puede utilizar para etiquetar microorganismos vivos como se menciona anteriormente.

Más particularmente, el compuesto de la fórmula (I) y (I') se puede utilizar para etiquetar todas las clases de bacterias, incluyendo bacterias gramnegativas o positivas, así como hongos unicelulares.

10 Más particularmente, los compuestos de la fórmula (I) y (I') se pueden utilizar para etiquetar bacterias gramnegativas, así como grampositivas, que se seleccionan entre las bacterias especificadas en la reivindicación 1.

15 Entre las bacterias gramnegativas que pueden asimilar compuestos de la fórmula (I) y (I'), preferentemente (Ia), se pueden citar las siguientes especies: *Acinetobacter baumannii*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Providentia stuartii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae*

20 Más particularmente, entre las bacterias grampositivas que pueden asimilar compuestos de la fórmula (I) y (I'), preferentemente (Ia), se pueden citar las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*.

25 Más particularmente, dicho compuesto de la fórmula (I) y (I'), preferentemente (Ia) se puede asimilar especialmente en las siguientes especies de hongos y levaduras: *Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Geotrichum candidum* y las siguientes especies de amebas *Acanthamoeba castellanii*.

30 Entre los anteriores microorganismos, las siguientes bacterias no asimilaron Kdo-N₃ (I-1') del documento WO 2013/107759: *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, ni los siguientes hongos: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium*, *Geotrichum candidum* ni la ameba *Acanthamoeba castellanii*.

35 Más particularmente, el tiempo de incubación en el paso a) dependerá del tiempo de duplicación del microorganismo, siendo el tiempo de incubación más particularmente de 1 h a 72 h, más particularmente de 1 h a 36 h, y siendo la concentración de compuesto monosacárido modificado de 10⁻⁵ M a 1 M, para detectar una concentración de microorganismo preferentemente de no más de 10¹¹ célula/ml, más particularmente no más de 10⁹ célula/ml.

40 Dado que la mayoría de regulaciones sanitarias se refieren a la numeración de microorganismos capaces de multiplicarse, especialmente capaces de multiplicarse en un medio de crecimiento sólido o líquido, ventajosamente, la presente invención proporciona más en particular un método para el etiquetado específico de microorganismos capaces de multiplicarse, en donde dichos microorganismos se incuban en un medio de cultivo en (medio líquido) o en (medio sólido), en el que dichos microorganismos son capaces de multiplicarse.

45 Entre los microorganismos mencionados anteriormente se esconden patógenos graves y el rápido etiquetado y/o la detección de microorganismos vivos representa un reto sanitario importante. Los monosacáridos modificados de la presente invención se asimilan rápidamente por los microorganismos y permiten el etiquetado rápido y la detección de los mismos, durando el proceso total menos de un día, de microorganismos vivos de tipo salvaje. El método es muy rápido en comparación con la detección usual de microorganismos vivos, que requiere normalmente entre 2 días y más de un mes, dependiendo de la cepa de microorganismo.

50 Ventajosamente, la presente invención comprende además el paso (c) de detección del microorganismo vivo al detectar si dicho microorganismo comprende dicha molécula de etiquetado unida a dicho microorganismo vivo y/o inmoviliza dicho microorganismo vivo que porta dicha molécula de etiquetado en un sustrato sólido, en donde dicha molécula de etiquetado es una molécula que comprende una sustancia detectable o capaz de reaccionar o unirse a una sustancia detectable o dicha molécula de etiquetado una primera molécula que porta dicho segundo grupo reactivo, siendo capaz dicha primera molécula de reaccionar o unirse a una segunda molécula y/o a un sustrato sólido, comprendiendo dicha segunda molécula preferentemente una sustancia detectable y/o estando unida o siendo capaz de unirse dicha segunda molécula a dicho sustrato sólido.

60 En consecuencia, la presente invención permite (a) el etiquetado del microorganismo vivo, así como (b) la numeración o detección del microorganismo vivo, así como (c) la concentración y/o el aislamiento del microorganismo vivo inmovilizado en un soporte sólido; especialmente con un soporte sólido constituido por perlas magnéticas que portan dicho grupo reactivo.

Más particularmente, dicha molécula de etiquetado es una molécula detectable que comprende una sustancia detectable, comprendiendo el método el paso c) de detección del microorganismo vivo al detectar si dicho microorganismo comprende dicha molécula detectable unida a dicho microorganismo.

5 Dicho paso de detección c) se puede llevar a cabo en un medio líquido o en un sustrato sólido.

Más particularmente, dicha molécula de etiquetado puede ser una molécula detectable, es decir, una molécula formada por o que porta una sustancia detectable, es decir, una sustancia capaz de ser detectada mediante técnicas conocidas en la materia, como fluorescencia, colorimetría o luminiscencia.

10 Más particularmente, dicha molécula de etiquetado es un primer ligando o una primera proteína que porta dicho segundo grupo reactivo y en el paso c) dicho microorganismo vivo acoplado a dicho primer ligando o dicha primera proteína de unión se detecta y/o se inmoviliza mediante puesta en contacto de dicho primer ligando o dicha primera proteína de unión con un segundo ligando o una segunda proteína de unión o mediante unión específica de dicho primer ligando o dicha primera proteína de unión.

Más particularmente, dicha molécula de etiquetado es un primer ligando, preferentemente biotina, que porta un segundo grupo reactivo y en el paso c) dicho microorganismo vivo acoplado a dicho primer ligando se detecta mediante reacción de dicho microorganismo con un anticuerpo u otra proteína específica de dicho primer ligando, dicho anticuerpo que porta una sustancia detectable, preferentemente un fluorocromo o una molécula luminiscente o una enzima.

20 La presente invención proporciona también un kit para llevar a cabo el método de la presente invención, que comprende:

- 25 • dicho compuesto monosacárido modificado de la fórmula (I) y
- dicha molécula de etiquetado que comprende dicho segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con dicho primer grupo reactivo, y
- 30 • si es necesario, reactivos para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula de etiquetado, y
- preferentemente un medio de cultivo o incubación que permite el crecimiento de dicho microorganismo, de modo preferente específicamente para el crecimiento de dicho microorganismo.

Dicho primer grupo reactivo Ra se selecciona entre grupos formados por o que portan el grupo azido (-N₃) y grupos formados por o que portan el grupo alquino (-C≡C-), y seleccionándose dicho segundo grupo reactivo Rb entre grupos formados por o que portan respectivamente los grupos alquino (-C≡C-) y azido (-N₃), y llevándose a cabo la reacción de dicho grupo reactivo azido con dicho grupo reactivo alquino (-C≡C-) en la realización de una cicloadición azida alquino.

45 Una cicloadición azida alquino es una reacción de química click bien conocida en presencia o no de un catalizador de cobre, en donde el grupo azida reacciona con el grupo alquino para proporcionar un triazol. Más particularmente, la reacción se puede llevar a cabo en condiciones catalizadas por cobre en presencia de un ligando tris-triazolilo, preferentemente TGTA. Más particularmente, la molécula detectable es un fluorocromo que porta un grupo alquino terminal.

Más particularmente, la reacción se puede llevar a cabo en presencia de un ligando triazol como TGTA (tris((1-(β-D-glucopiranosil)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-il)metil)amina) o TBTA (tris-[(1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina) y una molécula de etiquetado Alexa que porta un grupo alquino terminal con un catalizador para realizar una cicloadición azida alquino de dicho fluorocromo y dicho compuesto análogo de la fórmula (I).

55 Otros ligandos apropiados utilizados frecuentemente son: tris(3-hidroxiopropiltriazolilmetil)amine (THPTA), ácido 2-(4-((bis((1-terc-butil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etano sulfónico (BTTES), tris((1-((*O*-etil)carboximetil)-(1,2,3-triazol-4-il))metil)amina, disulfonato de batofenantrolina o tris(2-bencimidazolilmetil)aminas.

Alternativamente, la cicloadición azida alquino se puede realizar en ausencia de cobre si se utiliza un alquino tenso, como azadibenzociclooctino (ADIBO, DIBAC o DBCO) o tetrametoxidibenzociclooctino (TMDIBO).

60 En la lista de grupos implicados en las reacciones mencionada anteriormente, el primer grupo reactivo y el segundo grupo reactivo se pueden permutar. Todas las reacciones químicas mencionadas anteriormente dan como resultado un enlace covalente.

Se puede obtener otra especificidad de detección en la incubación de la muestra de microorganismos con dos compuestos monosacáridos modificados diferentes y dos moléculas detectables diferentes.

5 En otra realización particular del método de la presente invención, dicha incubación del paso a) y la reacción del paso b) se llevan a cabo en un filtro de membrana, de modo que el microorganismo cultivado que emana de un mismo microorganismo original que se ha multiplicado se agrupa y se puede visualizar con un microscopio y dicha molécula detectable se puede detectar mediante visualización con dicho microscopio. Por lo tanto, el número de microorganismos cultivables se puede cuantificar.

10 Esta realización permite filtrar la muestra probada en dicho filtro de membrana, como una membrana de poliéster, antes de la asimilación de dicho monosacárido modificado para evitar la sobreestimación del microorganismo vivo debido al posible crecimiento durante el periodo de asimilación. De hecho, cuando las células fijadas en la parte superior de dicha membrana comienzan a crecer, permanecen juntas y forman una microcolonia que se puede detectar fácilmente como procedente de la misma célula única. Por lo tanto, esto permite numerar el microorganismo cultivable mediante recuento.

La presente invención también proporciona un kit para llevar a cabo el método de la invención, que comprende además un medio de cultivo o incubación que permite el crecimiento de dicho microorganismo.

20 Preferentemente, dicho medio de cultivo o incubación comprende además agentes que potencian y/o aceleran la velocidad de crecimiento y/o la capacidad de formar colonias de dicha categoría dada de microorganismos. Más particularmente, el medio de incubación comprende al menos un agente antioxidante como piruvato o catalasa.

Más particularmente, en una realización, el kit comprende además:

- 25
- dicha molécula detectable o dicha segunda molécula que porta una sustancia detectable que comprende un fluorocromo o una molécula luminiscente o una enzima, y/o
 - un sustrato sólido que porta dicha segunda molécula capaz de reaccionar específicamente o unirse a dicha molécula de etiquetado.
- 30

Más particularmente, en una realización, el kit de la presente invención comprende además:

- 35
- dicha molécula detectable que comprende dicho segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con dicho primer grupo reactivo, y
 - un medio sólido que permite la visualización del microorganismo después de la incubación con dicho compuesto monosacárido modificado, dichos reactivos y dicha molécula detectable.
- 40

De nuevo más particularmente, el kit comprende:

- 45
- dicho compuesto monosacárido modificado sustituido por dicho primer grupo reactivo que comprende un grupo azido o alquino, y
- dicho segundo grupo reactivo de la molécula detectable que porta un grupo alquino o, respectivamente, azido, y
- posiblemente dichos reactivos que comprenden un catalizador de cobre y un ligando trisriazolilo. En una primera realización particular, dicha molécula de etiquetado puede ser una molécula detectable, es decir, una molécula formada por o que porta una sustancia detectable, es decir, una sustancia capaz de ser detectada como un fluorocromo o una sustancia luminiscente o una enzima como peroxidasa, siendo detectada dicha enzima más particularmente después de reaccionar con un correactivo.
- 50

55 En otra realización particular, útil para aislar y/o concentrar el microorganismo vivo, dicha molécula de etiquetado se puede unir a un sustrato sólido al llevar a cabo el paso b).

60 En otra realización particular, dicha molécula de etiquetado es una molécula que es un primer ligando o una primera proteína que porta dicho segundo grupo reactivo y en el paso c) dicho microorganismo vivo acoplado a dicho primer ligando o dicha primera proteína de unión se detecta y/o se inmoviliza mediante puesta en contacto de dicho primer ligando o dicha primera proteína de unión con una segunda molécula que es un segundo ligando o una segunda proteína de unión o mediante unión específica de dicho primer ligando o dicha primera proteína de unión.

65 Entonces, ventajosamente, dicho primer o segundo ligando o proteína de unión puede reaccionar o unirse a una tercera proteína de unión que porta dicha sustancia detectable como un fluorocromo o una sustancia luminiscente o

una enzima como peroxidasa, uniéndose dicha tercera proteína de unión específicamente a dicho primer y/o segundo ligando o proteína de unión. La detección de dicha sustancia detectable a través de un segundo ligando o una segunda proteína de unión o tercera proteína de unión permite amplificar la señal de dicha sustancia detectable.

5 Más particularmente, el primer ligando o la primera proteína de unión puede ser:

- biotina, siendo entonces dicha segunda proteína de unión avidina o estreptavidina y siendo dicha tercera proteína de unión un anticuerpo cultivado contra biotina, o
- 10 • avidina o estreptavidina, siendo entonces dicha segunda proteína de unión a ligando biotina y siendo dicha tercera proteína de unión un anticuerpo cultivado contra avidina o estreptavidina, o
- un primer anticuerpo, siendo entonces dicha segunda proteína de unión un segundo anticuerpo específico para dicho primer anticuerpo y siendo dicha tercera proteína de unión un tercer anticuerpo específico para dicho primer anticuerpo.

Más particularmente, dicha molécula de etiquetado es un primer ligando, preferentemente biotina, que porta un segundo grupo reactivo y en el paso c) dicho microorganismo vivo acoplado a dicho primer ligando se detecta mediante reacción de dicho microorganismo con un anticuerpo específico de dicho primer ligando, dicho anticuerpo que porta una sustancia detectable, preferentemente un fluorocromo o una molécula luminiscente o una enzima.

Más particularmente, dicha molécula de etiquetado es un primer ligando, preferentemente biotina, que porta dicho segundo grupo reactivo, y en el paso c) dicho microorganismo vivo acoplado a dicha primera proteína de unión se inmoviliza mediante reacción de dicho primer ligando con un sustrato sólido, preferentemente perlas magnéticas, acoplado a dicha segunda proteína de unión, preferentemente avidina o estreptavidina, antes de detectar dicho microorganismo vivo mediante amplificación enzimática de ADN bacteriano o mediante reacción de dichas bacterias con una tercera proteína de unión que reacciona o se une específicamente a dicho primer ligando o segunda proteína de unión, portando dicha tercera proteína de unión una sustancia detectable, preferentemente un fluorocromo o una molécula luminiscente o una enzima, siendo dicha tercera proteína de unión preferentemente un anticuerpo específico para dicho primer ligando o primera proteína de unión.

En una realización, más particularmente, la molécula de etiquetado puede ser una enzima que porta el segundo grupo reactivo como una peroxidasa de rábano picante (HRP) o una enzima ureasa.

35 Tal realización, en donde dichos microorganismos vivos están inmovilizados sobre dicho sustrato sólido, permite concentrar la muestra en dicho microorganismo y cuantificar dicho microorganismo vivo mediante cualquier método conocido, incluyendo amplificación enzimática de ADN, como PCR, especialmente PCR en tiempo real, o un método que implique una reacción inmunológica con un anticuerpo marcado, como una prueba ELISA.

40 Otras características y ventajas de la presente invención serán más evidentes a la luz de la siguiente descripción detallada y los ejemplos de realizaciones ilustrativas y no limitantes.

Ejemplo 1: síntesis de compuesto (Ia): Ara-N3.

45 En la síntesis se han utilizado los siguientes reactivos y condiciones: (i) TsCl, piridina. (ii) piridina, Ac₂O. (iii) NaN₃, DMF. (iv) CH₃ONa, CH₃OH. Se realizó cromatografía de capa fina sobre Merck 60 F254 con detección mediante UV, y/o mediante carbonización con disoluciones de ácido sulfúrico o KMnO₄ o ácido fosfomolibdico. Se utilizó gel de sílice 60 40-63 μm para la cromatografía en columna flash.

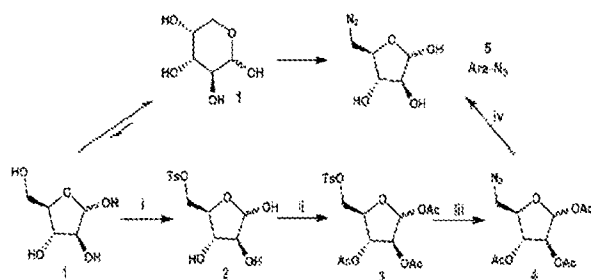
50 Se tomaron espectros de NMR en espectrómetros Bruker Avance 300 o 500 MHz utilizando el disolvente protonado residual como patrón interno. Los desplazamientos químicos δ se indican en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento se presentan como hercios (Hz). Los patrones de división se designan como singlete (s), doblete (d), triplete (t), doblete de doblete (dd), doblete de doblete de doblete (ddd). Los patrones de división que no se han podido interpretar o visualizar fácilmente se designan como multiplete (m).

55 Los espectros de masas se tomaron en un Thermo Scientific TSQ o en un Bruker micrOTOFq o en un Waters LCT Premier XE (ToF), con ionización por electropulverización en el modo de detección positivo (ESI+).

Los espectros IR-FT se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum 100.

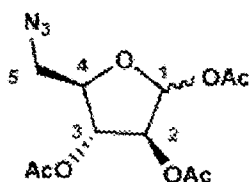
60 Las absorciones características se presentan en cm⁻¹. Las rotaciones ópticas específicas se midieron a 20°C con un polarímetro Anton Paar MCP 300 en una célula de 10-cm a 20°C y 589 nm.

65 El compuesto (Ia) era el compuesto (5) en el siguiente esquema 1 que muestra los diversos compuestos implicados en los pasos de síntesis del mismo.



5 Los reactivos y las condiciones en los diversos pasos son: (i) TsCl (1,1 eq.), piridina (1,0 M), 100°C -> r. t., 18h. (ii) piridina/Ac₂O (2:1, 0,7 M), 18h. (iii) NaN₃ (2,0 eq.), DMF (0,4 M), 80°C, 20h, 15 % a través de 3 pasos. (iv) CH₃ONa (0,1 eq.), CH₃OH (0,2 M), r. t., 3h, 99 %

1) Preparación de 5-azido-5-desoxi-1,2,3-tri-O-acetil-D-arabinofuranosa (4):



10 Se calentó D-arabinosa comercial (1) (6,00 g, 40 mmol) a 100°C durante 2 horas en piridina (40 mL). Se dejó enfriar la disolución, se trató adicionalmente con cloruro de tosilo (8,38 g, 44 mmol, 1,1 equiv.) y se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente (2), no aislado). Después se añadió anhídrido acético (20 mL). Tras acetilación completa, como se determina por TLC, los disolventes se evaporaron y las trazas residuales se coevaporaron varias veces con tolueno (3), no se aislaron). El residuo se disolvió en DMF (100 mL), se añadió azida de sodio (5,20 g, 80 mmol, 2,0 eq.) y se calentó la suspensión a 80°C durante 20 horas. Tras dilución con acetato de etilo y lavado con agua, la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (éter de petróleo/acetato de etilo 7:3). Se determinó que el primer producto eluido era la esperada 5-azido-1,2,3-tri-O-acetil-D-arabinofuranosa (4) (1,83 g, 15 %, α/β ~ 2:1).

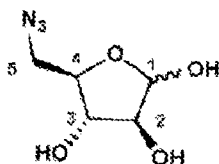
15 ¹H-RMN (360 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6,41 (d, 0,33H, *J*_{1,2} 3,5 Hz, H-1 β); 6,23 (d, 0,67H, *J*_{1,2} ~1 Hz, H-1α); 5,40-5,37 (m, 1,34H, H-2β, H-3β); 5,23 (d, 0,67H, *J*_{1,2} ~Hz, H-2α); 5,06 (d, 0,67H, *J*_{3,4} 4,6 Hz, H-3α); 4,30 (ddd, 0,67H, H-4α); 4,16-4,10 (m, 0,33H, H-4β); 3,69 (dd, 0,67H, *J*_{5a,5b} 13,5, *J*_{4,5a} 3,1 Hz, H-5aα); 3,61 (dd, 0,33H, *J*_{5a,5b} 13,1, *J*_{5a,5b} 13,1, *J*_{5a,5b} 13,1, Asa 3,6 Hz, H-Sa); 3,51-3,43 (m, 1H, H-Sba, H-Sb); 2,15, 2,13, 2,12, 2,11, 2,11, 2,09 (6s, 18H, 6 CH₃CO).

25 ¹³C-RMN (62,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,3, 170,0, 169,1 (3 C=O); 99,2 (C-1α); 93,5 (C-1β); 84,1 (C-4α); 80,8 (C-4β); 80,6 (C-3α); 77,4 (C-2α); 75,1 (C-2β); 74,8 (C-3β); 53,0 (C-5β); 51,3 (C-5α); 20,9, 20,6, 20,3 (3 CH₃).

30 LRMS (ESI+): [M+H]⁺ 324,0.

HRMS (ESI+): [M+H]⁺ (C₁₁H₁₃N₃NaO₇) Calc. m/z: 324,0802, hallado: 324,0802.

2) Preparación de 5-azido-5-desoxi-D-arabinofuranosa (5):



35 La 5-azido-1,2,3-tri-O-acetil-D-arabinosa protegida (4) se disolvió entonces en metanol anhidro (30 mL), se trató con una disolución metanólica de CH₃ONa (0,2 mol.L⁻¹, 3 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas bajo una atmósfera de argón. Tras neutralización (Dowex® 50 (H⁺)), filtración y concentración se obtuvo 5-azido-5-desoxi-D-arabinofuranosa (5) en un rendimiento de 99 % (1,03 g).

Rf (diclorometano/metanol 92:8): 0,28.

45 IR (cm⁻¹): 3367, 2106, 1281, 1040.

HRMS (ESI⁺): [M+H-N₂]⁺ (C₃H₁₀NO₄) Calc. m/z: 148,0604, hallado: 148,0610.

Anómero alfa (5α):

5 ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ(ppm): 5,24 (d, 1H, J_{1,2} 2,9 Hz, H-1); 4,17 (ddd, 1H, J_{3,4} 6,4, J_{4,5b} 5,8, J_{4,5a} 3,5 Hz, H-4); 4,01 (dd, 1H, J_{2,3} 4,6, J_{1,2} 2,9 Hz, H-2); 3,97 (dd, 1H, J_{3,4} 6,4, J_{3,2} 4,6 Hz, H-3); 3,64 (dd, 1H, J_{3a,3b} 13,6, J_{4,5a} 3,5 Hz, H-5a); 3,44 (dd, 1H, J_{5a,5b} 13,6, J_{4,5b} 5,8 Hz, H-5b).

10 ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ (ppm): 101,0 (C-1); 81,3 (C-4); 81,2 (C-2); 76,3 (C-3); 51,5 (C-5).

Anómero beta (5β):

15 ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 5,28 (a d, 1H, J_{1,2} 3,1 Hz, H-1); 4,10-4,05 (m, 2H, H-2, H-3); 3,89 (ddd, 1H, J_{3,4} 7,1, J_{4,5b} 6,5, J_{4,5a} 3,5 Hz, H-4); 3,59 (dd, 1H, J_{5a,5b} 13,3, J_{4,5a} 3,5 Hz, H-5a); 3,42 (dd, 1H, J_{5a,5b} 13,3, J_{4,3b} 6,5 Hz, H-5b).

15 ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ (ppm): 95,2 (C-1); 79,6 (C-4); 75,8 (C-2); 74,7 (C-3); 52,6 (C-5).

20 Ejemplo 2: Comparación del etiquetado de microorganismos vivos con compuestos Ara-N₃ (Ia) de la presente invención y el compuesto Kdo-N₃ (I-1) del estado de la técnica.

1) Material y métodos.

1.1) Cepas de microorganismo y condiciones de crecimiento.

25 Las cepas de bacterias y hongos enumeradas en las Tablas 1 y 3 se cultivan en los medios de cultivo y las condiciones enumeradas en las Tablas 1 y 2. Todas las cepas se cultivaron en un agitador rotatorio (160 rpm) a 30 o 37°C.

Tabla 1:

Microorganismos	REFERENCES	Condiciones de crecimiento
BACTERIAS		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 17978	LB-24H-37°C
<i>Bacillus cereus</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Bacillus cereus</i>	CIP 66.24T	TSB-24H-37°C
<i>Bacillus cereus paris</i>	Cepa de laboratorio (equipo N. HENRY / CNRS)	TSB-24H-30°C
<i>Bacillus subtilis</i>	Cepa de laboratorio (equipo GUISEPPI LCB/CNRS)	LB-24H-37°C
<i>Cronobacter sakazakii</i>	CIP 103183T	TSB-24H-37°C
<i>Enterococcus durans</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Escherichia coli K12</i>	MG1655	LB-24H-37°C
<i>Escherichia coli 086</i>	Cepa de laboratorio (equipo DENAMUR /CNRS)	LB-24H-37°C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CIP 101114	TSB+sangre de oveja al 5 %-24H-30°C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marseille, LaTimone)	TSB-24H-37°C
<i>Kocuria varians Paris</i>	Cepa de laboratorio (equipo HENRY /CNRS)	TSB-24H-30°C
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-30°C
<i>Legionella pneumophila sg1</i>	CIP 33152	YEC+sup. Legionella

ES 3 025 759 T3

Microorganismos	REFERENCES	Condiciones de crecimiento
<i>Paris</i>		10%-24H-37°C
<i>Legionella pneumophila sg6</i>	LG 0846 3022 (CNRL, cepa medioambiental)	YEC+sup. Legionella 10%-24H-37°C
<i>Listeria monocytogenes 1/2</i>	CIP 82,110T	BHI-24H-37°C
<i>Listeria monocytogenes 1/2A</i>	CIP 100607	BHI-24H-37°C
<i>Micrococcus luteus</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-30°C
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CIP 79,18T	TSB+sangre de caballo al 10 %-24H-37°C
<i>Neisseria meningitidis</i>	CIP 107858	TSB+sangre de caballo al 10 %-24H-37°C
<i>Proteus mirabilis</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marseille,La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Providencia stuartii</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marseille,La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Pseudomonas fluorescens Migula</i>	ATCC 4927	TSB-24H-37°C
<i>Pseudomonas fluorescens Paris</i>	Cepa de laboratorio (equipo HENRY /CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Rhodocycclus</i>	Cepa de laboratorio (equipo HENRY /CNRS)	TSB-24H-30°C
<i>Salmonella typhimurium 12023</i>	Cepa de laboratorio (equipo BARRAS LCB/CNRS)	LB-24H-37°C
<i>Serratia marcescens</i>	CIP 102446	TSB-24H-30°C
<i>Serratia marcescens</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marseille,La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Shewanella oneidensis</i>	Cepa de laboratorio (MEJEAN LCB/CNRS)	LB-24H-37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cepa clínica (equipo DUKAN LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	IP 53-156	TSB-24H-37°C
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marseille,La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Staphylococcus maltophilia</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marseille,La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Staphylococcus agalactiae</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marseille,La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Vibrio cholerae</i>	CIP 104151	TSB-24H-37°C
EUCARIOTAS		
<i>Aspergillus niger</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-30°C
<i>Candida albicans</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-30°C
<i>Fusarium</i>	CNCM 1149-76	TSB-24H-30°C
<i>Geotrichum candidum</i>	CNCM 1447-83	TSB-24H-30°C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BY4741	YPD+glucosa al 10 %
<i>Acanthamoebae castellanii</i>	ATCC 30234	PYG

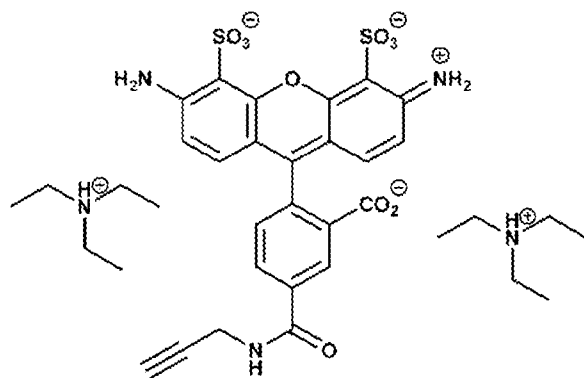
Tabla 2:

	Composición	Proveedor	Referencia
Caldo de soja trípico (TSB)	Peptona de caseína (pancreática) 17 g/l + peptona de soja (digest. papaína) 3g/l + cloruro de sodio 5 g/l + hidrogenofosfato de dipotasio 2,5 g/l + glucosa 2,5 g/l pH7,3	Sigma Aldrich (USA)	22092
Infusión cerebro corazón (BHI)	sólidos de infusión de cerebro 12,5 g/l + sólidos de infusión de corazón de res 5 g/l + proteosa de peptona 10 g/l + glucosa 2 g/l + cloruro de sodio 5 g/l + fosfato de disocio 2,5 g/l	Oxoid (GB)	CM1135
YEC	extracto de levadura 10 g/l + ácido Casamino	Becton Dickinson (USA)	Bacto 212720
PYG	Proteosa de peptona 20 g/L+ extracto de levadura 1 g/L+ glucosa 18 g/L+ cloruro de calcio + fosfato de disodio + fosfato de potasio + sulfato de magnesio + ^o citrato de sodio-PH=6,5	ATCC	712 PYG
Luria Bertani (LB)	Bactotripton 10g/l+	Becton Dickinson (USA)	211699
	extracto de levadura Bacto 5 g/l+	Becton Dickinson (USA)	212720
	Cloruro de sodio+	Sigma Aldrich (USA)	55886
	pastagar 15g/l pH7,2	Biorad (USA)	64946

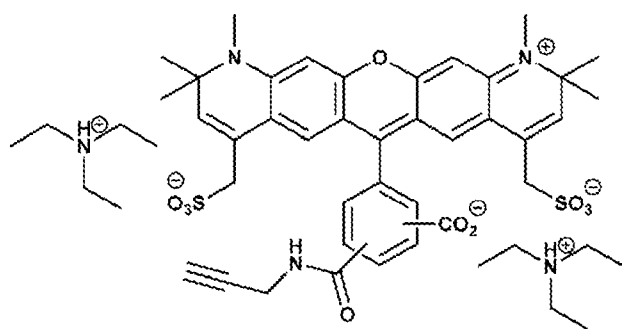
1.2) Química click catalizada con cobre

5 Los cultivos nocturnos se diluyeron 100 veces en medio fresco (volumen final 100 µl) que contenía Kdo-N₃ (I-1) o Ara-N₃ (Ia) (10 mM). Los microorganismos se incubaron 30 o 37°C durante 24 horas y después se lavaron 3 veces con tampón fosfato (0,05 M, pH 7,5) mediante centrifugación a 13.000 x g durante 2 min a temperatura ambiente.

10 Se utilizaron dos sondas de fluorocromo-alquino de la siguiente fórmula A488-yne (6a) y A594- yne (6b):



A488-yne (6a)



A594-yne (6b)

Se mezclaron CuSO_4 y TGTA, a una concentración final de 2 mM y 4 mM respectivamente durante la noche en tampón fosfato (0,05 M, pH 7,5) a 37°C bajo agitación vigorosa. A continuación se añadieron aminoguanidina, ascorbato de sodio y A488-yne (6a) o A594-yne (6b) a una concentración final de 4 mM, 5 mM y 1 mM respectivamente a la mezcla CuSO_4 /TGTA durante la noche. Finalmente, los microorganismos se resuspendieron en esta disolución y se incubaron durante 30 minutos a 37°C bajo agitación. Finalmente, las células se lavaron a continuación 3 veces con tampón fosfato mediante centrifugación a 14.000 x g durante 2 min en la habitación y se analizaron por microscopía.

1.3) Microscopía de fluorescencia.

Los microorganismos se inocularon en cubreobjetos de vidrio y se cubrieron con una fina almohadilla semisólida (1 mm de grosor) de agar al 1 % hecha con LB diluido (1/10 en tampón fosfato (0,05 M, pH 7,5)). Las imágenes se registraron con un microscopio automatizado de epifluorescencia (Nikon TE2000-E-PFS, Nikon, Francia) equipado con una cámara CoolSNAP HQ 2 (Roper Scientific, Roper Scientific SARL, Francia) y un objetivo 100x/1,4 DLL.

La luz de excitación se emitió por una luz de halogenuro metálico de 120 W y la señal se monitorizó utilizando filtros apropiados. El análisis digital y el procesamiento de imágenes se llevaron a cabo mediante un script de automatización personalizado (Visual Basic) bajo Metamorph 7.5 (Molecular Devices, Molecular Devices France, Francia).

2) Resultados

21.) Se han probado diferentes cepas de bacterias, hongos y amebas con ambos compuestos Ara-N3 (Ia) de la presente invención y Kdo-N₃ (I-1) del estado de la técnica en comparación.

Estas cepas se cultivaron primero en presencia del compuesto (Ia) o (I-1) y la incorporación del reportero químico azido en el microorganismo se monitorizó en un paso posterior utilizando cicloadición de azida-alquino catalizada con cobre en las condiciones descritas anteriormente, con sulfato de cobre, ascorbato de sodio, TGTA, un ligando de tris(triazolilo) soluble en agua para cobre (I) y una sonda de fluorocromo-alquino de la anterior fórmula (6a) o (6b) durante 30 minutos como se divulgó anteriormente.

En estos experimentos, las cepas que muestran fluorescencia altamente distintiva, indicativas de una incorporación metabólica efectiva del reportero químico se han marcado "+" en la Tabla 3 a continuación y la ausencia de etiquetado se ha marcado "-" y las bacterias no probadas se han marcado "NT" en la Table 3.

Tabla 3:

Microorganismos	Kdo-N ₃	Ara-N ₃
BACTERIAS		
<i>Acinetobacter baumannii</i> s	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	NT	+
<i>Bacillus cereus</i>	NT	+
<i>Bacillus cereus</i> paris	NT	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+
<i>Cronobacter sakazakii</i>	+	+
<i>Enterococcus durans</i>	NT	+

ES 3 025 759 T3

Microorganismos	Kdo-N ₃	Ara-N ₃
BACTERIAS		
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+
<i>Escherichia coli</i> K12	+	+
<i>Escherichia coli</i> O86	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> sg1 Paris	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> sg6	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	-	+
<i>Micrococcus luteus</i>	-	+
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	+
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+
<i>Providencia stuartii</i>	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Migula	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Paris	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i> 12023	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	-	+
<i>Staphylococcus epidermis</i>	-	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	NT	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	NT	+
<i>Vibrio cholerae</i>	+	+
EUCARIOTAS	Kdo-N ₃	Ara-N ₃
<i>Aspergillus niger</i>	-	+
<i>Candida albicans</i>	-	+
<i>Fusarium</i>	-	+
<i>Geotrichum candidum</i>	-	+
<i>Acanthamoebae castellanii</i>	-	+

Estos experimentos muestran que el compuesto (Ia) de la presente invención es asimilado por un amplio rango de bacterias y hongos, así como amebas (todos los microorganismos probados estaban etiquetados). Curiosamente, el compuesto (Ia) es asimilado por las siguientes cepas de bacterias (todas bacterias grampositivas) y hongos (todos los hongos probados) que no asimilan el compuesto (I-1):

- 5
- a) Bacterias: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus aureus*, y
- 10 b) Hongos: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium* y *Geotrichum candidum*, y
- c) amebas: *Acanthamoebae castellanii*

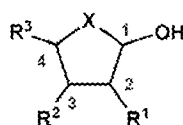
REIVINDICACIONES

1. Método para el etiquetado específico de microorganismos vivos en una muestra que comprende microorganismos, comprendiendo el método los pasos de:

a) incubación de dichos microorganismos de dicha muestra con al menos un compuesto monosacárido modificado que comprende un primer grupo químico reactivo capaz de reaccionar con un segundo grupo reactivo, de modo que un residuo que porta dicho primer grupo reactivo se incorpora en dichos microorganismos vivos, preferentemente en la superficie de dichos microorganismos, y

b) puesta en contacto de dicho residuo en dicho microorganismo con una molécula de etiquetado que comprende dicho segundo grupo reactivo para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo de dicho residuo incorporado en dicho microorganismo vivo con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula de etiquetado, dando lugar a un enlace covalente,

caracterizado por que dicho compuesto monosacárido modificado tiene la siguiente fórmula (I'), o una sal del mismo:



I'

- X es O, y

- R¹ es H, OH, NH₂, estando sustituidos o no OH y NH₂ por grupos protectores de los mismos seleccionados a partir del grupo formado por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo e imidoilo, y

- R² es H, OH, NH₂, estando sustituidos o no OH y NH₂ por grupos protectores de los mismos seleccionados a partir del grupo formado por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo e imidoilo,

- R³ es una cadena de alquilo en C1 a C4, estando cada carbono sustituido o no sustituido por OH o NH₂ por grupos protectores seleccionados a partir del grupo formado por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo e imidoilo,

- estando sustituido R³ por dicho primer grupo reactivo Ra; y

- siendo seleccionado dicho primer grupo reactivo Ra entre grupos formados por o que portan el grupo azido (-N₃) y grupos formados por o que portan el grupo alquino (-C≡C-), y siendo seleccionado dicho segundo grupo entre grupos formados por o que portan alquino y azido, respectivamente,

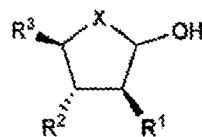
y en donde las bacterias de etiquetado son seleccionadas entre las siguientes especies de microorganismos:

a) bacterias: *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus paris*, *Bacillus subtilis*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas fluorescens Migula*, *Pseudomonas fluorescens Paris*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio cholera*, y

b) hongos: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium* y *Geotrichum candidum*, y

c) amebas: *Acanthamoebae castellanii*.

2. Un método según la reivindicación 1, en donde dicho compuesto monosacárido modificado es un estereoisómero que tiene la fórmula (I) o una sal del mismo



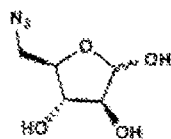
I

3. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicho compuesto monosacárido modificado es un compuesto que tiene la fórmula (I) o (I') o una sal del mismo, en donde:

- R¹ y R² son OH, estando OH sustituido o no por un grupo protector, y

- R³ es -CH₃, -CH₂OH o -CH₂NH₂, estando sustituidos estos grupos por dicho primer grupo reactivo Ra.

4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho compuesto monosacárido modificado es un compuesto que tiene la fórmula (Ia), o una sal del mismo, en donde:



1a

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el primer grupo reactivo Ra se selecciona entre grupos formados por o que portan el grupo azido y grupos formados por o que portan el grupo alquino, siendo dicho primer grupo reactivo preferentemente el grupo azido, y seleccionándose dicho segundo grupo reactivo entre grupos formados por o que portan respectivamente los grupos alquino y azido, siendo dicho segundo grupo reactivo preferentemente el grupo alquino, y llevándose a cabo la reacción de dicho grupo reactivo azido con dicho grupo reactivo alquino en la realización de una cicloadición azida alquino.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde Ra es $-N_3$ o $-C\equiv CH$.
7. Un método según la reivindicación 1 a 6, en donde dicho microorganismo se selecciona entre:
- microorganismos procariotas, preferentemente bacterias, y
 - microorganismos eucariotas unicelulares, preferentemente hongos unicelulares y amebas.
8. Un método según las reivindicaciones 1 a 7, que comprende el paso adicional de:
- c) detección del microorganismo vivo al detectar si dicho microorganismo comprende dicha molécula de etiquetado unida a dicho microorganismo vivo y/o inmoviliza dicho microorganismo vivo que porta dicha molécula de etiquetado en un sustrato sólido, en donde dicha molécula de etiquetado es una molécula que comprende una sustancia detectable o capaz de reaccionar o unirse a una sustancia detectable o dicha molécula de etiquetado una primera molécula que porta dicho segundo grupo reactivo, siendo capaz dicha primera molécula de reaccionar o unirse a una segunda molécula y/o a un sustrato sólido, comprendiendo dicha segunda molécula preferentemente una sustancia detectable y/o estando unida o siendo capaz de unirse dicha segunda molécula a dicho sustrato sólido.
9. Un método según la reivindicación 8, en donde dicha molécula de etiquetado es una molécula detectable que comprende una sustancia detectable, comprendiendo el método el paso c) de detección del microorganismo vivo al detectar si dicho microorganismo comprende dicha molécula detectable unida a dicho microorganismo.
10. Un método según la reivindicación 8 o 9, en donde dicha molécula de etiquetado es un primer ligando o una primera proteína que porta dicho segundo grupo reactivo y en el paso c) dicho microorganismo vivo acoplado a dicho primer ligando o dicha primera proteína de unión se detecta y/o se inmoviliza mediante puesta en contacto de dicho primer ligando o dicha primera proteína de unión con un segundo ligando o una segunda proteína de unión o mediante unión específica de dicho primer ligando o dicha primera proteína de unión.
11. Un kit para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende:
- dicho compuesto monosacárido modificado de la fórmula (I), y
 - dicha molécula de etiquetado que comprende dicho segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con dicho primer grupo reactivo, y
 - si es necesario, reactivos para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula de etiquetado.
12. Un kit según la reivindicación 11, que comprende además:
- dicha molécula detectable o dicha segunda molécula que porta una sustancia detectable que comprende un fluorocromo o una molécula luminiscente o una enzima, y/o
 - un sustrato sólido que porta dicha segunda molécula capaz de reaccionar específicamente o unirse a dicha molécula de etiquetado.
13. Un kit según la reivindicación 12, que comprende además un medio de cultivo o incubación que permite el crecimiento de dicho microorganismo.