

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 088**

51 Int. Cl.:

C09K 11/06 (2006.01)

C07H 17/075 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2011 PCT/FR2011/000504**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12038614**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2011 E 11764800 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2619281**

54 Título: **Cumarinas sulfonadas, su síntesis, sustratos fluorogénicos que resultan de un injerto de estas cumarinas sobre azúcares, procedimiento de obtención de estos sustratos, así como sus aplicaciones**

30 Prioridad:

21.09.2010 FR 1003759

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

29.05.2017

73 Titular/es:

ETS J. SOUFFLET (50.0%)

Quai Sarrail

10402 Nogent-sur-Seine, FR y

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (50.0%)

72 Inventor/es:

DREVELLE, ANTOINE;

LADAME, SYLVAIN;

NAJAH, MAJDI y

MAYOT, ESTELLE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 614 088 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

Cumarinas sulfonadas, su síntesis, sustratos fluorogénicos que resultan de un injerto de estas cumarinas sobre azúcares, procedimiento de obtención de estos sustratos, así como sus aplicaciones.

La presente invención se refiere a unos sustratos fluorogénicos que resultan de un injerto de cumarinas sulfonadas sobre azúcares, al procedimiento de obtención de estos sustratos, así como a sus aplicaciones.

Diferentes métodos de fabricación de tales cumarinas sulfonadas son conocidos, por ejemplo por la patente inglesa GB 9 723 365 a nombre de MOLECULAR PROBES que describe la síntesis de derivados de 6,8-difluoro-7-hidroxycumarina.

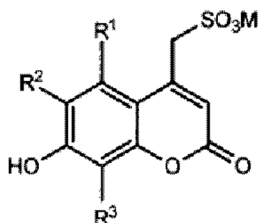
Es así que esta patente cita en particular la 6,8-difluoro-7-hidroxycumarin-4-metanosulfonato de sodio (compuesto nº 37).

La patente GB 9 723 365 describe también unos compuestos que resultan de una sustitución del grupo hidroxilo por un resto de azúcar, estando este último por lo tanto injertado sobre la cumarina sulfonada. La reproducción del procedimiento de injerto descrito en la patente antes citada no es válida para las cumarinas sulfonadas ya que no son solubles en las condiciones descritas.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar unos sustratos fluorogénicos que resultan de un injerto de cumarinas sulfonadas sustituidas sobre unos azúcares gracias a un procedimiento de injerto reproducible con diferentes azúcares y diferentes cumarinas sulfonadas sustituidas. Se entiende en la presente descripción por sustrato fluorogénico un sustrato no fluorescente cuya hidrólisis de la unión entre el azúcar y la cumarina libera la cumarina, que es en sí misma fluorescente.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método de detección de actividades glicosidasas (EC3.2.1) sobre unos extractos enzimáticos purificados o no o sobre unos microorganismos o sobre unas células.

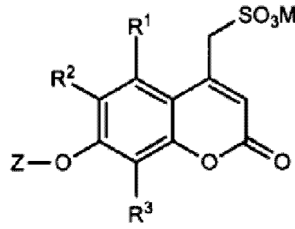
Se describe una familia de cumarinas sulfonadas sustituidas de fórmula general (I)



en la que:

- R^1 representa H, u OH, o un radical alquilo de C_1 a C_6 sustituido o no, lineal o ramificado, o $-COR^4$, o $-COOR^4$, o $-CONHR^4$,
- R^2 representa H, o un halógeno, en particular el flúor, o un radical alquilo de C_1 a C_6 sustituido o no, lineal o ramificado, o $-COR^4$, o $-COOR^4$, o $-CONHR^4$,
- R^1 y R^2 pueden formar juntos un anillo, tal como un arilo o un furano, sustituido o no,
- R^3 representa H, o un halógeno, en particular el flúor, o un radical alquilo de C_1 a C_6 sustituido o no, lineal o ramificado, o $-COR^4$, o $-COOR^4$, o $-CONHR^4$,
- siendo R^4 H, o un radical alquilo de C_1 a C_6 sustituido o no, lineal o ramificado o un arilo, sustituido o no,
- M representa Na o K,

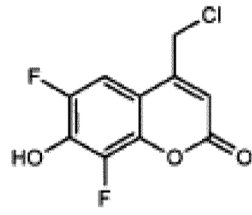
La presente invención se refiere a nuevos sustratos que tienen por fórmula general (II)



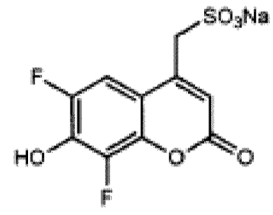
en la que:

- 5 - R¹ representa H, u OH, o un radical alquilo de C₁ a C₆ sustituido o no, lineal o ramificado, o -COR⁴, o -COOR⁴, o -CONHR⁴,
- R² representa H, o un halógeno, en particular el flúor, o un radical alquilo de C₁ a C₆ sustituido o no, lineal o ramificado, o -COR⁴, o -COOR⁴, o -CONHR⁴,
- 10 - R¹ y R₂ pueden formar juntos un anillo, tal como un arilo o un furano, sustituido o no,
- R³ representa H, o un halógeno, en particular el flúor, o un radical alquilo de C₁ a C₆ sustituido o no, lineal o ramificado, o -COR⁴, o -COOR⁴, o -CONHR⁴,
- 15 - siendo R⁴ H, o un radical alquilo de C₁ a C₆ sustituido o no, lineal o ramificado o un arilo, sustituido o no,
- M representa Na o K,
- 20 - Z representa un azúcar seleccionado de entre los azúcares siguientes: celobiosa, xilobiosa, maltosa, sacarosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa, xilano, glucano, xilotriosa, maltotriosa, celotriosa, xilotetraosa, o una mezcla de algunos de ellos.

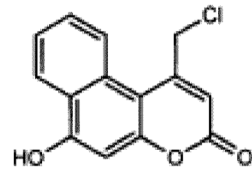
25 La invención se entenderá mejor con la lectura de la descripción siguiente, haciendo referencia a los compuestos numerados 1 a 24 siguientes:



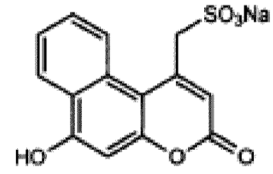
1



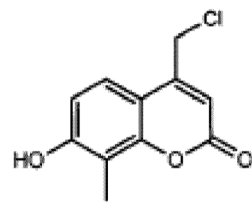
2



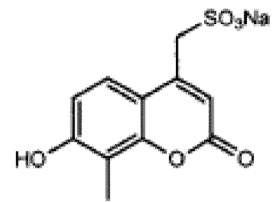
3



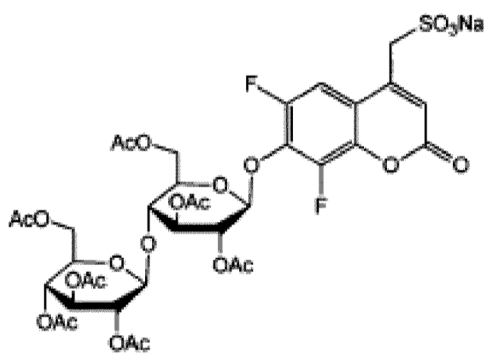
4



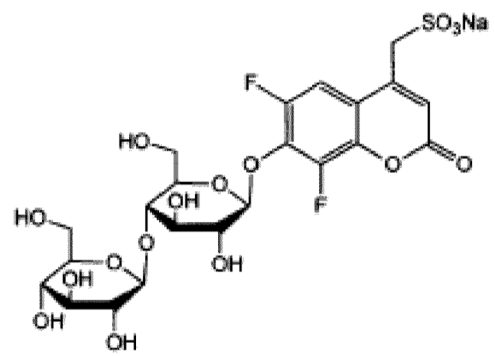
5



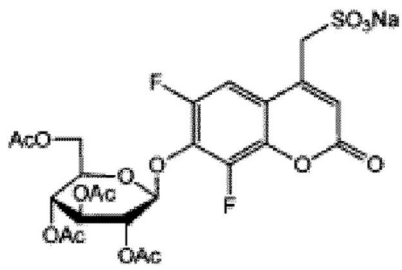
6



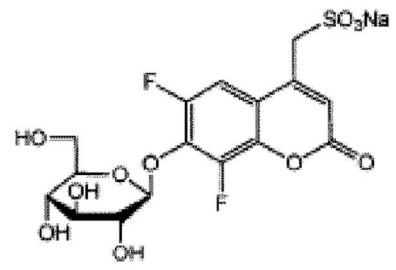
7



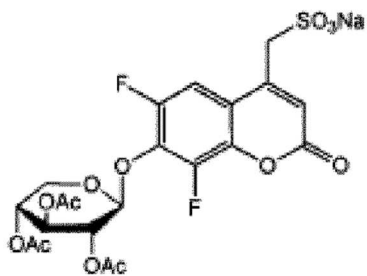
8



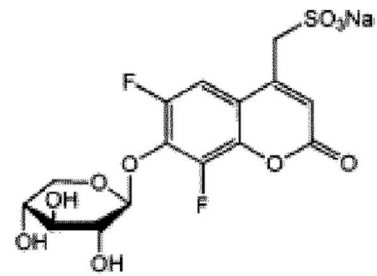
9



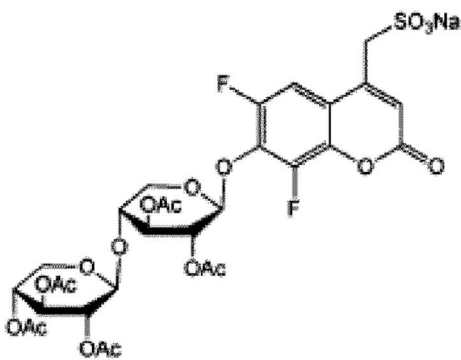
10



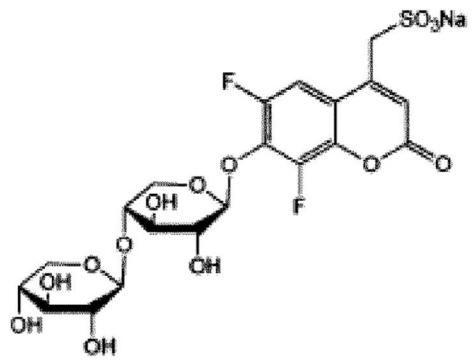
11



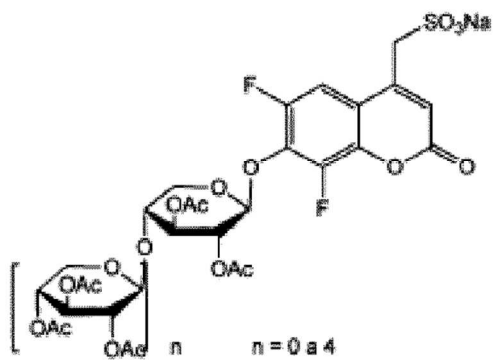
12



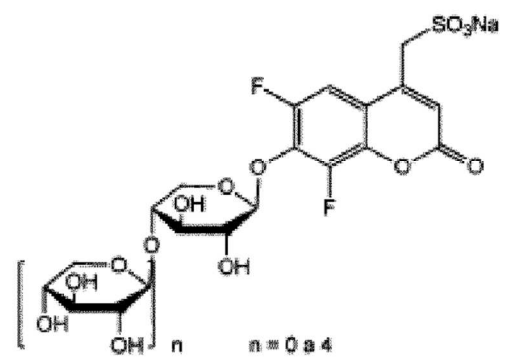
13



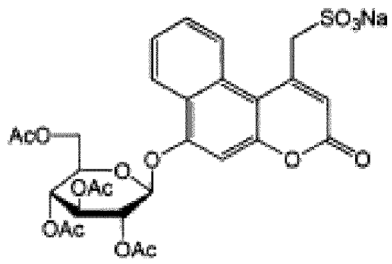
14



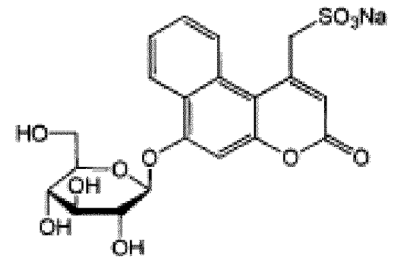
15



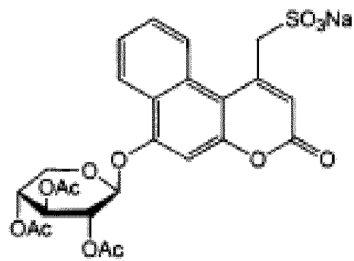
16



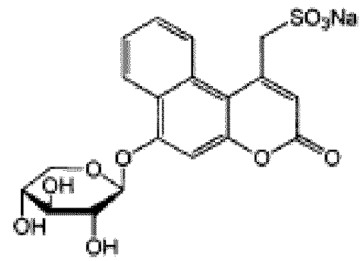
17



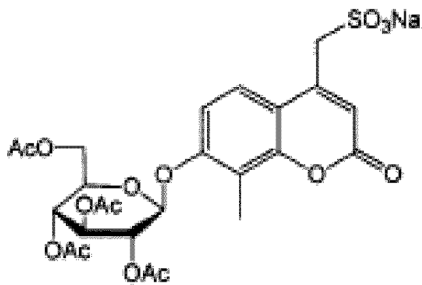
18



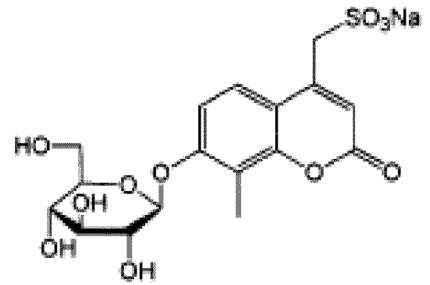
19



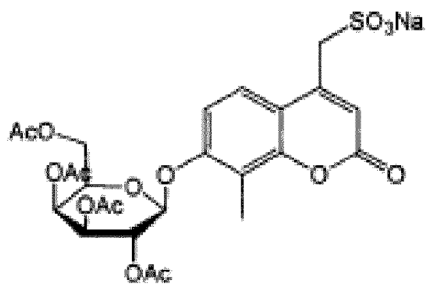
20



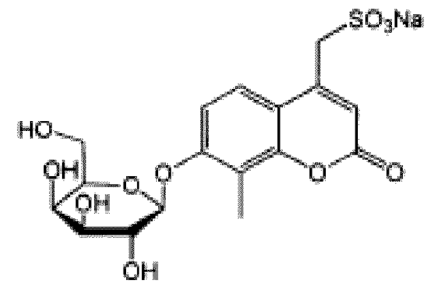
21



22



23



24

entre las que los compuestos 2, 4 y 6 son unas cumarinas sulfonadas sustituidas que entran en la fórmula general (I)

y en las que los compuestos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 son unos ejemplos de sustratos que entran en la fórmula general (II).

5 Diferentes ejemplos de síntesis de estas cumarinas y sustratos se darán ahora, a título indicativo y de ninguna manera limitativo.

Ejemplo 1. Síntesis de 4-clorometil-6,8-difluoro-7-hidroxycumarina (1)

10 Una solución de 2,4-difluororesorcinol (0,8 g) en 8 ml de ácido metilsulfónico se introduce en un matraz, y después se añaden gota a gota 1,3 equivalentes (963 μ l) de 4-cloroacetato de etilo. Después de 3h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se enfría hasta 0°C, después se añaden 100 ml de agua. Se filtra entonces el residuo, se seca y después se lava con éter dietílico para dar 0,34 g (25%) del compuesto 1.

15 RMN ¹H (MeOD) δ (ppm) 7,42 (d, 1H); 6,05 (s, 1H); 4,81 (s, 2H)

Ejemplo 2. Síntesis de 6,8-difluoro-7-hidroxycumarin-4-metanosulfonato de sodio (2)

20 Una solución de 320 mg del compuesto 1 disuelto en 25 ml de etanol se introduce en un matraz, y después se añade una solución de sulfito de sodio (1,1 equivalente, 185 mg) en 6 ml de agua. La mezcla se lleva a reflujo y se sigue la evolución de la reacción por CCM (Cromatografía sobre capa delgada). Después de 40h de calentamiento, la mezcla se enfría hasta 0°C. Se filtra la solución y después se evapora el filtrado bajo presión reducida para dar un sólido amarillo.

25 El sólido obtenido se purifica una primera vez por cromatografía sobre columna de sílice inversa previamente envasada (eluyente: agua pura, cartucho *Puriflash Interchrom C18*) y después con un aparato de purificación *Biotage-IsoleraOne* (eluyente: agua pura, cartucho SNAP C18 120 g, caudal de elución: 25 ml/min).

30 Después de la evaporación del agua bajo presión reducida, el producto 2 se obtiene puro con un rendimiento del 40%.

RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 7,28 (d, 1H); 6,18 (s, 1H); 4,32 (s 2H).

RMN ¹³C (D₂O) δ (ppm) 163,7; 153,1 (dd); 150,5 (t); 149,0; 142,2 (dd); 140,7 (m); 109,2; 105,3 (d); 103,6 (d); 52,7.

35 Máximo de excitación/emisión = 370/470 nm (10 μ M en tampón fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5).

Ejemplo 3. Síntesis de 5,6-benzo-4-clorometil-7-hidroxycumarina (3)

40 Una solución de 1,3-dihidroxi-naftaleno (1 g) en 10 ml de ácido metanosulfónico se introduce en un matraz, y después se añaden gota a gota 1,3 equivalentes (1,10 ml) de 4-cloroacetato de etilo. Después de 4 días de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden 50 ml de agua. Se filtra entonces el residuo, se lava con agua y se seca para dar 1,30 g (80%) del compuesto 3.

45 RMN ¹H (DMSO) δ (ppm) 8,47 (d, 1H); 8,32 (d, 1H); 7,75 (t, 1H); 7,60 (t, 1H); 6,88 (s, 1H); 6,58 (s, 1H); 5,33 (s, 2H).

Ejemplo 4. Síntesis de 5,6-benzo-7-hidroxycumarin-4-metanosulfonato de sodio (4)

50 Una solución de 0,7 g del compuesto 3 disuelto en 50 ml de etanol se introduce en un matraz, y después, se añade una solución de sulfito de sodio (1,1 equivalentes, 370 mg) en 13 ml de agua. La mezcla se lleva a reflujo y se sigue la evolución de la reacción por CCM. Después de 20h de calentamiento, la mezcla se enfría hasta 0°C. Se filtra la solución sobre un embudo Büchner y después se evapora el filtrado bajo presión reducida para dar el compuesto 4 bruto en forma de un sólido amarillo con un rendimiento del 77%.

55 El sólido obtenido se purifica una primera vez por cromatografía sobre columna de sílice inversa previamente envasada (eluyente: agua pura, cartucho *Puriflash Interchrom C18*) y después con un aparato de purificación *Biotage-IsoleraOne* (eluyente: 10% acetonitrilo/90% agua, cartucho SNAP C18 120 g, caudal de elución: 25 ml/min).

60 Después de la evaporación de los disolventes bajo presión reducida, el producto 4 se obtiene puro con un rendimiento del 31%.

RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 8,26 (d, 1H); 8,02 (d, 1H); 7,56 (t, 1H); 7,44 (t, 1H); 6,32 (s, 1H); 6,11 (s, 1H); 4,45 (s, 2H).

Máximo de excitación/emisión = 420/510 nm (100 μ M en tampón fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5).

Ejemplo 5. Síntesis de 4-clorometil-7-hidroxi-8-metilcumarina (5)

Una solución de 2-metilresorcinol (1 g) en 10 ml de ácido metilsulfónico se introduce en un matraz, y después se añaden gota a gota 1,3 equivalentes (1,42 ml) de 4-cloroacetoacetato de etilo. Después de 1 noche de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden 50 ml de agua. Se filtra entonces el residuo, se seca y después se lava con éter dietílico para dar 1,63 g (90%) del compuesto **5**.

RMN ¹H (DMSO) δ (ppm) 7,52 (d, 1H); 6,90 (d, 1H); 6,41 (s, 1H); 4,93 (s, 2H); 2,16 (s, 3H). RMN ¹³C (DMSO) δ (ppm) 160,8; 159,7; 153,6; 151,7; 123,5; 112,3; 111,6; 111,1; 109,8; 41,9; 8,4.

Ejemplo 6. Síntesis de 4-clorometil-7-hidroxi-8-metilcumarin-4-metanosulfonato de sodio (6)

Una solución de 1 g del compuesto **5** disuelto en 90 ml de etanol se introduce en un matraz, y después se añade una solución de sulfato de sodio (1,1 equivalente, 617 mg) en 22 ml de agua. La mezcla se lleva a reflujo. Después de 20h de calentamiento, la mezcla se enfría hasta 0°C. Se filtra la solución sobre un embudo Büchner, el residuo beige obtenido se lava con etanol, en cuanto al filtrado, éste se evapora bajo presión reducida para dar un sólido amarillo. Este sólido se lava con etanol y con éter dietílico. Los dos sólidos obtenidos se reúnen para dar 1 g (80%) de compuesto **6** bruto.

El compuesto **6** bruto se purifica después por varias cromatografías sobre columna de sílice inversa previamente envasada (eluyente: agua pura, cartucho *Puriflash Interchrom C18*) sucesivas para dar el producto **6** puro con un rendimiento del 23%.

RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 7,32 (d, 1H); 6,69 (d, 1H); 6,15 (s, 1H); 4,19 (s, 2H); 1,97 (s, 3H). RMN ¹³C (D₂O) δ (ppm) 164,2; 158,5; 148,9; 123,9; 112,6; 112,2; 111,8; 111,3; 52,4; 7,3.

Máximo de excitación/emisión = 340/485 nm (10 µM en tampón fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5).

Ejemplo 7. Síntesis del sustrato β-D-celobiosido 6,8-difluoro-7-hidroxycumarin-4-metanosulfonato de sodio (8)Bromación del azúcar protegido:

Bajo atmósfera de nitrógeno, se introduce 1 g de aceto-α-D-celobiosa y 12,5 ml de DCM (diclorometano) anhidro en un matraz. La mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden gota a gota 15 ml de una solución de ácido bromhídrico en solución al 33% en ácido acético. Después de 5h de reacción a 0°C, se añaden 25 ml de DCM, y después se agita la mezcla otra vez durante 10 min. Se añade después una solución de carbonato de potasio cuidadosamente hasta la desaparición de la liberación de CO₂, y el medio se deja bajo agitación durante 20 min. Después de la decantación, se recupera la fase orgánica, se extrae la fase acuosa 3 veces con DCM, y después se combinan las fases orgánicas, se secan sobre MgSO₄ y se evaporan bajo presión reducida. La acetobromo-α-D-celobiosa se obtiene en forma de un sólido blanco con un rendimiento del 62%. El producto así obtenido es inestable, y conviene entonces utilizarlo directamente, o bien conservarlo a -20°C.

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) 6,67 (m, 1H); 5,55 (t, 1H); 5,13 (m, 2H); 4,95 (t, 1H); 4,78 (m, 1H); 4,55 (m, 2H); 4,38 (m, 1H); 4,20 (m, 2H); 4,07 (m, 1H); 3,84 (m, 1H); 3,68 (m, 1H); 2,09 (m, 2H).

Injerto del azúcar sobre la cumarina:

Bajo atmósfera de nitrógeno y protección de la luz, se introducen en un matraz 40 mg de cumarina 2 diluidos en 5 ml de DMF (dimetilformamida) anhidra y 150 mg de carbonato de plata. Se disuelven 4 equivalentes de acetobromo-α-D-celobiosa (350 mg) en 10 ml de DMF anhidro. Esta solución se añade después muy lentamente a la mezcla anterior. Después de una noche de agitación a temperatura ambiente, se filtra la solución sobre celita y se evapora el filtrado bajo presión reducida. El sólido obtenido se purifica finalmente por cromatografía sobre columna de sílice (eluyente: 20% MeOH/80% DCM). El compuesto **7** se obtiene con un rendimiento del 4,8%.

Desprotección de las funciones de tipo acetal:

Bajo atmósfera de nitrógeno, se introducen en un matraz 40 mg del compuesto **7** y 7,5 ml de metanol anhidro. La mezcla se enfría hasta 0°C, y después, se añaden 16 mg de metilato de sodio en 5 ml de metanol gota a gota. Se sigue la evolución de la reacción por LC/MS. Después de 1h de agitación, se neutraliza el medio por adición de una solución diluida de ácido cítrico. Después de una agitación suplementaria de 20 min, se evapora el disolvente bajo presión reducida para dar un aceite amarillo translúcido.

El residuo obtenido se purifica una primera vez por cromatografía sobre columna de sílice inversa previamente envasada (eluyente: agua pura, cartucho *Puriflash Interchrom C18*) y después con una HPLC (*High-Pressure Liquid Chromatography*).

Método HPLC:

- 0 min → 10 min; 1,5 ml/min: 100% agua
- 5 • 10 min → 19 min; 1,5 ml/min: 90% agua/10% acetonitrilo
- 19 min → 23 min; 1,5 ml/min: 100% acetonitrilo
- 23 min → 25 min; 1,5 ml/min: 100% agua

Características de la columna: Columna Hypersil; Gold Phenyl; Thermofisher 5; longitud 250 mm; diámetro 4,6 mm

10 Las inyecciones son de 80 µl y el producto sale únicamente en la fase agua en el intervalo: 0 min → 10 min, seguido muy cerca por la cumarina libre presente en solución.

Después de la liofilización, el producto **8** se obtiene puro en forma de un sólido blanco con un rendimiento del 30%.

15 RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 7,55 (d, 1H); 6,60 (s, 1H); 5,17 (d, 1H); 4,45 (d, 1H); 4,38 (s, 2H); 3,9-3,2 (m, 12H).

Ejemplo 8. Síntesis del sustrato β-D-glucosido 6,8-difluoro-7-hidroxicumarin-4-metanosulfonato de sodio (10)Injerto del azúcar sobre la cumarina:

20 Bajo atmósfera de nitrógeno y protección de la luz, se introducen en un matraz 100 mg de cumarina 2 diluidos en 5 ml de DMF anhidro y 5 equivalentes de carbonato de plata. Se disuelven 5 equivalentes de acetobromo-α-D-glucosa en 5 ml de DMF anhidro. Se añade esta solución muy lentamente a la mezcla anterior. Se sigue la evolución de la reacción por LC/MS. Después de una noche de agitación a temperatura ambiente, se filtra la solución sobre celita y se evapora el filtrado bajo presión reducida.

25 El sólido obtenido se purifica finalmente por cromatografía sobre columna de sílice (eluyente: 20% MeOH/80% DCM). El compuesto **9** se obtiene con un rendimiento del 37%.

30 RMN ¹H (MeOD) δ (ppm) 7,73 (d, 1H); 6,63 (s, 1H); 5,4-5,1 (m, 4H); 4,4-4,1 (m, 2H); 4,34 (s, 2H); 4,04 (m, 1H); 2,1 (m, 12H).

Desprotección de las funciones de tipo acetal:

35 Bajo atmósfera de nitrógeno, se introducen en un matraz 45 mg del compuesto **9**, y 10 ml de metanol anhidro. La mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden gota a gota 350 µl de una solución de metilato de sodio al 1% (g/g) en el metanol. Se sigue la evolución de la reacción por LC/MS. Después de 2h30 de agitación, se añade Amberlite IR120 hasta la neutralización del medio. Después de la filtración del Amberlite, se evapora el filtrado bajo presión reducida.

40 El residuo obtenido se purifica una primera vez por cromatografía sobre columna de sílice inversa previamente envasada (eluyente: agua pura, cartucho *Puriflash Interchrom C18*) y después con un aparato de purificación *Biotage-IsoleraOne* (eluyente: agua pura, cartucho SNAP C18 12 g, caudal de elución: 5 ml/min).

45 Después de la liofilización, el producto **10** se obtiene puro con un rendimiento del 54%.

50 RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 7,52 (d, 1H); 6,54 (s, 1H); 5,11 (d, 1H); 4,32 (s, 2H); 3,78 (m, 1H); 3,63 (m, 1H); 3,6-3,4 (m, 4H).

Ejemplo 9. Síntesis del sustrato β-D-xilosido 6,8-difluoro-7-hidroxicumarin-4-metanosulfonato de sodio (12)Bromación del azúcar protegido:

55 Bajo atmósfera de nitrógeno, se introducen en un matraz 500 mg de aceto-β-D-xilopiranososa y 10 ml de DCM. La mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden gota a gota 5 equivalentes de ácido bromhídrico en solución al 33% en ácido acético. Después de 24h de reacción, se añaden 15 ml de DCM, la mezcla se enfría hasta 0°C y después se añaden 20 ml de agua helada. Después de la separación de las dos fases, la fase orgánica se lava 3 veces con una solución saturada en NaHCO₃ y después 3 veces con agua. Después del secado sobre MgSO₄ y de la filtración, se evapora el filtrado bajo presión reducida. La acetobromo-α-D-xilosa obtenida se introduce después directamente en la etapa siguiente.

Injerto del azúcar sobre cumarina:

65 Bajo atmósfera de nitrógeno y protección de la luz, se introducen en un matraz 100 mg de cumarina 2 diluidos en

8 ml de DMF anhidro y 5 equivalentes de carbonato de plata. Se disuelven 5 equivalentes de acetobromo- α -D-xilosa en 6 ml de DMF anhidro. Se añade esta solución muy lentamente a la mezcla anterior. Se sigue la evolución de la reacción por LC/MS. Después de una noche de agitación a temperatura ambiente, se filtra la solución sobre celita y se evapora el filtrado bajo presión reducida.

5 El sólido obtenido se purifica finalmente por cromatografía sobre columna de sílice (eluyente: 20% MeOH/80% DCM). El compuesto **11** se obtiene puro con un rendimiento del 34%.

10 RMN ^1H (MeOD/D₂O) δ (ppm) 7,70 (d, 1H); 6,66 (s, 1H); 5,46 (d, 1H); 5,25 (m, 2H); 5,04 (m, 1H); 4,37 (s, 2H); 4,32 (m, 1H); 3,70 (m, 1H); 2,13 (m, 9H).

Desprotección de las funciones de tipo acetal:

15 Bajo atmósfera de nitrógeno, se introducen en un matraz 62 mg del compuesto **11** y 15 ml de metanol anhidro. La mezcla se enfría hasta 0°C y después se añaden gota a gota 500 μl de una solución de metilato de sodio al 1% (g/g) en el metanol. Se sigue la evolución de la reacción por LC/MS. Después de 1h30 de agitación, se añade Amberlite IR120 hasta la neutralización del medio. Después de la filtración del Amberlite, se evapora el filtrado bajo presión reducida.

20 El residuo obtenido se purifica una primera vez por cromatografía sobre columna de sílice inversa previamente envasada (eluyente: agua pura, cartucho *Puriflash Interchrom C18*) y después con un aparato de purificación *Biotage-IsoleraOne* (eluyente: agua pura, cartucho SNAP C18 30 g, caudal de elución: 15 ml/min).

Después de la liofilización, el producto **12** se obtiene puro con un rendimiento del 62%.

25 RMN ^1H (D₂O) δ (ppm) 7,64 (d,1H); 6,66 (s, 1H); 5,14 (d, 1H); 4,43 (s, 2H); 4,02 (m, 1H); 3,5-3,7 (m, 3H); 3,35 (m, 1H).

30 **Ejemplo 10. Síntesis del sustrato β -D-xilobiosido 6,8-difluoro-7-hidroxycumarin-4-metanosulfonato de sodio (14)**

Bromación del azúcar protegido:

35 Las condiciones de realización son idénticas a las utilizadas en el ejemplo 9 utilizando aceto-D-xilobiosa como producto de partida. La acetobromo- α -D-xilobiosa obtenida se introduce después directamente en la etapa siguiente.

Injerto del azúcar sobre la cumarina:

40 Bajo atmósfera de nitrógeno y protección de la luz, se introducen en un matraz 60 mg de cumarina **2** diluidos en 5 ml de DMF anhidro y 5 equivalentes de carbonato de plata. Se disuelven 3 equivalentes de acetobromo- α -D-xilobiosa en 5 ml de DMF anhidro. Se añade esta solución muy lentamente a la mezcla anterior. Después de una noche de agitación a temperatura ambiente, se filtra la solución sobre celita y se evapora el filtrado bajo presión reducida.

45 El sólido obtenido se purifica dos veces sucesivamente por cromatografía sobre columna de sílice (eluyente: gradiente del 10% MeOH al 20% MeOH en du DCM). El compuesto **13** se obtiene puro con un rendimiento del 18%.

RMN ^1H (MeOD) δ (ppm) 7,70 (d, 1H); 6,61 (s, 1H); 5,38 (d, 1H); 5,16 (m, 3H); 4,92 (m, 1H); 4,78 (m, 2H); 4,32 (s, 2H); 4,18 (m, 1H); 4,10 (m, 1H); 4,03 (m, 1H); 3,54 (m, 2H); 2,09 (m, 15H).

50 Desprotecciones de las funciones de tipo acetal:

55 Bajo atmósfera de nitrógeno, se introducen en un matraz 27 mg del compuesto **13** y 7 ml de metanol anhidro. La mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden gota a gota 200 μl de una solución de metilato de sodio al 1% (g/g) en el metanol. Se sigue la evolución de la reacción por LC/MS. Después de 3h30 de agitación, se añade Amberlite IR120 hasta la neutralización del medio. Después de la filtración del Amberlite, se evapora el filtrado bajo presión reducida. Se recoge el residuo en agua y después se filtra la solución a 0,45 μm , se evapora de nuevo el filtrado bajo presión reducida.

60 El residuo obtenido se purifica con un aparato de purificación *Biotage-IsoleraOne* (eluyente: 5% acetonitrilo en agua pura, cartucho SNAP C18 12 g, caudal de elución: 3 ml/min).

Después de la evaporación de los disolventes, el producto **14** se obtiene puro con un rendimiento del 40%.

65 RMN ^1H (D₂O) δ (ppm) 7,56 (d, 1H); 6,58 (s, 1H); 5,11 (d, 1H); 4,40 (d, 1H); 4,36 (s, 2H); 4,10 (m, 1H); 3,91 (m, 1H); 3,82 (m, 1H); 3,7-3,5 (m, 3H); 3,40 (m, 2H); 3,21 (m, 2H).

Ejemplo 11. Síntesis del sustrato β -D-xilopoliosido 6,8-difluoro-7-hidroxycumarin-4-metanosulfonato de sodio (16)Acetilación del xilopoliosido, a saber una mezcla de xilobiosa, xylotriosa, etc.:

Bajo atmósfera de nitrógeno, se introducen en un matraz 300 mg de xilopoliosido, algunos granos de 4-dimetilaminopiridina, 28 ml de DCM anhidro y 9 ml de piridina anhidra. La mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden gota a gota 3 ml de anhídrido de acético. Se deja a continuación el medio bajo agitación durante una noche. Después, la mezcla se lava 3 veces con agua, se seca sobre MgSO₄ y después se evapora bajo presión reducida.

El análisis por LC/MS muestra que la mezcla está constituida por aceto-xilopoliosido siendo n = 1 a 5.

Bromación del azúcar protegido:

Las condiciones de realización son idénticas a las utilizadas en el ejemplo 9 utilizando 102 mg de aceto-xilopoliosido como producto de partida. El acetobromo- α -D-xilopoliosido obtenido se introduce después directamente en la etapa siguiente.

Injerto del azúcar sobre la cumarina:

Bajo atmósfera de nitrógeno y protección de la luz, se introducen en un matraz 60 mg de cumarina 2 diluidos en 5 ml de DMF anhidro y 5 equivalentes de carbonato de plata. Se disuelven 106 mg de acetobromo-xilopoliosido en 5 ml de DMF anhidro. Se añade esta solución muy lentamente a la mezcla anterior. Después de 36h de agitación a temperatura ambiente, se filtra la solución sobre celita y se evapora el filtrado bajo presión reducida.

El sólido obtenido se purifica finalmente por cromatografía sobre columna de sílice (eluyente: 20% MeOH/80% DCM).

El análisis por LC/MS muestra que la mezcla está constituida por el compuesto **15** siendo n = 0 a 4.

Desprotecciones de las funciones de tipo acetal:

Bajo atmósfera de nitrógeno, se introducen en un matraz 10 mg del compuesto **15** y 5 ml de metanol anhidro. La mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden gota a gota 100 μ l de una solución de metilato de sodio al 1% (g/g) en el metanol. Después de algunas horas de agitación, se añade Amberlite IR120 hasta la neutralización del medio. Después de la filtración del Amberlite, se evapora el filtrado bajo presión reducida para dar el compuesto **16**.

Ejemplo 12. Síntesis del sustrato β -D-glucosido 5,6-benzo-7-hidroxycumarin-4-metanosulfonato de sodio (18)Injerto del azúcar sobre la cumarina:

Bajo atmósfera de nitrógeno y protección de la luz, se introducen en un matraz 80 mg de cumarina 4 diluidos en 6 ml de DMF anhidro y 5 equivalentes de carbonato de plata. Se disuelven 5 equivalentes de acetobromo- α -D-glucosa en 5 ml de DMF anhidro. Se añade después esta solución en 45 min a la mezcla anterior. Después de 24h de agitación a temperatura ambiente, se filtra la solución sobre celita y se evapora el filtrado bajo presión reducida.

El sólido obtenido se purifica por cromatografía sobre columna de sílice (eluyente: 10% MeOH/90% DCM). El compuesto **17** se obtiene puro con un rendimiento del 37%.

RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 8,04 (d, 1H); 7,50 (d, 1H); 7,25 (m, 2H); 6,56 (s, 1H); 6,31 (s, 1H); 5,30 (m, 2H); 5,08 (m, 1H); 4,96 (d, 1H); 4,56 (d, 1H); 4,26 (m, 1H); 4,21 (s, 2H); 4,03 (m, 1H); 2,10 (m, 12H).

Desprotecciones de las funciones de tipo acetal:

Bajo atmósfera de nitrógeno, se introducen en un matraz 60 mg del compuesto **17** y 15 ml de metanol anhidro. La mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden gota a gota 450 μ l de una solución de metilato de sodio al 1% (g/g) en el metanol. Se sigue la evolución de la reacción por LC/MS. Después de 2h50 de agitación, se añade Amberlite IR120 hasta la neutralización del medio. Después de la filtración del Amberlite, se evapora el filtrado bajo presión reducida. Se recoge el residuo en agua y después se filtra la solución a 0,45 μ m, se evapora de nuevo el filtrado bajo presión reducida.

El residuo obtenido se purifica con un aparato de purificación *Biotage-IsoleraOne* (eluyente: 5% acetonitrilo en agua pura, cartucho SNAP C18 30 g, caudal de elución: 10 ml/min).

Después de la evaporación de los disolventes, el producto **18** se obtiene puro con un rendimiento del 33%.

RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 8,24 (d, 1H); 8,18 (d, 1H); 7,53 (m, 2H); 6,80 (s, 1H); 6,24 (s,1H); 5,25 (d, 1H); 4,49 (m,2H); 4,0-3,5 (m, 6H).

5 **Ejemplo 13. Síntesis del sustrato β-D-xilosido 5,6-benzo-7-hidroxycumarin-4-metanosulfonato de sodio (20)**

Injerto del azúcar sobre la cumarina:

10 Bajo atmósfera de nitrógeno y protección de la luz, se introducen en un matraz 55 mg de cumarina **4** diluidos en 4 ml de DMF anhidro y 5 equivalentes de carbonato de plata (0,3 g). Se disuelven 5 equivalentes de acetobromo-α-D-xilosa (obtenido como se describe en el ejemplo 9) en 4 ml de DMF anhidro. Se añade después esta solución lentamente a la mezcla anterior. Después de 20h de agitación a temperatura ambiente, se filtra la solución sobre celita y se evapora el filtrado bajo presión reducida.

15 El sólido obtenido se purifica por cromatografía sobre columna de sílice (eluyente: 10% MeOH/90% DCM). El compuesto **19** se obtiene puro con un rendimiento del 42%.

RMN ¹H (MeOD/D₂O) δ (ppm) 8,57 (d, 1H); 8,00 (d, 1H); 7,68 (t, 1H); 7,55 (t, 1H); 6,89 (s, 1H); 6,52 (s, 1H); 5,53 (m, 1H); 5,31 (m, 2H); 5,08 (m, 1H); 4,61 (m, 2H); 4,23 (m, 1H); 3,78 (m, 1H); 2,17 (m, 9H).

20 Desprotecciones de las funciones de tipo acetal:

25 Bajo atmósfera de nitrógeno, se introducen en un matraz 40 mg del compuesto **19** y 11 ml de metanol anhidro. La mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden gota a gota 500 µl de una solución de metilato de sodio al 1% (g/g) en el metanol. Después de 2h15 de reacción, se añaden de nuevo 400 µl de la solución de metilato de sodio. Después de 3h30 de agitación, se añade Amberlite IR120 hasta la neutralización del medio. Después de la filtración del Amberlite, se evapora el filtrado bajo presión reducida.

30 El residuo obtenido se purifica por cromatografía sobre columna de sílice inversa previamente envasada (eluyente: 10% acetonitrilo en agua pura, cartucho *Puriflash Interchrom C18*) para dar el compuesto **20** con un rendimiento del 35%.

RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 8,09 (d, 1H); 7,99 (d, 1H); 7,46 (m, 1H); 7,38 (m, 1H); 6,51 (s, 1H); 6,16 (s, 1H); 4,98 (m, 1H); 4,37 (m, 2H); 4,01 (m, 1H); 3,8-3,4 (m, 4H).

35 **Ejemplo 14. Síntesis del sustrato β-D-glucosido 7-hidroxi-8-metilcumarin-4-metanosulfonato de sodio (22)**

Injerto del azúcar sobre la cumarina:

40 Bajo atmósfera de nitrógeno y protección de la luz, se introducen en un matraz 80 mg de cumarina **6** diluidos en 7 ml de DMF anhidro y 5 equivalentes de carbonato de plata (377 mg). Se disuelven 5 equivalentes (563 mg) de acetobromo-α-D-glucosa en 7 ml de DMF anhidro. Se añade después esta solución lentamente a la mezcla anterior. Después de 20h de agitación a temperatura ambiente, se filtra la solución sobre celita y se evapora el filtrado bajo presión reducida.

45 El sólido obtenido se purifica una primera vez por cromatografía sobre columna de sílice (eluyente: 10% MeOH/90% DCM) y después por cromatografía sobre columna de sílice inversa previamente envasada (eluyente: gradiente del 0% al 50% de acetonitrilo en agua pura, cartucho *Puriflash Interchrom C18*). El compuesto **21** se obtiene así puro con un rendimiento del 17%.

50 RMN ¹H (MeOD) δ (ppm) 7,85 (d, 1H); 7,67 (d, 1H); 6,47 (s, 1H); 5,47 (m, 2H); 5,30 (t, 1H); 5,16 (t, 1H); 4,4-4,1 (m, 5R); 2,25 (s, 3H); 2,08 (m, 12H).

Desprotecciones de las funciones de tipo acetal:

55 Bajo atmósfera de nitrógeno, se introducen en un matraz 18 mg del compuesto **21** y 5 ml de metanol anhidro. La mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden 100 µl de una solución de metilato de sodio a 1% (g/g) en el metanol gota a gota. Se sigue la evolución de la reacción por CCM. Después de 1h30 de agitación, se añade Amberlite IR120 hasta la neutralización del medio. Después de la filtración del Amberlite, se evapora el filtrado bajo presión reducida.

60 El compuesto **22** se obtiene con un rendimiento del 34%.

65 RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 7,53 (d, 1H); 7,06 (d, 1H); 6,26 (s, 1H); 5,15 (d, 1H); 4,24 (m, 2H); 3,90 (m, 1H); 3,73 (m, 1H); 3,6-3,4 (m, 4H); 2,13 (s, 3H).

Ejemplo 15. Síntesis del sustrato β -D-galactosido 7-hidroxi-8-metilcumarin-4-metanosulfonato de sodio (24)Injerto del azúcar sobre la cumarina:

5 Bajo atmósfera de nitrógeno y protección de la luz, se introducen en un matraz 80 mg de cumarina **6** diluidos en 5 ml de DMF anhidro y 5 equivalentes de carbonato de plata (377 mg). Se disuelven 5 equivalentes (563 mg) de acetobromo- α -D-galactosa en 5 ml de DMF anhidro. Se añade después esta solución lentamente a la mezcla anterior. Se sigue la evolución de la reacción por CCM. Después de 40h de agitación a temperatura ambiente, se filtra la solución sobre celita y se evapora el filtrado bajo presión reducida.

10 El sólido obtenido se purifica una primera vez por cromatografía sobre columna de sílice inversa previamente envasada (eluyente: gradiente del 0% al 50% de acetonitrilo en agua pura, cartucho *Puriflash Interchrom C18*) y después por cromatografía sobre columna de sílice (eluyente: 10% MeOH/90% DCM). El compuesto **23** se obtiene así puro con un rendimiento del 42%.

15 RMN ^1H (MeOD) δ (ppm) 7,81 (d, 1H); 7,65 (d, 1H); 6,45 (s, 1H); 5,49 (m, 3H); 5,37 (m, 1H); 4,37 (m, 3H); 4,20 (m, 2H); 2,23 (s, 3H); 2,19 (s, 3H); 2,12 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 2,03 (s, 3H). RMN ^{13}C (MeOD) δ (ppm) 170,80; 170,65; 170,08; 169,97; 161,57; 157,33; 152,52; 148,64; 124,58; 114,82; 114,41; 114,15; 110,77; 98,48; 70,93; 70,67; 68,60; 67,39; 61,29; 52,61; 19,41; 19,37; 19,19; 19,18; 7,03.

20 Desprotecciones de las funciones de tipo acetal:

25 Bajo atmósfera de nitrógeno, se introducen en un matraz 45 mg del compuesto **23** y 20 ml de metanol anhidro. La mezcla se enfría hasta 0°C, y después se añaden 300 μl de una solución de metilato de sodio al 1% (g/g) en el metanol gota a gota. Se sigue la evolución de la reacción por CCM. Después de 1h30 de agitación, la reacción no es total, se añaden de nuevo 300 μl de la solución de metilato. Después de 3h de reacción, se añade Amberlite IR120 hasta la neutralización del medio. Después de la filtración del Amberlite, se evapora el filtrado bajo presión reducida.

30 El compuesto **24** se obtiene con un rendimiento del 36%.

RMN ^1H (D_2O) δ (ppm) 7,51 (d, 1H); 7,07 (d, 1H); 6,24 (s, 1H); 5,09 (d, 1H); 4,0-3,6 (m, 8H); 2,13 (s, 3H).

35 Los sustratos así obtenidos encuentran en particular su aplicación para la detección de actividades glicosidasas (EC3.2.1) sobre unos extractos enzimáticos purificados o no o sobre unos microorganismos o sobre células.

Será por ejemplo posible efectuar la determinación fluorescente de actividades xilanasas y/o celulosa y/o celobiasa y/o glucosidasa y/o xilosidasa y/o galactosidasa de extractos enzimáticos, o bien efectuar el cribado por fluorescencia según sus actividades glicosidasas (EC3.2.1) de enzimas o de microorganismos o de células.

40 De manera más particular, los nuevos sustratos según la invención permitirán la detección de actividades glicosidasas (EC3.2.1) sobre unos extractos enzimáticos purificados o no o sobre unos microorganismos o sobre unas células compartimentadas en unas gotitas acuosas en suspensión en una fase oleosa (emulsión) producidas por agitación mecánica. Será así posible realizar el cribado por FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) según sus actividades xilanasas y/o celulosa y/o celobiasa y/o glucosidasa y/o xilosidasa y/o galactosidasa de enzimas o de microorganismos o de células compartimentadas en gotitas acuosas en suspensión en una fase oleosa.

45 De manera aún más particular, los sustratos según la invención permitirán la detección de actividades glicosidasas (EC3.2.1) sobre unos extractos enzimáticos purificados o no o sobre unos microorganismos o sobre unas células compartimentadas en unas gotitas acuosas en suspensión en una fase oleosa (emulsión) producidas por un dispositivo microfluídico. En esta hipótesis, será posible realizar el cribado según sus actividades xilanasas y/o celulosa y/o celobiasa y/o glucosidasa y/o xilosidasa y/o galactosidasa de enzimas o de microorganismos o de células compartimentadas en gotitas acuosas en suspensión en una fase oleosa creada por un dispositivo microfluídico.

50 Diferentes ejemplos de detecciones de actividades enzimáticas con la ayuda de los sustratos fluorogénicos descritos se darán ahora, a título indicativo y de ninguna manera limitativo.

Ejemplo 16. Detección de actividades enzimáticas sobre extractos enzimáticos solubles con los sustratos 10, 12, 14 y 18

60 Las cinéticas enzimáticas se realizan en microplacas sobre unos extractos enzimáticos solubles (A, B, C y D) ricos en actividades de tipo celulasa y xilanasas. Estos extractos se diluyen 10 veces (sustrato 18, figura 1) o 100 veces (sustrato 10, 12 y 14, figura 2) en un tampón fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5. Un volumen de 20 μl de extracto enzimático diluido se añade a 20 μl de sustrato fluorogénico (10, 12, 14 o 18) a 0,25 mM en un tampón fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5. Las cinéticas se realizan a 30°C. La hidrólisis enzimática de los diferentes sustratos fluorogénicos se continúa durante 120 minutos por medición de la fluorescencia con unas longitudes de

excitación y de emisión de: 339 nm y 452 nm para los sustratos 10, 12 y 14; 375 nm y 510 nm para el sustrato 18.

Los resultados obtenidos (figuras 1 y 2) muestran que los sustratos fluorogénicos ensayados permiten detectar unas actividades enzimáticas de tipo β -glucosidasa (sustrato 10 y 18), β -xilosidasa (sustrato 12) y xilanasa (sustrato 14) en los extractos enzimáticos utilizados.

5

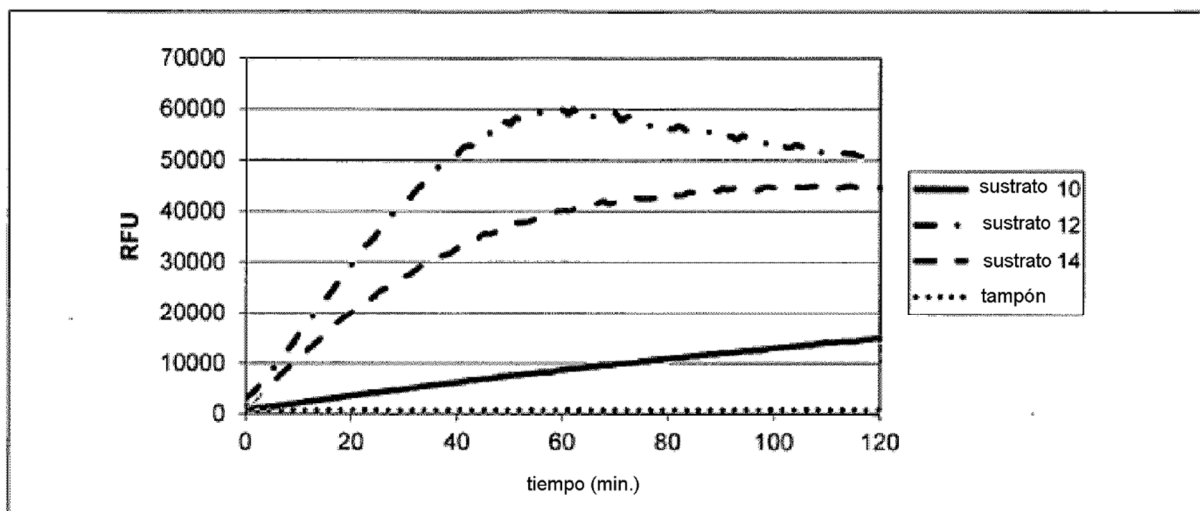


Figura 1: Detección de actividades enzimáticas sobre el extracto soluble de enzimas A con los sustratos 10, 12 y 14

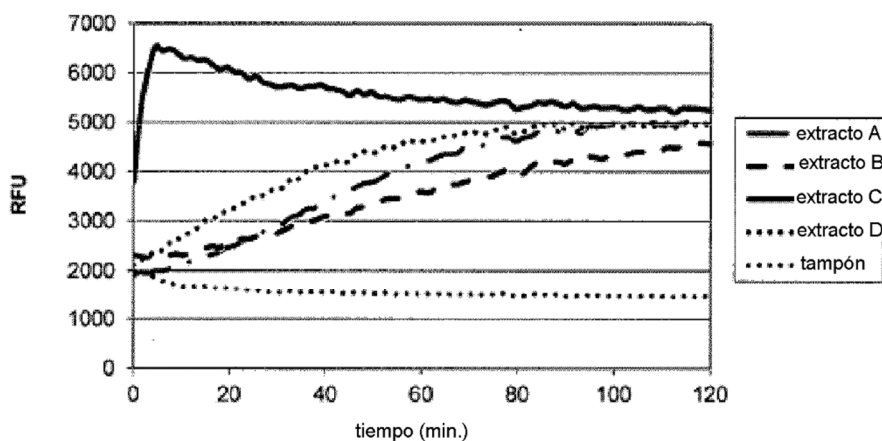


Figura 2: Detección de actividades enzimáticas sobre unos extractos solubles de enzimas con el sustrato 18

Ejemplo 17. Detección de actividades enzimáticas sobre microorganismos con los sustratos fluorogénicos 8 y 10

10

Diferentes cepas control se cultivan en medio LB a 30°C bajo agitación (240 rpm) durante 18 h. Para cada cepa, se centrifuga el cultivo (2500 g, 5 minutos) y se lava dos veces el residuo de células en 5 ml de medio LB (centrifugación a 2500 g, 5 minutos). Este residuo se utiliza para inocular a DO = 0,005 un cultivo en medio inductor (medio Dubos a 2,5 g/l de carboximetil-celulosa) que contiene el sustrato fluorogénico (8 o 10) a 0,25 mM. El cultivo se incuba a 30°C bajo agitación durante 24h. Se recogen unas muestras de sobrenadante de cultivo a diferentes tiempos de incubación para poder seguir la aparición de las actividades celulosa o β -glucosidasa en el medio de cultivo. La aparición de estas actividades se sigue por medición de la fluorescencia sobre los sobrenadantes de cultivo en microplacas con unas longitudes de onda de excitación y de emisión de 388 nm y 455 nm.

15

Los resultados obtenidos (figuras 3 y 4) muestran que los sustratos fluorogénicos ensayados permiten detectar unas actividades enzimáticas de tipo β -glucosidasa (sustrato 10) y celulasa (sustrato 8) sobre unos cultivos de microorganismos.

5

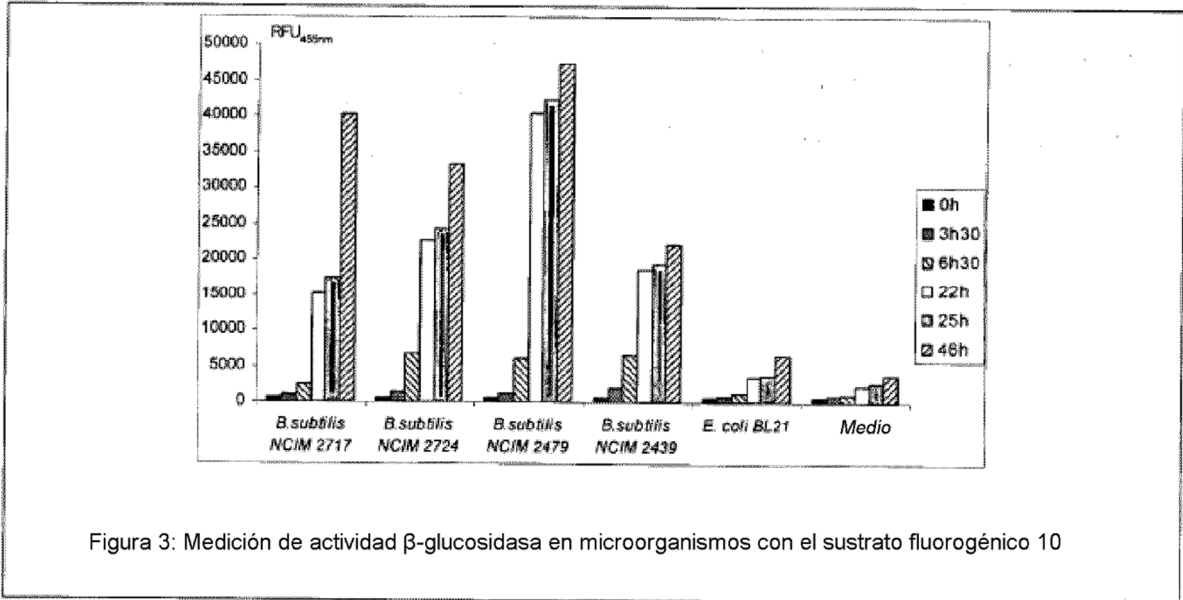


Figura 3: Medición de actividad β -glucosidasa en microorganismos con el sustrato fluorogénico 10

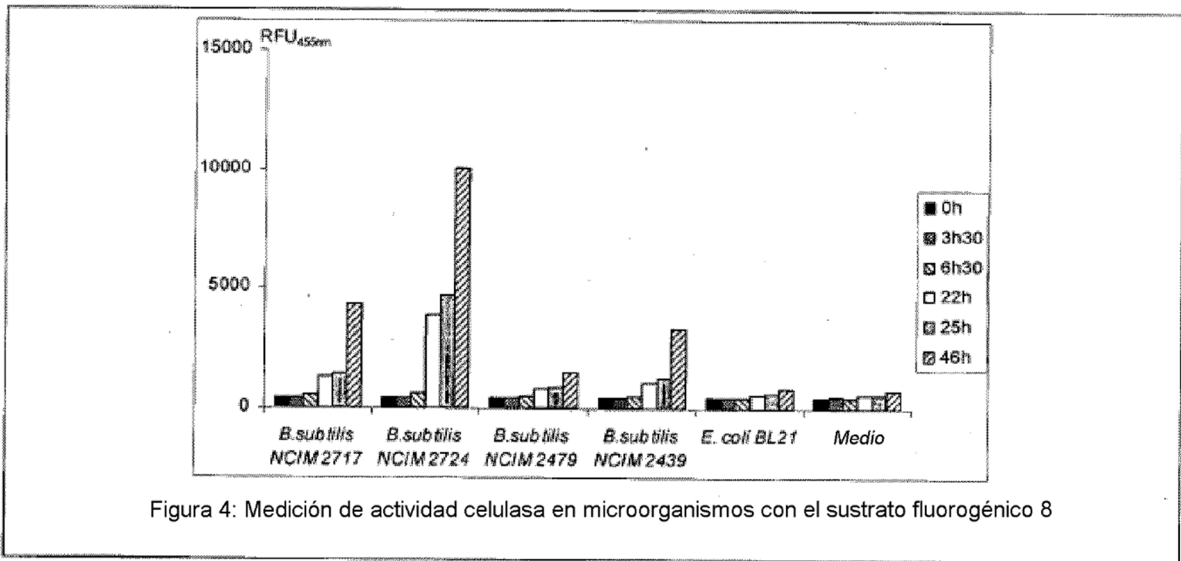


Figura 4: Medición de actividad celulasa en microorganismos con el sustrato fluorogénico 8

Ejemplo 18. Detección de actividad celulasa en microorganismos en emulsión con el sustrato 8

Se utilizan dos cepas control: una que presenta una actividad celulasa (*Bacillus subtilis* NCIM 2724), y la otra que no presenta ninguna (*Escherichia coli* BL21). Las dos cepas se cultivan en medio LB a 30°C bajo agitación (240 rpm) durante 18h. Para cada cepa, el cultivo se centrifuga (2500 g, 5 min) y se lava dos veces el residuo de células en 5 ml de medio LB (centrifugación a 2500 g, 5 min). Este residuo se utiliza para inocular a DO = 0,005 un cultivo en medio inductor (medio Dubos a 2,5 g/l de carboximetil-celulosa) que contiene el sustrato fluorogénico 8 y 2,5 μ M (*B. subtilis* NCIM2724) o 10 μ M (*E. coli* BL21) de sulforhodamina. Estas dos suspensiones de células se utilizan con aceite perfluorado para producir una emulsión compuesta de dos poblaciones de gotitas que contienen cada una, una de las suspensiones descritas. Se miden individualmente las fluorescencias azul y roja de las gotitas en una muestra de la emulsión, durante la producción (t = 0h) y la reinyección después de incubar la emulsión durante 24h a 30°C.

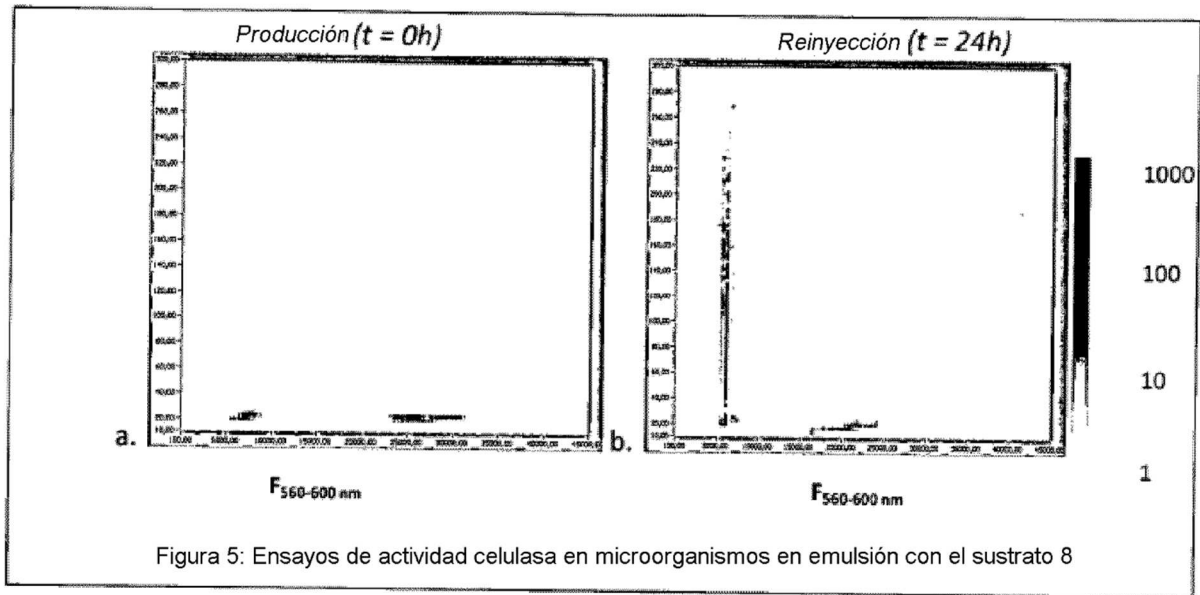


Figura 5: Ensayos de actividad celulasa en microorganismos en emulsión con el sustrato 8

Los gráficos a y b, presentados en la figura 5, son los histogramas a dos dimensiones de las intensidades de fluorescencia roja (en abscisas, RFU) y azul (en ordenadas, RFU) medidas sobre la emulsión durante su producción (a) y su reinyección después de la incubación durante 24 h a 30°C (b). La densidad de población está representada por un código de color que varía del rosa (1 gotita) al rojo (>1000 gotitas) según una escala logarítmica. Se pueden observar dos poblaciones de gotitas: una a baja fluorescencia roja que contiene *Bacillus subtilis* NCIM 2724 (cepa activa) y 2,5 µM de sulforhodamina, y la otra a fluorescencia roja intenso que contiene *Escherichia coli* BL21 (cepa inactiva) y 10 µM de sulforhodamina). El análisis estadístico de estos histogramas está presentado en la Tabla 1.

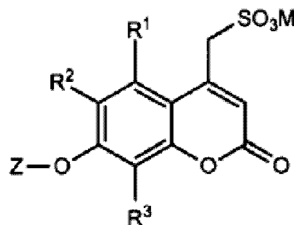
	[sulforhodamina]	2,5 µM	10 µM
	Identidad de las cepas	<i>B.subtilis</i> NCIM 2724	<i>E.coli</i> BL21
Producción (t = 0h)	Número de gotitas analizadas	16083	
	Fluorescencia roja media (RFU)	6 434 ±387	25 775 ±825
	Fluorescencia azul media (RFU)	18,78 ±,19	
	Límite de detección de las gotitas positivas (RFU)	37,56	
Reinyección (t = 24h)	Número de gotitas analizadas	15 869	
	% de gotitas positivas	27,61%	0,26%

Tabla 1: Análisis estadístico de las poblaciones de gotitas durante el ensayo de actividad celulasa en microorganismos en emulsión con el sustrato 8

Las gotitas que contienen la cepa activa (*Bacillus subtilis* NCIM 2724) ven su fluorescencia azul significativamente aumentada después de 24h de incubación (figura 5). A la inversa, las gotitas que contienen la cepa inactiva (*Escherichia coli* BL21) no presentan ningún aumento de su fluorescencia azul. Para la cepa activa (*Bacillus subtilis* NCIM 2724), el 27% de las gotitas son identificadas como positivas, frente al 0,29% para la cepa inactiva (*Escherichia coli* BL21). En conclusión, el sustrato 8 permite detectar una actividad de tipo celulasa sobre unos microorganismos dentro de una emulsión generada por un sistema microfluídico.

REIVINDICACIONES

1. Sustrato fluorogénico que tiene por fórmula general (II)



5

en la que:

- 10 - R¹ representa H, u OH, o un radical alquilo de C₁ a C₆ sustituido o no, lineal o ramificado, o -COR⁴, o -COOR⁴, o -CONHR⁴,
- R² representa H, o un halógeno, en particular el flúor, o un radical alquilo de C₁ a C₆ sustituido o no, lineal o ramificado, o -COR⁴, o -COOR⁴, o -CONHR⁴,
- 15 - R¹ y R₂ pueden formar juntos un anillo, tal como un arilo o un furano, sustituido o no,
- R³ representa H, o un halógeno, en particular el flúor, o un radical alquilo de C₁ a C₆ sustituido o no, lineal o ramificado, o -COR⁴, o -COOR⁴, o -CONHR⁴,
- 20 - siendo R⁴ H, o un radical alquilo de C₁ a C₆ sustituido o no, lineal o ramificado o un arilo, sustituido o no,
- M representa Na o K,
- Z representa un azúcar seleccionado de entre los azúcares siguientes: celobiosa, xilobiosa, maltosa, sacarosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa, xilano, glucano, xilotriosa, maltotriosa, celotriosa, xilotetraosa, o una mezcla de algunos de ellos,
- y en la que no pudiendo Z ser la galactosa cuando R¹ es H, R² y R³ son F y M es Na.

30

2. Sustrato según la reivindicación 1, caracterizado por que pertenece al grupo siguiente:

35

β-D-celobiosido 6,8-difluoro-7-hidroxicumarin-4-metanosulfonato de sodio, β-D-glucosido 6,8-difluoro-7-hidroxicumarin-4-metanosulfonato de sodio, β-D-xilosido 6,8-difluoro-7-hidroxicumarin-4-metanosulfonato de sodio, β-D-xilopolioloso 6,8-difluoro-7-hidroxicumarin-4-metanosulfonato de sodio, β-D-glucosido 5,6-benzo-7-hidroxicumarin-4-metanosulfonato de sodio, β-D-xilosido 5,6-benzo-7-hidroxicumarin-4-metanosulfonato de sodio, β-D-glucosido 7-hidroxi-8-metilcumarin-4-metanosulfonato de sodio, β-D-galactosido 7-hidroxi-8-metilcumarin-4-metanosulfonato de sodio.

40

3. Procedimiento de obtención de un sustrato según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que el injerto del azúcar sobre la cumarina se realiza en DMF.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que dicho injerto está seguido de una desprotección de las funciones de tipo acetal.

45

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado por que dicho azúcar está bromado antes de ser injertado en dicha cumarina.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado por que la purificación del sustrato se realiza por cromatografía de absorción sobre columna de sílice en fase inversa.

50

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizado por que el sustrato se obtiene por injerto de un azúcar sobre una cumarina sulfonada que comprende la reacción del derivado acetobromo de dicho azúcar con la cumarina sulfonada en DMF, y después la desprotección de las funciones de tipo acetal.

55

8. Detección de actividades glicosidasas (EC3.2.1) sobre unos extractos enzimáticos purificados o no o sobre unos microorganismos o sobre unas células, caracterizada por que dicha detección se realiza gracias a uno de los sustratos fluorogénicos según una de las reivindicaciones 1 o 2.

9. Detección de actividades glicosidasas (EC3.2.1) sobre unos extractos enzimáticos purificados o no o sobre unos microorganismos o sobre unas células según la reivindicación 8, caracterizada por que dichos extractos o microorganismos o células están compartimentados en gotitas acuosas en suspensión en una fase oleosa.
- 5 10. Detección de actividades glicosidasas (EC3.2.1) sobre unos extractos enzimáticos purificados o no o sobre unos microorganismos o sobre unas células según la reivindicación 9, caracterizada por que dichas gotitas acuosas son producidas por un dispositivo microfluídico.