



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105683389 B

(45) 授权公告日 2021.09.28

(21) 申请号 201480059481.1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014.10.29

C12Q 1/04 (2006.01)

(续)

(65) 同一申请的已公布的文献号

(56) 对比文件

申请公布号 CN 105683389 A

US 2008268468 A1, 2008.10.30

WO 2013107759 A1, 2013.07.25

(43) 申请公布日 2016.06.15

Firoz A. Jaipuri et al.. Synthesis and Quantitative Evaluation of Glycero-d-manno-heptose Binding to Concanavalin A by Fluorous-Tag Assistance.《Angew. Chem. Int. Ed.》.2008,第47卷(第9期),1707-1710.

(30) 优先权数据

Reiko Sadamoto et al.. Bacterial Surface Engineering Utilizing Glucosamine Phosphate Derivatives as Cell Wall Precursor Surrogates.《Chem. Eur. J.》.2008,第14卷(第33期),10192-10195.

13190794.1 2013.10.30 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Firoz A. Jaipuri et al.. Synthesis and Quantitative Evaluation of Glycero-d-manno-heptose Binding to Concanavalin A by Fluorous-Tag Assistance.《Angew. Chem. Int. Ed.》.2008,第47卷(第9期),1707-1710.

2016.04.28

(86) PCT国际申请的申请数据

(续)

PCT/EP2014/073252 2014.10.29

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2015/063173 EN 2015.05.07

(73) 专利权人 国家科学研究中心

地址 法国巴黎

专利权人 埃克斯-马赛大学

(72) 发明人 S·迪康 B·沃泽勒 A·巴龙

J·马斯庞斯

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

审查员 李楠

公司 11314

代理人 程伟 刘彬娜

权利要求书2页 说明书27页 附图6页

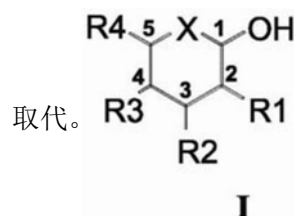
(54) 发明名称

包含使用修饰的单糖化合物的用于特异性标记活菌的方法

(57) 摘要

本发明涉及在包含细菌的样品中特异性标记给定类别的革兰氏阴性菌的活菌的方法,所述方法包括步骤:a)将所述样品的所述细菌与至少一种修饰的单糖化合物孵育,所述单糖化合物包含能够与第二反应基团反应的第一反应化学基团,以使带有所述第一反应基团的单糖残基被合并入该细菌的外膜的多糖中,和b)将所述合并入细菌外膜中的修饰的单糖残基与包含所述第二反应基团的标记分子接触。所述修饰的单糖化合物为具有下式(I)的化合物或其盐:其中X可以为

O、NH或S,R1、R2和R3可以独立地为H、OH、NH₂、被或不被其保护基取代的OH和NH₂,和R4为H或C₁至C₄的烷基链,每个碳被或不被OH或NH₂取代,所述OH或NH₂被或不被其保护基取代,和X、R1、R2、R3和R4基团中的至少一个被所述第一反应基团R'1



取代。

[接上页]

(51) Int.Cl.

G01N 33/58 (2006.01)

(56) 对比文件

Reiko Sadamoto et al..Bacterial

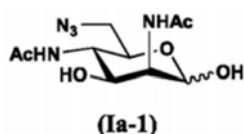
Surface Engineering Utilizing Glucosamine
Phosphate Derivatives as Cell Wall
Precursor Surrogates.《Chem. Eur. J.》
.2008,第14卷(第33期),10192-10195.

1. 一种修饰的单糖化合物在制备用于在包含细菌的样品中特异性标记活的嗜肺军团菌 *Legionella pneumophila* 的试剂的用途, 其中所述在包含细菌的样品中特异性标记活的嗜肺军团菌包括步骤:

a) 将所述样品的所述细菌与至少一种修饰的单糖化合物孵育, 所述单糖化合物包含能够与第二反应基团化学性反应的第一反应化学基团, 以使带有所述第一反应化学基团的单糖残基被合并入该细菌的外膜的多糖中, 和

b) 将所述合并入细菌外膜中的修饰的单糖残基与包含所述第二反应基团的标记分子接触, 以产生被合并入活菌的所述外膜中的所述单糖残基的所述第一反应化学基团与所述标记分子的所述第二反应基团的化学反应, 导致共价连接,

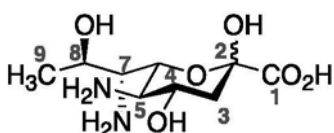
其特征在于, 所述修饰的单糖化合物为所述细菌的所述外膜的多糖的内源性酮糖酸残基的修饰的内源性前体, 所述修饰的单糖化合物具有下式 (Ia-1) 的化合物或其盐:



其中:

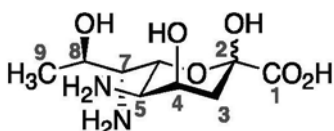
- (Ia-1) 为下式 (Ic-1) 和 (Ic-2) 的内源性单糖化合物的前体;

• (Ic-1) 为



可见于嗜肺军团菌;

• (Ic-2) 为



可见于嗜肺军团菌的LPS中。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中带有所述第一反应化学基团的单糖残基被合并入该细菌的外膜的LPS中。

3. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述在包含细菌的样品中特异性标记活的嗜肺军团菌包括进一步的步骤:

c) 检测活的嗜肺军团菌以检测所述细菌是否包含结合于它们的外膜的聚糖上的所述标记分子, 和/或将带有所述标记分子的所述活菌固定在固体基质上, 其中所述标记分子为包含可检测物质或能够与可检测物质反应或结合的分子, 或者所述标记分子为带有所述第二反应基团的第一分子, 所述第一分子能够与第二分子和/或固体基质反应或结合。

4. 根据权利要求3所述的用途, 其中所述第二分子包含可检测物质和/或所述第二分子结合于或能够结合于所述固体基质。

5. 根据权利要求3所述的用途, 其中修饰的单糖化合物用于在包含细菌的样品中特异性检测活的嗜肺军团菌, 其中所述标记分子为包含可检测物质的可检测分子, 所述在包含细菌的样品中特异性标记活的嗜肺军团菌包括检测活的嗜肺军团菌以检测所述细菌是否

包含结合于它们的外膜的聚糖上的所述可检测分子的步骤c)。

6. 根据权利要求3所述的用途,其中所述标记分子为带有所述第二反应基团的第一配体或第一结合蛋白,并且在步骤c)中偶联至所述第一配体或第一结合蛋白的所述活的嗜肺军团菌,通过将所述第一配体或第一结合蛋白与第二配体或第二结合蛋白接触被检测和/或固定,所述第二配体或第二结合蛋白与所述第一配体或第一结合蛋白特异性反应或结合。

7. 根据权利要求3所述的用途,其中所述标记分子为第一配体,所述第一配体带有所述第二反应基团,并且在步骤c)中偶联至所述第一配体的所述活菌通过所述细菌与特异于所述第一配体的抗体的反应被检测,所述抗体带有可检测物质。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述第一配体为生物素。

9. 根据权利要求7所述的用途,其中所述可检测物质为发冷光分子或酶。

10. 根据权利要求7所述的用途,其中所述可检测物质为荧光染料。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的用途,其中所述第一反应化学基团选自叠氮基或带有叠氮基的基团和炔基或带有炔基的基团,并且所述第二反应基团选自炔基和叠氮基或分别带有炔基和叠氮基的基团,通过进行叠氮炔烃环加成反应进行叠氮基反应基团与炔烃反应基团的反应。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述第一反应化学基团为叠氮基。

13. 根据权利要求11所述的用途,其中所述第二反应基团为炔基。

14. 一种试剂盒,其包含:

-被所述第一反应化学基团取代的如权利要求1所定义的式(Ia-1)的修饰的单糖化合物,所述化合物为能够被转化为修饰的内源性酮糖酸残基的修饰的前体,所述修饰的内源性酮糖酸残基被合并入嗜肺军团菌的外膜的多糖中,和

-标记分子,其包含能够与所述第一反应化学基团反应的所述第二反应基团,和

-如果需要,反应物,其用于产生被合并入所述细菌的所述外膜的聚糖中的所述残基的所述第一反应化学基团与所述标记分子的所述第二反应基团的反应。

15. 根据权利要求14所述的试剂盒,其中所述修饰的内源性酮糖酸残基被合并入嗜肺军团菌的外膜的LPS中。

16. 根据权利要求14所述的试剂盒,其进一步包含允许嗜肺军团菌的生长的培养或孵育介质。

17. 根据权利要求14所述的试剂盒,其进一步包含特异于嗜肺军团菌的生长的培养或孵育介质。

包含使用修饰的单糖化合物的用于特异性标记活菌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于标记活菌的方法,其包括将修饰的单糖化合物合并入革兰氏阴性菌外膜的多糖(尤其是LPS或CPS)中的物种特异性代谢多糖标记。本发明更特别地提供允许特异性标记尤其是嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)的方法,所述方法使用内源性单糖的前体,所述内源性单糖特异性存在于这种细菌的外膜的LPS中。

背景技术

[0002] W0 2013/107759公开了标记活菌更特别地是革兰氏阴性菌的方法。所述方法本质上在于通过同化作用将修饰的酮糖酸(ulosonic acid)型单糖化合物的类似物合并入所述细菌的细胞膜中,以使其带有所谓的第一反应化学官能团,如叠氮基($-N_3$)或炔基($-C\equiv CH$),从而使得该第一反应基团能够尤其通过所谓的点击化学反应(click chemistry reaction)与带有互补反应基团的分子反应。

[0003] 更特别地,在W0 2013/107759中已公开,这种包含酮糖酸或酮糖酸盐(ulosonate)残基的修饰的内源性糖的类似物是特别有利的,因为这样的残基可见于细菌细胞膜的聚糖中,尤其是所有革兰氏阴性菌的LPS中,而且,它们能够以相同的形式被直接同化,其中它们将被合并入所述革兰氏阴性菌的LPS的聚糖中。

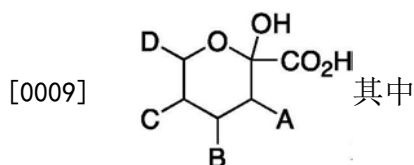
[0004] 酮糖酸(也称为酮糖首酸(ketoaldonic acid),或首酮糖酸(aldulosonic acid))是酮糖家族的单糖,其在C-2上存在酮官能团,并在C-1上存在羧酸。辛酮糖酸(octulosonic acid)和非酮糖酸(nonulosonic acid)见于多种天然聚糖中,包括不同形式的细菌聚糖(尤其是LPS、荚膜多糖、糖蛋白)中。导致这些聚糖细化(elaboration)的生物合成通路通常涉及作为中间体的游离酮糖酸,其然后以CMP-糖供体的形式被直接激活。所有革兰氏阴性菌的LPS都包含所述酮糖酸残基。

[0005] 更准确地,W0 2013/107759中公开的方法为在包含细菌的样品中特异性标记给定类别的细菌的活菌的方法,所述方法包括步骤:

[0006] a) 将所述样品的所述细菌和至少一种单糖化合物的类似物孵育,所述单糖为该给定类别的细菌的外膜聚糖的内源性单糖残基,所述内源性单糖残基包含酮糖酸或酮糖酸盐残基,所述单糖化合物的类似物为在给定位置被第一反应化学基团取代的修饰的单糖,所述第一反应化学基团能够与标记分子的第二反应基团反应,和

[0007] b) 将所述细菌与包含所述第二反应基团的所述标记分子接触,以产生合并入所述活菌的所述外膜聚糖中的所述类似物残基的所述第一反应基团与所述标记分子的所述第二反应基团的反应。

[0008] 特别地,在W0 2013/107759中,所述单糖类似物为具有下式(I')之一的取代酮糖酸或其酮糖酸盐:



[0010] -A、B和C可以独立地为H、OH、NH₂、被或不被其保护基取代的OH和NH₂，和

[0011] -D为C₂至C₄的烷基链，和

[0012] -A、B、C或D基团中的至少一个被所述第一反应基团取代。

[0013] 在WO 2013/107759中，在步骤a) 中与活菌孵育然后在被细菌同化后合并入其外膜中的所述单糖类似物，可以与合并入外膜的聚糖链中的内源性单糖相同，除非其仅被所述第一反应基团的取代所修饰。

发明内容

[0014] 本发明的目的在于发现改进的单糖化合物，所述单糖化合物能够被革兰氏阴性菌同化并被合并入它们外膜的LPS中呈现有利的性质，所述有利的性质是关于：涉及到相关类别的细菌的它们的合并特异性，和/或它们穿透细菌细胞的更强的能力，和/或它们化学合成的更大的容易性。

[0015] 根据本发明，已发现可以在步骤a) 中使用被所述第一反应基团修饰的单糖化合物，所述单糖化合物不同于该细菌的外膜聚糖的多糖的内源性单糖残基，如LPS或荚膜多糖(CPS)，然而其能够穿透并被合并入野生型细菌的外膜中，所述野生型细菌即在相应内源性单糖的生物合成通路中没有缺陷的细菌。

[0016] 根据本发明，被所述第一反应基团修饰的所述单糖化合物包含在其生物合成通路中的内源性单糖的前体。更特别地，本发明的这种前体的化合物分子的被所述第一反应基团取代的部分，不同于合并入外膜聚糖链中的内源性单糖残基，但是如下文所指定的，其被代谢为修饰的所述合并入外膜聚糖链中的内源性单糖残基，所述内源性单糖被所述第一反应基团修饰。

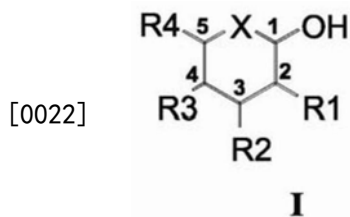
[0017] 更特别地，本发明提供在WO 2013/107759中公开并保护的上述式I' 的修饰的内源性单糖的前体。事实上，在孵育步骤a) 期间，本发明的修饰的前体被代谢并转化为修饰的单糖，所述单糖除了带有所述第一反应基团以外，为与该细菌外膜聚糖的内源性单糖残基相同的分子形式。

[0018] 更准确地，本发明提供一种在包含细菌的样品中特异性标记给定类别的细菌的活菌的方法，所述方法包括步骤：

[0019] a) 将所述样品的所述细菌与至少一种修饰的单糖化合物孵育，所述单糖化合物包含能够与第二反应基团化学性反应的第一反应化学基团，以使带有所述第一反应基团的单糖残基被合并入该细菌的外膜的多糖中，尤其是被合并入该细菌的外膜的LPS或CPS中，和

[0020] b) 将所述合并入细菌外膜中的修饰的单糖残基与包含所述第二反应基团的标记分子接触，以产生被合并入所述活菌的所述外膜中的所述单糖残基的所述第一反应基团与所述标记分子的所述第二反应基团的化学反应，导致共价连接，

[0021] 其特征在于，所述修饰的单糖化合物为所述细菌的所述外膜的多糖的内源性酮糖酸残基的修饰的内源性前体，所述修饰的单糖化合物具有下式(I) 或其盐：



[0023] 其中

[0024] -X可以为O、NH或S,优选O和NH,更优选O,和

[0025] -R1、R2和R3可以独立地为H、OH、NH₂、被或不被其保护基取代的OH和NH₂,优选被烷基、羟基烷基、酰基、甲酰基或亚胺酰基取代,和

[0026] -R4为H或C₁至C₄的烷基链,每个碳被或不被OH或NH₂取代,所述OH或NH₂被或不被其保护基取代,优选被烷基、羟基烷基、酰基、甲酰基或亚胺酰基取代,和

[0027] -X、R1、R2、R3和R4基团中的至少一个,优选R1、R3或R4,被所述第一反应基团Ra取代。

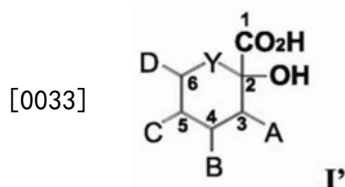
[0028] 所述第一和第二反应基团之间的所述化学反应导致共价连接,所述共价连接在一些实施例中可以为与配体配位的金属络合物中的共价配位连接。

[0029] 必须理解,所述修饰的单糖化合物的所述单糖为具有如式(I)的式但不具有所述第一反应基团的内源性前体(未修饰)。本发明的所述修饰的内源性前体比所述细菌的所述外膜的多糖的所述修饰的酮糖酸型内源性单糖残基更容易化学制备,而所述修饰的内源性前体在细菌细胞中被代谢,并导致在外膜内同化为不同的形式,即相关细菌的外膜多糖的所述修饰的内源性单糖残基的形式。

[0030] 本发明的这些前体的另一个优点在于,它们不包含极性基团如-COOH,因此可以更快和/或更容易地穿透入细菌细胞。

[0031] 本发明的这种前体的另一个优点在于,它们可以被代谢为数种不同的修饰的内源性单糖,所述内源性单糖分别存在于相同细菌种的不同血清组或亚种中,如下文所进一步指定的,所述细菌种与嗜肺军团菌种有关。

[0032] 更特别地,已发现在同化过程期间,所述以上定义的式I的化合物可以被细菌转化为下式I'的修饰的酮糖酸型内源性单糖:



[0034] 其中:

[0035] -Y为O或NH使得R2=YH,当R2为OH时Y为O,且当R2为NH₂时Y为NH;

[0036] -A可以独立地为H、OH、NH₂,优选H或OH,其被或不被其保护基取代,优选被烷基、羟基烷基、酰基、甲酰基或亚胺酰基取代,和

[0037] -B可以独立地为H、OH、NH₂,优选OH或NH₂,其被或不被其保护基取代,优选被烷基、羟基烷基、酰基(Ac)、甲酰基或亚胺酰基取代,和

[0038] -C为R1,和

[0039] -D为-CHR3-CXHR4。

[0040] 因此,在所述式I的修饰的前体中,R1、R2、R3和R4被包含于如上所提及的所述式I'的修饰的酮糖酸型内源性单糖的Y、C和D中。

[0041] 这种式(I)的化合物可以被一系列革兰氏阴性菌同化,并以其外膜的LPS的聚糖的修饰的内源性单糖残基的形式被合并入该细菌的外膜中,所述内源性单糖残基包含酮糖酸或酮糖酸盐残基,在所述修饰的单糖化合物合并入所述外膜的聚糖后,所述第一反应基团在所述修饰的内源性单糖残基中的游离基团的位置。

[0042] 已发现,如果以足够高的浓度,尤其是以至少 10^{-5} M的浓度,更特别地以 10^{-5} M至1M的浓度使用式(I)的化合物,其可以与相应的天然前体竞争成功地进入。

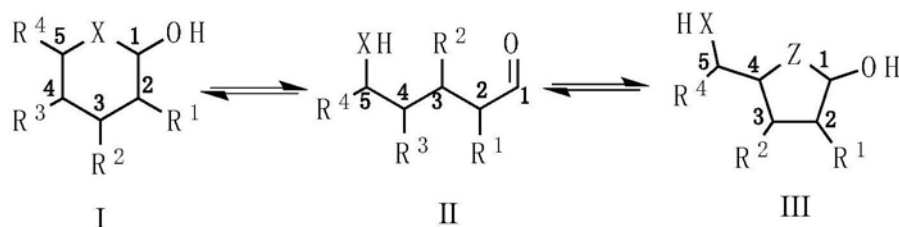
[0043] 更特别地,步骤a)的孵育时间为1小时至24小时,优选2小时至12小时,并且修饰的单糖化合物的浓度为 10^{-5} M至1M,用于检测优选不高于 10^{11} 细胞/ml,更特别地不高于 10^9 细胞/ml的细菌浓度。

[0044] 更特别地,对于OH,所述保护基可以优选为烷基、羟基烷基、酰基或甲酰基。

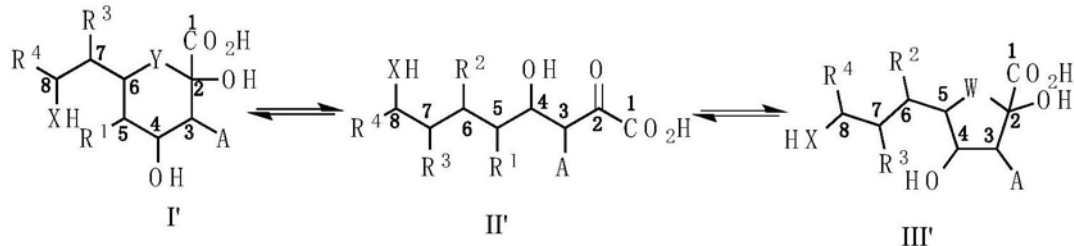
[0045] 更特别地,对于 NH_2 ,所述保护基可以选自烷基、羟基烷基、酰基、甲酰基或亚胺酰基。

[0046] NH_2 可以被一个或两个保护基保护,尤其是被一个 CH_3 基团和一个烷基、羟基烷基、酰基、甲酰基或亚胺酰基保护。更特别地,在以上的式I中, NH_2 基团可以为N-乙酰基(NHAc)的形式,或者可以为N-乙酰亚胺酰基(NHAm)、N-(N-甲基乙酰亚胺酰基)、N-(N,N-二甲基乙酰亚胺酰基)、N-甲酰基(NHfO)、NH-羟基丁酰基(NH-Hb)的形式,并且可以进一步被或不被N-甲基化。

[0047] 应注意的是,式I和I'的化合物可以分别与下式II和III的化合物以及下式II'和III'的化合物相平衡,如下:



[0048]



[0049] W、Y和Z为O或NH,以使得R1=WH、R2=YH和R3=ZH。

[0050] 在步骤a)中,所述第一反应基团优选在所述单糖化合物的一个位置上被取代,所述单糖化合物的该位置包含合并入细菌外膜的所述多糖中的所述内源性单糖残基中的游离基团。“游离基团”是指在所述LPS内未参与共价键的位置。

[0051] 可以使用式I的化合物来标记革兰氏阴性病原体菌,所述革兰氏阴性病原体菌在它们的外膜LPS中具有游离酮糖酸或酮糖酸盐残基位置中的至少一个,其可以选自以下这

些,化合物为酮糖酸或其盐的类型的内源性单糖的前体,其尤其可以在以下属的细菌中发现:军团菌属、假单胞菌属、梭菌属、弯曲杆菌属、不动杆菌属、弧菌属、李斯特菌属、埃希氏菌属、假交替单胞菌属、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、志贺氏菌属、耶尔森氏菌属、希瓦氏菌属(*Schewanella*)、沙门氏菌属、普罗威登斯菌属(*Providentia*)、变形杆菌属、黄杆菌属(*Tenacibaculum*)、拟杆菌属、巴尔通氏体属、博德特氏菌属、短螺菌属(*Brachyspira*)、布鲁氏菌属、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、嗜衣原体属(*Chlamydophila*)、考克斯氏体属、弗朗西斯氏菌属、心杆菌属、爱德华氏菌属、埃立克体属(*Ehrlichia*)、艾肯菌属、伊丽莎白氏菌属(*Elizabethkingia*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、梭杆菌属、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、螺杆菌属、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、钩端螺旋体属、摩根氏菌属、奈瑟氏菌属、新立克次氏体属、巴氏杆菌属、邻单胞菌属、卟啉单胞菌属、普氏菌属、普罗威登斯菌属(*Providencia*)、立克次氏体属、链杆菌属、密螺旋体属。

[0052] 更特别地,所述细菌选自鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、杆菌状巴尔通体(*Bartonella bacilliformis*)、五日热巴尔通体(*Bartonella quintana*) (五日热罗卡利马氏体(*Rochalimaea quintana*))、巴尔通氏体属(*Bartonella* spp.) (罗卡利马氏体属(*Rochalimaea* spp.))、支气管炎博德特氏菌(*Bordetella bronchiseptica*)、副百日咳博德特氏菌(*Bordetella parapertussis*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、短螺菌属(*Brachyspira* spp)、羊布鲁氏杆菌(*Brucella melitensis*) (狭义(*sensu stricto*))、流产羊布鲁氏菌生化变种(*Brucella melitensis* biovar *Abortus*) (流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*))、犬属羊布鲁氏菌生化变种(*Brucella melitensis* biovar *Canis*) (犬属布鲁氏菌(*Brucella canis*))、猪属羊布鲁氏菌生化变种(*Brucella melitensis* biovar *Suis*) (猪属布鲁氏菌(*Brucella suis*))、鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia mallei*) (鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas mallei*))、类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*) (类鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas pseudomallei*))、鹦鹉热衣原体(*Chlamydophila psittaci*) (鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*))、伯纳特氏立克次氏体(*Coxiella burneti*)、土拉热弗朗西斯氏菌土拉热亚种(*Francisella tularensis* subsp. *Tularensis*) (“土拉热弗朗西斯氏菌新北亚种” (“*Francisella tularensis* subsp. *nearctica*”))、土拉热型土拉热弗朗西斯氏菌生化变种(*Francisella tularensis* biovar *Tularensis*)、A型土拉热弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis* type A))、胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、弯曲菌属(*Campylobacter* spp)、人类心杆菌(*Cardiobacterium hominis*)、流产衣原体(*Chlamydophila abortus*)、豚鼠衣原体(*Chlamydophila caviae*)、猫衣原体(*Chlamydophila felis*)、肺炎衣原体(*Chlamydophila pneumoniae*) (肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*))、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、埃立克立属(*Ehrlichia* spp)、侵蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)、脑膜脓毒性伊丽莎白氏菌(*Elizabethkingia meningoseptica*) (脑膜炎败血性黄杆菌(*Flavobacterium meningosepticum*))、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、脑膜脓毒性(eningosepticum))、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) (=活动克雷伯氏菌(*Klebsiella mobilis*))、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、肠杆菌属(*Enterobacter* spp)、肠球菌属(*Enterococcus* spp)、大肠杆菌、土拉热弗朗西斯氏菌全北区亚种(*Francisella tularensis*

subsp.holarctica) (“土拉热弗朗西斯氏菌古北区变种” (“*Francisella tularensis* var.palaeartica”))、B型土拉热弗朗西斯氏菌)、坏死梭杆菌 (*Fusobacterium necrophorum*)、杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、嗜血杆菌属 (*Haemophilus* spp)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、幽门弯曲菌 (*Campylobacter pylori*)、产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、克雷伯菌属 (*Klebsiella* spp)、博兹曼军团菌 (*Legionella bozemanii* corrig.) (博兹曼荧光杆菌 (*Fluoribacter bozemanii*))、嗜肺军团菌、军团菌属 (*Legionella* spp)、问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*)、广义上包括亚历山大钩端螺旋体的问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans sensu lato* inclut *Leptospira alexanderi*)、博氏钩端螺旋体 (*Leptospira borgpetersenii*)、芬氏钩端螺旋体 (*Leptospira fainei*)、稻田钩端螺旋体 (*Leptospira inadai*)、问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*)、科氏钩端螺旋体 (*Leptospira kirschneri*)、野口氏钩端螺旋体 (*Leptospira noguchii*)、圣地罗西钩端螺旋体 (*Leptospira santarosai*)、韦氏钩端螺旋体 (*Leptospira weilii*)、摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*) (摩氏变形杆菌 (*Proteus morganii*))、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、腺热新立克次体 (*Neorickettsia sennetsu*) (腺热埃立克体 (*Ehrlichia sennetsu*))、腺热立克次体 (*Rickettsia sennetsu*))、出血败血性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*)、巴氏杆菌属 (*Pasteurella* spp)、类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*)、卟啉单胞菌属 (*Porphyromonas* spp)、普氏菌属 (*Prevotella* spp)、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)、彭氏变形杆菌 (*Proteus penneri*)、普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)、产碱普罗威登斯菌 (*Providencia alcalifaciens*)、雷氏普罗威登斯菌 (*Providencia rettgeri*) (雷氏变形杆菌 (*Proteus rettgeri*))、斯氏普罗威登斯菌 (*Providencia stuarti*)、普罗威登斯菌属 (*Providencia* spp)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、大西洋假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas atlantica*)、识别假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas distincta*)、立克次体属 (*Rickettsia* spp) 不包括恙虫病东方体 (立克次体) (*Orientia* (*Rickettsia*) *tsutsugamushi*)、小株立克次体 (*Rickettsia akari*)、加拿大痘立克次体 (*Rickettsia canadensis*)、康氏立克次体 (*Rickettsia conorii*)、蒙大拿立克次体 (*Rickettsia montanensis*)、普氏立克次体 (*Rickettsia prowazekii*)、立氏立克次体 (*Rickettsia rickettsii*) 和斑疹伤寒立克次体 (*Rickettsia typhi*)、肠炎沙门氏菌亚利桑那亚种 (*Salmonella enterica* subsp.Arizonae) (亚利桑那沙门氏菌 (*Salmonella arizonae*))、猪霍乱沙门氏菌亚利桑那亚种 (*Salmonella choleraesuis* subsp.arizonae))、肠道沙门氏菌肠道亚种肠炎血清型 (*Salmonella enterica* subsp.enterica sérovar Enteritidis) (肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*))、肠道沙门氏菌肠道亚种甲型副伤寒血清型 (*Salmonella enterica* subsp.enterica sérovar Paratyphi A) (副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi*))、乙型副伤寒血清型和丙型副伤寒血清型、肠道沙门氏菌肠道亚种鼠伤寒血清型 (*Salmonella enterica* subsp.enterica sérovar Typhimurium) (鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*))、日本希瓦氏菌 (*Schewanella japonica*)、腐败希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*)、鲍氏志贺氏菌

(*Shigella boydi*)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)除了1型、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*)、念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*)、海水黄杆菌(*Tenacibaculum maritimum*)、斑点病密螺旋体(*Treponema carateum*)、梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)、“细弱密螺旋体(*Treponema pertenuis*)”(“苍白密螺旋体细长亚种(*Treponema pallidum* subsp. *pertenuis*)”)、密螺旋体属(*Treponema* spp)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、副溶血性弧菌(*vibrio parahaemolyticus*) (=副溶血性贝内克氏菌(*Beneckea parahaemolytica*))、弧菌属(*Vibrio* spp)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、鲁氏耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)和假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)。

[0053] 优选地,所述修饰的单糖化合物为具有式(I)的化合物或其盐,其中:

[0054] -X为O,和

[0055] -R1为H、OH、NH₂、被或不被所述保护基取代的OH和NH₂,和

[0056] -R3为被或不被其保护基优选Ac取代的NH₂;

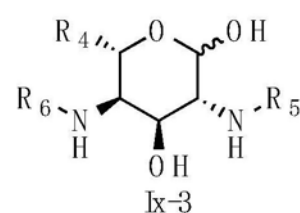
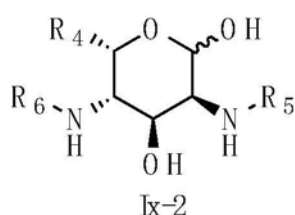
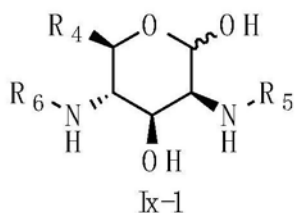
[0057] -R2为被其保护基取代或优选不取代的OH,和

[0058] -R1、R3和R4中的至少一个被所述第一反应基团Ra取代。

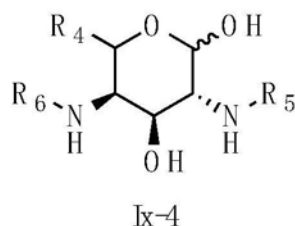
[0059] 更特别地,R4为-CH₃、-CH₂OH或-CH₂NH₂,这些基团被所述第一反应基团Ra取代。

[0060] 优选地,所述细菌为革兰氏阴性菌,在其外膜的LPS层中包含内源性单糖残基,并且以上后面的化合物可以用于标记所述细菌,优选选自以下提及的细菌:嗜肺军团菌、溶藻弧菌、鲍曼不动杆菌、荧光假单胞菌、杀鲑弧菌(*Vibrio salmonicida*)、海水黄杆菌(之前称为海水屈挠杆菌(*Flexibacter maritimus*))、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、日本希瓦氏菌、斯氏普罗威登斯菌、铜绿假单胞菌、鲁氏耶尔森氏菌、亚利桑那沙门氏菌、摩氏摩根菌、腐败希瓦氏菌、鲍氏志贺氏菌、普通变形杆菌、大西洋假交替单胞菌、识别假交替单胞菌、费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)、霍乱弧菌、大西洋假交替单胞菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、大肠弯曲杆菌(*Campylobacter coli*)、肉毒梭状芽胞杆菌(*Clostridium botulinum*)和小肠结肠炎耶尔森氏菌。

[0061] 更特别地,所述修饰的单糖化合物为具有下式(Ix-1)至(Ix-4)之一的化合物或其盐:



[0062]



[0063] 其中

[0064] -R₄为H或C₁至C₄的烷基链,每个碳被或不被OH或NH₂取代,所述OH或NH₂被或不被其保护基取代,优选被烷基、羟基烷基、酰基、甲酰基或亚胺酰基取代,R₄优选为H、CH₃、CH₂OH或CH₂NH₂和

[0065] -R₅、R₆可以独立地为被或不被取代的烷基、羟基烷基、酰基、甲酰基或亚胺酰基,R₅和R₆优选为酰基(Ac),和

[0066] -R₄、R₅和R₆基团中的至少一个被所述第一反应基团取代。

[0067] 更特别地,所述修饰的单糖化合物为具有式(I)的化合物或其盐,其中:

[0068] -X为O,和

[0069] -R₁和R₃为被或不被其保护基取代的NH₂,和

[0070] -R₂为被其保护基取代或优选不被取代的OH,和

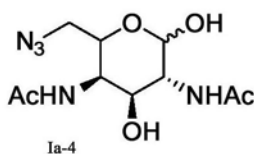
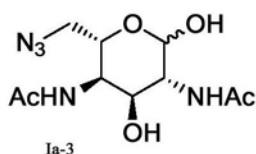
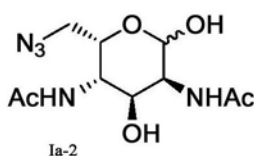
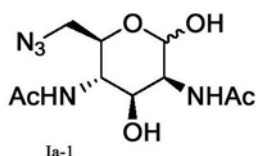
[0071] -R₄被Ra取代,Ra为所述第一反应基团,所述第一反应基团优选为N₃,R₄优选为被Ra取代的CH₃、CH₂OH或CH₂NH₂。

[0072] 更特别地,所述修饰的单糖化合物选自以下化合物Ia和Ib:

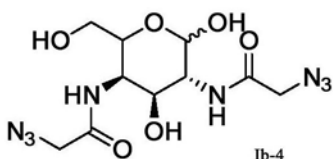
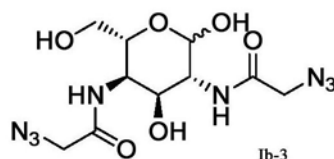
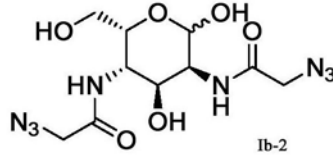
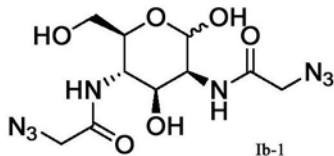
[0073] -化合物Ia为具有式(I)的化合物,其中R₁和R₃为-NHAc,R₂为-OAc或优选为OH,R₄为CH₂-Ra,优选为CH₂-N₃;和

[0074] -化合物Ib为具有式(I)的化合物,其中R₁和R₃为-NHCOCH₂Ra,Ra优选为N₃,R₂为-OAc或优选为OH,R₄为CH₂OH。

[0075] 更特别地,所述修饰的单糖化合物为具有以下立体异构体式(Ia-1)至(Ia-4)和(Ib-1)至(Ib-4)之一的化合物或其盐:



[0076]



[0077] 式Ia-1和Ib-1被纳入式Ix-1中。

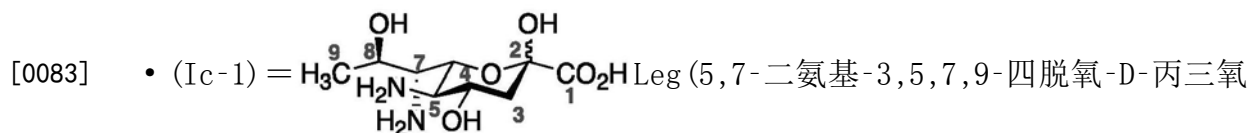
[0078] 式(Ix-1)至(Ix-4)的化合物的单糖部分分别为以下式Ic-1至Ic-5的非酮糖酸型内源性单糖的前体,即:

[0079] - (Ix-1)为下式(Ic-1)和(Ic-2)的内源性单糖化合物的前体;

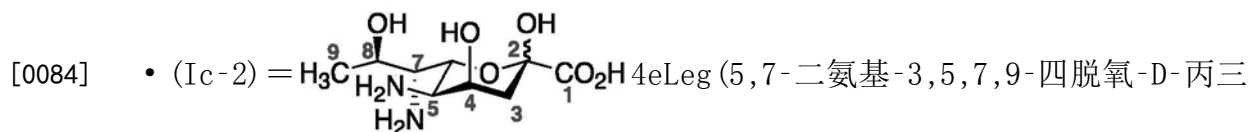
[0080] - (Ix-2)为下式(Ic-3)的内源性单糖化合物的前体;

[0081] - (Ix-3)为下式(Ic-4)的内源性单糖化合物的前体;和

[0082] - (Ix-4)为下式(Ic-5)的内源性单糖化合物的前体。



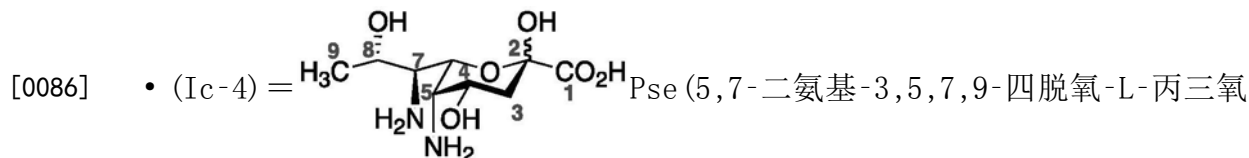
基-D-半乳糖-非-2-酮糖酸), (Ib-6) 可见于嗜肺军团菌、溶藻弧菌、鲍曼不动杆菌、荧光假单胞菌和杀鲑弧菌中。



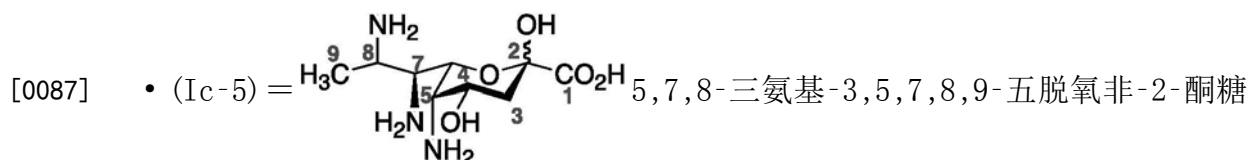
氧基-D-塔罗糖-非-2-酮糖酸), (Ib-1) 可见于嗜肺军团菌的LPS中和日本希瓦氏菌中。



基-D-半乳糖-非-2-酮糖酸), (Ib-2) 可见于大肠杆菌菌株、斯氏普罗威登斯菌、铜绿假单胞菌、鲁氏耶尔森氏菌、亚利桑那沙门氏菌、摩氏摩根菌、腐败希瓦氏菌中。



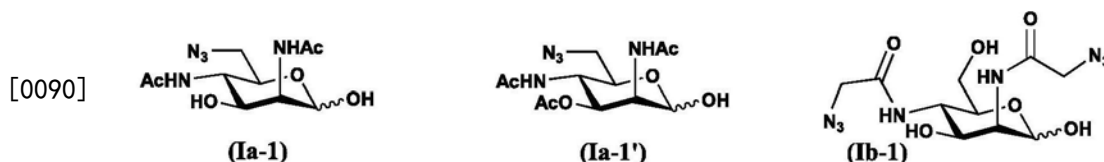
基-L-甘露糖-非-2-酮糖酸), (Ib-5) 可见于铜绿假单胞菌、鲍氏志贺氏菌、大肠杆菌、普通变形杆菌、大西洋假交替单胞菌、识别假交替单胞菌、费氏中华根瘤菌和霍乱弧菌、大西洋假交替单胞菌的O-抗原(LPS)中,和韩国生工菌属(Kribella spp.) 5(革兰氏+)和犹他游动放线菌(Actinoplanes utahensis) (革兰氏+)的细胞壁中,和副溶血性弧菌的LPS核心中,和空肠弯曲菌、大肠弯曲杆菌、幽门螺杆菌和肉毒梭状芽胞杆菌的鞭毛糖蛋白中,以及中华根瘤菌属细菌的CPS中。



酸(C-8构型未知) 可见于海水黄杆菌(之前称为海水屈挠杆菌)中。

[0088] 因此,对于式Ia-1至Ia-4的化合物,所述细菌优选选自嗜肺军团菌、溶藻弧菌、鲍曼不动杆菌、荧光假单胞菌、杀鲑弧菌、日本希瓦氏菌、铜绿假单胞菌和海水黄杆菌。

[0089] 更优选地,本发明所述修饰的单糖化合物为具有下式(Ia-1)、(Ia-1')、(Ib-1)之一的化合物或其盐:



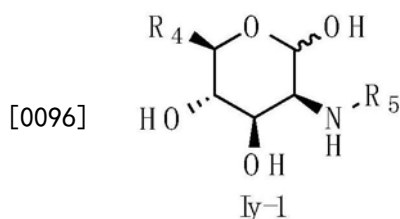
[0091] 在一个优选的实施方案中,所述方法能够用所述式Ia-1或Ib-1的化合物标记活的嗜肺军团菌。

[0092] 在实践中,取自含有其中可以发现嗜肺军团菌的环境介质的水(如来自空调装置或设备尤其是冷却塔或其他含有水的装置如游泳池的水)的样品不包含含有所述式(Ic-1)或(Ic-2)的内源性残基的其他细菌,以使得如果检测到标记,所述方法可以被视为特异性标记嗜肺军团菌。

[0093] 嗜肺军团菌为定期爆发所涉及的一种病原体细菌,所述定期爆发的特征在于相对高的致死率和重大社会影响为特征的。定期监测环境水样中这种细菌的存在是必要的,以预防这些疾病流行事件,但是传统的基于培养的检测和鉴定方法需要长达10天时间。本发明提供一种方法,所述方法允许更快速特异性鉴定嗜肺军团菌,同时其他军团菌属物种和其他属不被标记。

[0094] 这种化合物Ia-1(6-叠氮基-2,4-二乙酰氨基-2,4,6-三脱氧-D-吡喃甘露糖)可以穿透嗜肺军团菌的大多数血清组,并被代谢为Leg-N₃和/或4eLeg-N₃,并被合并入外膜中细菌外膜的所述LPS层的所述内源性单糖残基中,其可以为4eLeg(4-epilegionaminic acid或5,7-二氨基-3,5,7,9-四脱氧-D-丙三氧基-D-塔罗糖-非-2-酮糖酸)或4-epilegionamate残基,或leg(legionaminic acid=(5,7-二氨基-3,5,7,9-四脱氧-D-丙三氧基-D-半乳糖-非-2-酮糖酸)或legionamate残基,这两种内源性单糖4eLeg和Leg存在于嗜肺军团菌物种的大多数各种不同的血清组中,尤其是其在经测试的嗜肺军团菌的各种不同的血清组已有显示。

[0095] 更特别地,所述修饰的单糖化合物为具有下式(Iy-1)的化合物或其盐,其中:



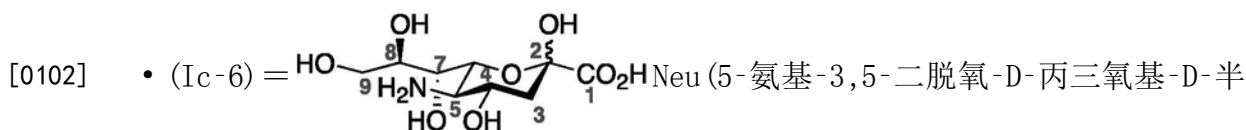
[0097] 其中

[0098] -R₄为H或C₁至C₄的烷基链,每个碳被或不被OH或NH₂取代,所述OH或NH₂被或不被其保护基取代,优选被烷基、羟基烷基、酰基、甲酰基或亚胺酰基取代,R₄优选为CH₂OH,和

[0099] -R₅可以为被或不被取代的烷基、羟基烷基、酰基、甲酰基或亚胺酰基,R₅优选为COCH₃,和

[0100] -R₄和R₅基团中的至少一个被所述第一反应基团取代。

[0101] 式(Iy-1)的化合物的单糖部分为下式Ic-6的非酮糖酸型内源性单糖的前体,即:



乳糖-非-2-酮糖酸), (Ic-6) 可见于大肠杆菌、脑膜炎奈瑟氏菌、非液化莫拉菌 (*Moraxella nonliquefaciens*)、和溶血性曼海姆氏菌 (巴氏杆菌) (*Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (革兰氏+)、猪链球菌 (*Streptococcus suis*) (革兰氏+) 的CPS中, 和包括蜂房哈夫尼菌 (*Hafnia alvei*)、艾伯替埃希氏菌 (*Escherichia albertii*)、肠炎沙门氏菌、大肠杆菌、枸橼酸杆菌 (*Citrobacter*)、霍乱弧菌、海藻希瓦氏菌 (*Shewanella algae*) 的细菌的LPS O-抗原中, 和包括脑膜炎奈瑟氏菌、淋病奈瑟氏菌、流感嗜血杆菌、杜克雷嗜血杆菌、睡眠嗜组织菌 (*Histophilus somni*)、空肠弯曲菌和幽门螺杆菌的一些病原体的LPS核心中。

[0103] 在另一个特别的实施方案中, 所述方法能够特异性标记活的铜绿假单胞菌, 并且细菌外膜的所述LPS层的所述内源性单糖残基为:

[0104] -8-epilegionaminic acid (5,7-二氨基-3,5,7,9-四脱氧-L-丙三氧基-D-半乳糖-非-2-酮糖酸) 或8-epilegionamate残基, 所述修饰的单糖化合物为式 (Ia-2) 的化合物

[0105] -或pseudaminic acid (5,7-二氨基-3,5,7,9-四脱氧-L-丙三氧基-L-甘露糖-非-2-酮糖酸) 或pseudamate残基, 并且所述修饰的单糖化合物为式 (Ia-3) 的化合物。

[0106] 活的细菌包含能够繁殖的细菌和不能繁殖的有活力的细菌。鉴于大多数卫生法规涉及能够繁殖 (尤其是能够在固体生长介质上繁殖) 的细菌的数目, 有利地, 本发明更特别地提供一种用于特异性标记能够繁殖的细菌的方法, 其中在培养基中 (液态介质中) 或 (固体介质上) 孵育所述细菌, 所述细菌能够在所述培养基中繁殖。

[0107] 严重的病原体隐藏在革兰氏阴性菌中, 快速鉴定有活力的细胞代表主要的卫生挑战。本发明的修饰的单糖被细菌快速同化, 并且能够对其快速标记和检测, 对于代谢活性/有活力的野生型革兰氏阴性菌, 整个过程花费少于一天。有活力细菌的常见检测通常需要2天到一个月以上 (取决于细菌株), 相比于此本方法是非常快速的。

[0108] 有利地, 本发明包括检测活菌的另外的步骤 (c), 以检测所述细菌是否包含结合于它们外膜的聚糖上的标记分子, 和/或将带有所述标记分子的所述活菌固定至固体基质上, 其中所述标记分子是包含可检测物质的分子, 或能够与可检测物质反应或结合的分子, 或所述标记分子是带有所述第二反应基团的第一分子, 所述第一分子能够与第二分子和/或固体基质反应或结合, 优选所述第二分子包含可检测物质和/或所述第二分子结合于或能够结合于所述固体基质。

[0109] 因此, 本发明能够 (a) 计算被检测的活菌的数量或鉴定被检测的活菌以及 (b) 浓缩和/或分离被固定于固体支持物上的活菌; 尤其是使用由带有所述第二反应基团的磁珠构成的固体支持物。

[0110] 更特别地, 所述方法能够在包含细菌的样品中特异性检测给定类别的细菌的活菌, 其中所述标记分子为包含可检测物质的可检测分子, 所述方法包括检测活菌的步骤c) 以检测所述细菌是否包含结合于它们外膜的聚糖上的所述可检测分子。

[0111] 可以在液态介质中或固体基质上进行所述检测步骤c)。

[0112] 更特别地, 可以用通过荧光检测的可检测基质物质进行检测。

[0113] 更特别地, 所述标记分子是带有所述第二反应基团的第一配体或第一结合蛋白, 并且在步骤c) 中偶联至所述第一配体或第一结合蛋白的所述活菌, 通过使所述第一配体或第一结合蛋白与第二配体或第二结合蛋白接触被检测和/或固定, 所述第二配体或第二结

合蛋白与所述第一配体或第一结合蛋白特异性反应或结合。

[0114] 更特别地,所述标记分子是第一配体,优选生物素,所述第一配体带有所述第二反应基团,并且在步骤c)中偶联至所述第一配体的所述活菌通过所述细菌与特异于所述第一配体的抗体或另一种蛋白质的反应被检测,所述抗体带有可检测物质,优选荧光染料或发光分子或酶。

[0115] 更特别地,所述第一反应基团选自叠氮基或带有叠氮基的基团和存在于炔基或带有炔基的基团,所述第一反应基团优选为叠氮基,并且所述第二反应基团选自炔基和叠氮基或分别带有炔基和叠氮基的基团,所述第二反应基团优选为炔基,并且通过进行叠氮炔环加成反应进行所述叠氮基反应基团与所述炔基反应基团的反应。

[0116] 本发明还提供用于进行本发明的方法的试剂盒,其包含:

[0117] -被所述第一反应基团取代的所述式(I)的单糖化合物的类似物,所述式(I)的化合物为能够被转化为修饰的内源性酮糖酸残基的修饰的前体,所述修饰的内源性酮糖酸残基被合并入细菌的外膜的多糖中,尤其是被合并入该细菌外膜的LPS或CPS中,和

[0118] -所述标记分子,其包含能够与所述第一反应基团反应的所述第二反应基团,和

[0119] -如果需要,反应物,其用于产生被合并入所述细菌的所述外膜的聚糖中的所述类似物残基的所述第一反应基团与所述标记分子的所述第二反应基团的反应,和

[0120] -优选地,允许所述给定类别的细菌生长的培养或孵育介质,优选特异于所述给定类别的细菌的的生长培养或孵育介质。

[0121] 优选地,所述第一反应基团Ra选自叠氮基($-N_3$)或带有叠氮基($-N_3$)的基团和炔基($-C\equiv C-$)或带有炔基($-C\equiv C-$)的基团,并且所述第二反应基团Rb选自炔基($-C\equiv C-$)和叠氮基($-N_3$)或分别带有炔基($-C\equiv C-$)和叠氮基($-N_3$)的基团,并且通过进行叠氮炔环加成反应进行所述叠氮基反应基团与所述炔基($-C\equiv C-$)的反应。

[0122] 叠氮炔环加成反应是众所周知的在铜催化剂存在或不存在的所谓的点击化学反应,其中叠氮基与炔基反应得到三氮唑。更特别地,可以在三-三氮唑基配体,优选TGTA的存在下,在铜催化条件下进行反应。更特别地,可检测分子为带有末端炔基的荧光染料。

[0123] 更特别地,可以在三-三氮唑配体如TGTA(三((1-(β -D-吡喃葡萄糖基)-1H-[1,2,3]-三氮唑-4-基)甲基)胺)或TBTA(三-[(1-苄基-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)甲基]胺)和带有末端炔基的Alexa标记分子的存在下,使用催化剂进行反应,从而进行所述荧光染料与所述式(I)的类似物化合物的叠氮炔环化加成反应,其中所述三-三氮唑配体。

[0124] 其它合适的常用配体为:三(3-羟丙基三氮唑基甲基)胺(THPTA)、2-(4-((双((1-叔-丁基-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)甲基)氨基)甲基)-1H-1,2,3-三氮唑-1-基)乙磺酸(BTTES)、三((1-((O-乙基)羧甲基)-(1,2,3-三氮唑-4-基))甲基)胺、红菲绕啉二磺酸盐(bathophenanthroline disulfonate)、或三(2-苯并咪唑基甲基)胺(53)。

[0125] 可选地,如果使用带有张力的炔(strained alkyne),如氮杂二苯并环辛炔(azadibenzocyclooctyne)(ADIBO、DIBAC或DBC0)或四甲基二苯并环辛炔(tetramethyldibenzocyclooctyne)(TMDIBO),可以在铜不存在下进行叠氮炔环化加成反应。

[0126] 常用于无铜反应的其他合适的带有张力的炔包括:环辛炔(OCT)、无芳基环辛炔(ALO)、单氟环辛炔(MOF0)、二氟环辛炔(DIF0)、二苯并环辛炔(DIBO)、二甲氧基氮杂环辛炔

(DIMAC)、双芳基氮杂环辛炔酮 (BARAC)、双环壬炔 (BCN)、四甲基硫杂卓 (tetramethylthiepinium) (TMTI、TMTH)、二氟苯并环辛炔 (DIFBO)、氧杂-二苯并环辛炔 (ODIBO)、羧甲基单苯并环辛炔 (COMBO)、或苯并环壬炔。

[0127] 其它反应基团和其它反应可以为,如:施陶丁格连接 (Staudinger Ligation) (第一反应基团=叠氮,并且第二反应基团=膦)、无铜点击化学 (第一反应基团=叠氮,并且第二反应基团=受到约束的炔 (环内炔))、羰基缩合 (第一反应基团=醛或酮,并且第二个反应基团=酰肼或醇胺)、硫醇-烯点击化学 (第一反应基团=硫醇,并且第二反应基团=烯炔)、腈-氧化物-烯点击化学 (第一反应基团=腈氧化物或醛、腈、或羟肟氯 (hydroxymoyl chloride) 或氯肟 (chlororoxime),并且第二反应基团=烯炔或炔炔)、腈亚胺-烯点击化学 (第一反应基团=腈亚胺或醛、腈、或腈酰氯 (hydrazonoyl chloride) 或氯腈 (chlorohydrazone),并且第二反应基团=烯炔或炔炔)、反电子需求的狄尔斯-阿尔德连接 (inverse electron demand Diels-Alder ligation) (第一反应基团=烯炔,并且第二反应基团=四嗪)、异腈-四嗪点击化学 (第一反应基团=异腈,并且第二反应基团=四嗪)、铃木-宫浦 (Suzuki-Miyaura) 偶联 (第一反应基团=芳卤,并且第二反应基团=芳基硼酸酯)、His-tag (第一反应基团=寡-组氨酸,并且第二反应基团=镍-复合物或镍配体)。

[0128] 在以上提及的参与反应的基团列表中,所述第一反应基团和所述第二反应基团可以交换。全部以上提及的化学反应都导致共价连接。

[0129] 可以在细菌样品与两种所述不同的单糖类似物化合物和两种不同的可检测分子的孵育中获得其它和更高的检测特异性。

[0130] 在本发明方法的另一个特别的实施方案中,在膜过滤器上进行所述步骤a)的孵育和步骤b)的反应,以使得经繁殖的源自相同原始细菌的培养的细菌被集合到一起,并且可以用显微镜观察,并且可以通过用所述显微镜观察检测所述可检测分子。因此,可以由此定量可培养的细菌的数目。

[0131] 该实施方案使得能够在同化所述修饰的单糖之前在所述膜过滤器(如聚酯膜)上过滤受试样品,以避免由于同化期间的可能生长而高估有活力的细菌。事实上,当固定于这种膜的顶部的细胞开始生长时,它们在一起并形成微菌落,由于来自于相同的单细胞,所述微菌落可以被容易地检测。因此,这使得能够通过计算可培养的细菌来计数。

[0132] 本发明还提供用于进行本发明的方法的试剂盒,其进一步包含允许所述给定类别的细菌的生长的培养或孵育介质,优选特异于所述给定类别的细菌的生长的培养或孵育介质。

[0133] 优选地,所述培养或孵育介质进一步包含增强和/或加快所述给定类别的细菌的生长速度和/或形成菌落的能力的试剂。更特别地,所述孵育介质包含至少一种抗氧化剂,如丙酮酸盐或过氧化氢酶。

[0134] 为了特异性标记革兰氏阴性菌,在步骤a)和b)中使用特异于革兰氏阴性菌的培养介质可以是更有利的,从而不允许革兰氏阳性菌的培养。

[0135] 更特别地,在一个实施方案中,所述试剂盒进一步包含:

[0136] -所述可检测分子或所述第二分子,其带有可检测物质,优选荧光染料或发冷光分子或酶,和/或

[0137] -固体基质,其带有能够与所述标记分子特异性反应或结合的所述第二分子。

[0138] 更特别地,在一个实施方案中,本发明的试剂盒进一步包含:

[0139] -所述可检测分子,其包含能够与所述第一反应基团反应的所述第二反应基团,和

[0140] -固体介质,其允许在与所述单糖化合物的类似物、所述反应物和所述可检测分子孵育后,进行细菌的观察。

[0141] 又更特别地,所述试剂盒包含:

[0142] -被所述第一反应基团取代的所述修饰的单糖化合物,所述第一反应基团包含叠氮基或炔基,和

[0143] -可检测分子的所述第二反应基团,其分别带有炔基或叠氮基,和

[0144] -可能地,包含铜催化剂和三-三氮唑基配体的所述反应物。

[0145] 在第一个特别的实施方案中,所述标记分子可以为可检测分子,即为可检测物质或带有可检测物质的分子,即能够被检测的物质如荧光染料或发光物质或酶如过氧化物酶,在与共反应物反应之后所述酶更特别地被检测。

[0146] 在另一个特别的实施方案中,为了分离和/或浓缩活菌,当进行步骤b)时,可以将所述标记分子连接于固体基质。

[0147] 在另一个特别的实施方案中,所述标记分子为带有所述第二反应基团的第一配体或第一结合蛋白的分子,并且在步骤c)中偶联至所述第一配体或第一结合蛋白的所述活菌,通过将所述第一配体或第一结合蛋白与第二分子接触被检测和/或固定,所述第二分子为与所述第一配体或第一结合蛋白特异性反应或结合的第二配体或第二结合蛋白。

[0148] 然后,有利地,所述第一或第二配体或结合蛋白可以与带有所述可检测物质如荧光染料或发冷光物质或酶如过氧化物酶的第三结合蛋白反应或结合,所述第三结合蛋白特异性结合于所述第一和/或第二配体或结合蛋白。通过所述第二配体或第二结合蛋白或第三结合蛋白检测所述可检测物质,能够放大所述可检测物质的信号。

[0149] 更特别地,第一配体或第一结合蛋白可以为:

[0150] -生物素,则所述第二结合蛋白为亲和素或链霉亲和素,并且所述第三结合蛋白为抗生物素的抗体,或

[0151] -亲和素或链霉亲和素,则所述第二配体结合蛋白为生物素,并且所述第三结合蛋白为抗亲和素或抗链霉亲和素的抗体,或

[0152] -第一抗体,则所述第二结合蛋白为特异于所述第一抗体的第二抗体,并且所述第三结合蛋白为特异于所述第一抗体的第三抗体。

[0153] 更特别地,所述标记分子为第一配体,优选生物素,所述第一配体带有所述第二反应基团,并且在步骤c)中偶联至所述第一配体的所述活菌通过所述细菌与特异于所述第一配体的抗体的反应被检测,所述抗体带有可检测物质,优选荧光染料或发冷光分子或酶。

[0154] 又更特别地,所述标记分子为第一配体,优选生物素,所述第一配体带有所述第二反应基团,并且在步骤c)中,在通过细菌DNA酶扩增或通过所述细菌与第三结合蛋白(其与所述第一配体或第二结合蛋白特异性反应或结合)的反应而检测所述活菌之前,偶联至所述第一结合蛋白的所述活菌通过所述第一配体与固体基质(优选磁珠)的反应被固定,所述固体基质被偶联至所述第二结合蛋白(优选亲和素或链霉亲和素),所述第三结合蛋白带有可检测物质,优选荧光染料或发冷光分子或酶,所述第三结合蛋白优选为特异于所述第一配体或第一结合蛋白的抗体。

[0155] 该实施方式,其中所述活菌被固定于所述固体基质上,能够将样品浓缩至所述细菌中,并且能够通过任何已知的方法定量所述活菌,所述方法包括DNA酶扩增如PCR,尤其是实时PCR或涉及采用标记抗体的免疫反应的方法,如ELISA测试。

附图说明

[0156] 根据参照以下附图的以下详细描述和说明性且非限制性的实施方案的示例,本发明的其它特征和优点将更加明显,其中:

[0157] -图1:表示嗜肺军团菌中的Leg (化合物Ib-1) 通路;

[0158] -图2表示合成化合物Ia-1和Ia-1' 的连续反应;

[0159] -图3至7表示使用生物素-炔炔5通过CuI催化点击反应所显示的被各种细菌株代谢性合并入的化合物Ia-1和Ia-1' 的检测,以及使用Alexa Fluor 488-IgG抗生物素抗体的进一步可视化。在Ia-1或Ia-1' 存在下(右侧图板)或者Ia-1或Ia-1' 不存在下(左侧图板)的相对对比(Phase contrast)和荧光图像,比例尺=1 μ m;

[0160] -图3表示被各种嗜肺军团菌血清组1株代谢性合并入的化合物Ia-1的检测照片;

[0161] -图4表示被各种嗜肺军团菌株代谢性合并入的化合物Ia-1的检测照片,所述嗜肺军团菌株属于除了血清组1以外的其他血清组;

[0162] -图5表示被大肠杆菌和铜绿假单胞菌代谢性合并入的化合物Ia-1的检测照片(化合物Ia-1未被大肠杆菌和铜绿假单胞菌合并入);

[0163] -图6表示被各种军团菌属菌株代谢性合并入的化合物Ia-1的检测照片(化合物Ia-1未被不属于嗜肺军团菌种的军团菌合并入)和

[0164] -图7表示检测照片:代谢性合并入的化合物Ia-1' 的检测(Ia-1' =Ia-1其中在R3位OH为AcO)。在这些情况下化合物Ia-1' 未被嗜肺军团菌合并入。

具体实施方式

[0165] 已显示[1]在被感染病例中流行的嗜肺军团菌血清组1的O-抗原是由5-N-亚氨代乙酰基-7-N-乙酰基-legionaminic acid (5-N-acetimido-7-N-acetyl-legionaminic acid) (Leg5Am7Ac) 的 α -(2 $\rightarrow$ 4) 同多糖重复组成的,在庞蒂亚克(Pontiac)亚组中有8-O-乙酰化[2]。Leg的生物合成(图1)起始于UDP-N,N'-二乙酰基bacillosamine (A),其通过水解2-表异构酶(B)的双重作用被转化为2,4-二乙酰氨基-2,4,6-三脱氧-D-吡喃甘露糖(Ia)。在下一步中,在磷酸烯醇丙酮酸(PEP)的存在下通过醛缩酶(C)的作用,游离前体Ia直接被转化为Ib-1=N,N'-二乙酰基legionaminic acid (Leg5Ac7Ac) Ib-1[3]。该事件控制C-4位新生成的立体中心的立体化学。然后,legionaminic acid被活化为单磷酸胞苷供体(CMP)-Leg5Ac7Ac的形式。据信在后续阶段发生进一步的转化。

[0166] 为了靶向代谢聚糖标记的Leg通路,已进行Ia的叠氮基衍生物Ia-1,即6-叠氮基-2,4-二乙酰氨基-2,4,6-三脱氧-D-吡喃甘露糖(Ia-1)的合成,以及它的更低极性的、单乙酰化的衍生物(Ia-1')的合成,所述衍生物(Ia-1')可以通过被动转运更容易地进入人类细胞中或阿米巴原虫(amibes)中或包含真核细胞的生物样品如人类样品中,并通过细胞内非特异性酯酶的作用被进一步转化为Ia-1。已开发了起始于D-半乳糖的合成策略,并且终产物已被分离,并测试其特异性标记活的嗜肺军团菌血清组1的LPS的能力。

[0167] 使用受Tsvetkov和coll.[7]描述的用于合成1的方法启发的方法合成化合物Ia-1和Ia-1' (图2)。由市售的 β -D-半乳糖五乙酸酯通过十一步以17%的总产率制备目标化合物6-叠氮基-2,4-二乙酰氨基-2,4,6-三脱氧-D-甘露糖Ia-1,同时由相同的起始材料以十二步和15%的总产率获得3-O-乙酰基-6-叠氮基-2,4-二乙酰氨基-2,4,6-三脱氧-D-甘露糖Ia-1'。

[0168] 在图2的合成中,使用了以下试剂和条件:(i)对甲氧基苯酚, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 ; (ii) CH_3ONa , CH_3OH ; (iii) 2-氨基乙基二苯基硼酸酯, DIPEA, 苯甲酰氯, CH_3CN ; (iv) Tf_2O , 吡啶, CH_2Cl_2 ; (v) Bu_4NN_3 , 甲苯; (vi) $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, H_2 , CH_3OH , ii) Ac_2O , CH_3OH ; (viii) 对甲苯磺酰氯, 吡啶; (ix) 甲磺酰氯, 吡啶; (x) NaN_3 , DMF; (xi) CAN , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (3:1); (xii) Ac_2O , 吡啶, CH_2Cl_2

[0169] 在三氟化硼醚合物的存在下, β -D-半乳糖五乙酸酯与对甲氧基苯酚的糖基化以83%的良好产率获得6[4]。使用甲醇钠进行Zemplén脱乙酰化[5],然后在2-氨基乙基二苯基硼酸酯作为催化剂的存在下使用Taylor开发的方法进行选择性的苯甲酰化,获得7(2步70%产率)[6]。将7转化为双三氟甲磺酸酯衍生物,其随后在甲苯中与叠氮化四丁基铵反应,得到双叠氮基化合物8(2步89%),[7]通过 ^1H NMR确认其甘露糖构型($J_{1,2}=1.2\text{Hz}$; $J_{2,3}=3.6\text{Hz}$; $J_{3,4}=10.0\text{Hz}$; $J_{4,5}=10.2\text{Hz}$)。使用甲醇钠进行8的常规脱苯甲酰化,并在 $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 的存在下使用氢气(dihydrogen)还原叠氮基,然后N-乙酰化以高产率(3步82%)获得9[7]。通过在吡啶中选择性的对甲苯磺酰化或甲磺酰化,然后在二甲基甲酰胺中使用叠氮化钠亲核取代,以2步获得叠氮基衍生物11[8]。

[0170] 在这个策略中,甲磺酰化然后取代(50%)获得了比对甲苯磺酰化路线(32%)更好的结果。在乙腈/水混合物中,通过使用硝酸铯铵将异头位脱保护,由11以良好的产率(82%)获得了终产物Ia-1[9]。可选地,通过乙酰化然后使用与之前相同的条件将异头位脱保护,由11以2步71%的可接受的产率制备产物Ia-1'[9]。

[0171] 实施例1:化合物Ia-1、Ia-1'和Ib-1的合成

[0172] 1) 用于合成的材料。

[0173] 在Merck 60F254上进行薄层色谱法,通过UV、和/或通过使用硫酸或 KMnO_4 或磷钼酸溶液炭化(charring)进行检测。使用硅胶60 40-63 μm 用于闪式柱色谱法。

[0174] 使用残留质子化溶剂作为内标,在Bruker Avance 300或500MHz波谱仪上采集NMR谱。以百万分之一(ppm)给出化学位移 δ ,并且偶合常数报道为赫兹(Hz)。裂分模式被定义为单峰(s)、双峰(d)、三重峰(t)、双重双峰(dd)、三重双峰(ddd)。不能解释或不能容易地观察的裂分模式被定义为多重峰(m)。

[0175] 在Thermo Scientific TSQ或在Bruker micrOTOFq或在Waters LCT Premier XE (ToF)上采集质谱,检测模式为正电喷雾电离(ESI+)。

[0176] 在Perkin Elmer Spectrum 100光谱仪上记录IR-FT谱。特征吸收以 cm^{-1} 报道。

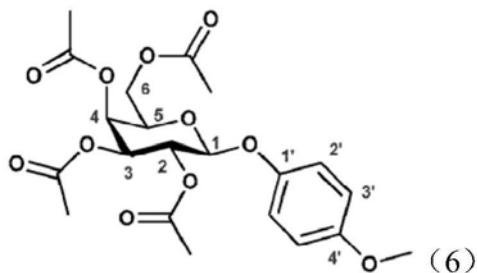
[0177] 使用Anton Paar MCP 300旋光仪在10cm的样品池中在20°C和589nm测量比旋度。

[0178] 使用Büchi Melting Point B-540仪测量熔点。

[0179] 2) 合成化合物Ia-1和Ia-1'的方法。

[0180] 2.1) 制备下式的4-甲氧基苯基2,3,4,6-四-O-乙酰基- β -D-吡喃半乳糖苷(6)(图2第一步):

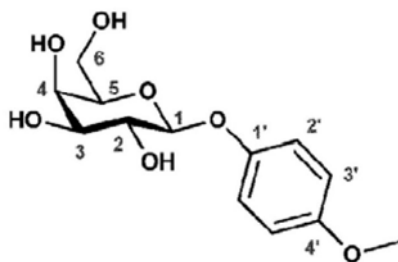
[0181]



[0182] 在0℃,向β-D-半乳糖五乙酸酯5 (25.00g, 64.0mmol) 和对甲氧基苯酚 (9.54g, 76.9mmol) 的CH₂Cl₂ (500mL) 溶液中加入BF₃·Et₂O (9.73mL, 76.9mmol)。允许反应升温至室温,搅拌15小时,然后用HCl (1mol·L⁻¹, 250mL) 淬灭。使用饱和NaHCO₃水溶液 (2 x 250mL) 和盐水 (150mL) 洗涤有机层,然后使用无水Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩以获得浅黄色油状物。使用CH₃OH将残余物重结晶,以获得白色晶体化合物6 (24.1g, 83%)。

[0183] 2.2) 制备下式的4-甲氧基苯基β-D-吡喃半乳糖苷 (6') :

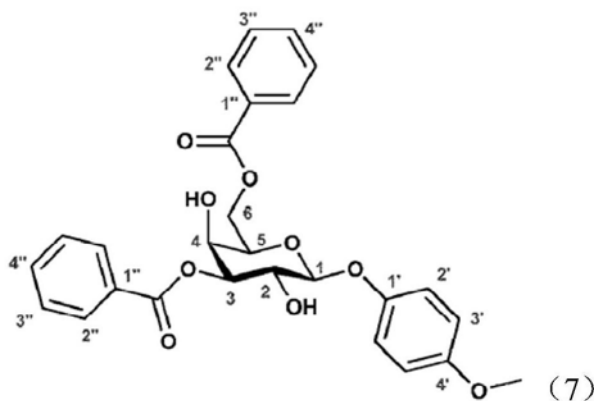
[0184]



[0185] 将新鲜制备的甲醇钠溶液 (0.2mol·L⁻¹, 4.4mL) 加入至搅拌的化合物6 (4.0g, 8.80mmol) 的CH₃OH (44mL) 溶液中。将混合物在室温搅拌40min,然后加入Amberlite IRN-77 树脂(H⁺形式) 以中和溶液。过滤并将滤液的溶剂蒸发,以获得白色无定形固体 (6', 2.52g), 其不作进一步的纯化。使用乙醇将一小部分重结晶以获得白色针状物,将其用于化合物的表征。

[0186] 2.3) 制备下式的4-甲氧基苯基3,6-二-O-苯甲酰基-β-D-吡喃半乳糖苷 (7) (图2中的第二步) :

[0187]

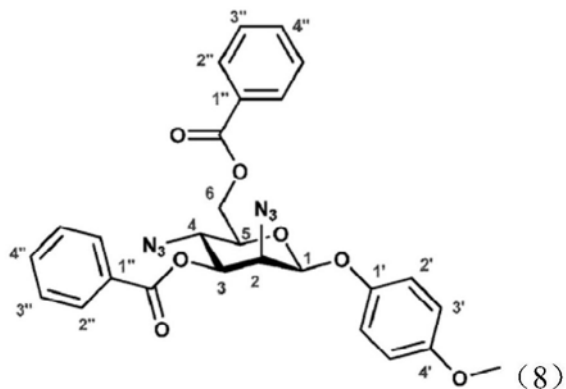


[0188] 将2-氨基二苯基硼酸酯 (79mg, 0.35mmol) 和化合物6' (1.00g, 3.49mmol) 置于50mL圆底烧瓶中,真空干燥30min,然后溶解于干燥CH₃CN (17.5mL) 中。加入N,N-二异丙基乙胺 (2.43mL, 13.96mmol) 和苯甲酰氯 (1.62mL, 13.96mmol), 将获得的混合物在室温搅拌1小时。然后,将混合物用乙酸乙酯 (30mL) 稀释,使用H₂O (30mL) 洗涤,并使用乙酸乙酯 (30mL) 萃取三遍。将合并的有机层经无水Na₂SO₄干燥,过滤,并减压浓缩。将获得的粗材料在硅胶上通

过闪式柱色谱法纯化(CH_2Cl_2 /乙酸乙酯92:8),以获得白色粉末化合物7(1.21g,70%)。

[0189] 2.4) 制备下式的4-甲氧基苯基2,4-二叠氮基-2,4-二脱氧-3,6-二-O-苯甲酰基- β -D-吡喃甘露糖苷(8)(图2中的第三步):

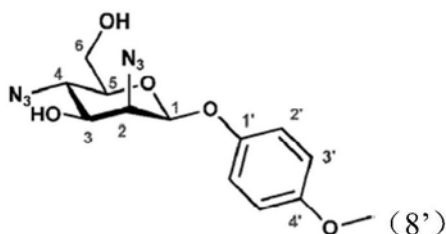
[0190]



[0191] 在0℃,将三氟甲磺酸酐(2.02mL,12.0mmol)滴加至化合物7(1.98g,4.0mmol)和干燥吡啶(1.94mL,24.0mmol)的 CH_2Cl_2 (27.0mL)溶液中。将混合物在0℃搅拌1h30,使用 CHCl_3 (60mL)稀释,并使用 H_2O (50mL)、1N HCl水溶液(50mL)、 H_2O (50mL)、饱和 CuSO_4 水溶液、和饱和NaCl溶液连续洗涤,然后在真空下浓缩。将获得的粗双-三氟甲磺酸酯($R_f=0.48$,环己烷/乙酸乙酯7:3)溶解于甲苯(27.0mL)中,并加入叠氮化四正丁基铵(6.83g,24.0mmol)。在65-70℃搅拌1h30并在100℃搅拌1h30后,将混合物冷却,使用甲苯(60mL)稀释,使用水(50mL)、饱和NaCl溶液洗涤两次,并浓缩。残余物在硅胶上进行的闪式柱色谱法(环己烷/乙酸乙酯8:2)获得白色泡沫状物化合物8(1.95g,89%)。

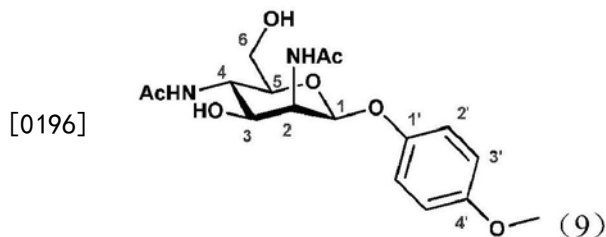
[0192] 2.5) 制备下式的4-甲氧基苯基2,4-二叠氮基-2,4-二脱氧- β -D-吡喃甘露糖苷(8'):

[0193]



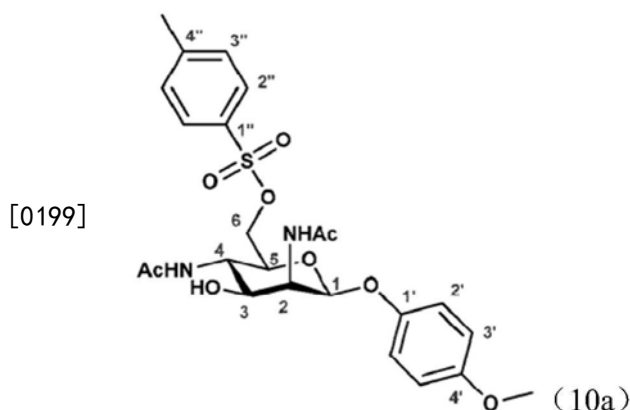
[0194] 将甲醇钠在 CH_3OH 的溶液($2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,0.22mL,0.44mmol)加入至化合物8(630mg,1.15mmol)的干燥 CH_3OH (4.6mL)溶液中,并将混合物在室温搅拌1小时。然后,通过加入Amberlite IRN-77(H+形式)离子交换树脂将反应混合物中和。过滤并将滤液蒸发获得白色固体的粗化合物8'(380mg),其不作进一步的纯化而用于下一步。将分析样品在硅胶上通过闪式柱色谱法纯化(环己烷/乙酸乙酯9:1至6:4),以用于表征。

[0195] 2.6) 制备下式的4-甲氧基苯基2,4-二乙酰氨基-2,4-二脱氧- β -D-吡喃甘露糖苷(9):



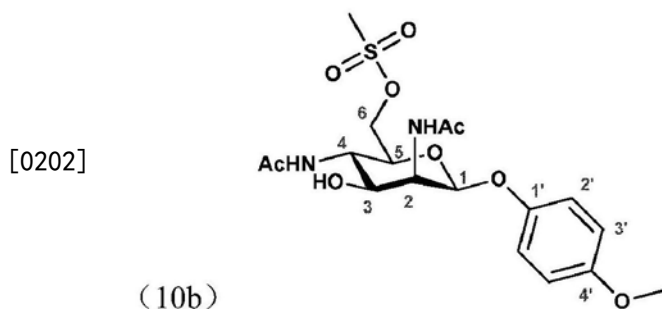
[0197] 在30℃,使用20%Pd(OH)₂/C(101mg)将粗化合物8'(380mg,1.13mmol)的CH₃OH(8.5mL)溶液氢化1.5小时。通过Celite[®]滤去催化剂,并将滤液浓缩至干。将粗残余物溶解于CH₃OH(5mL)中,加入醋酸酐(0.43mL,4.52mmol),并将混合物在室温搅拌1小时。将蒸发溶剂后获得的残余物在硅胶上通过闪式柱色谱法纯化(CH₂Cl₂/CH₃OH,92:8),以获得白色固体化合物9(342mg,82%)。

[0198] 2.7)制备下式的4-甲氧基苯基2,4-二乙酰氨基-2,4-二脱氧-6-O-对甲苯磺酰基-β-D-吡喃甘露糖苷(10a):



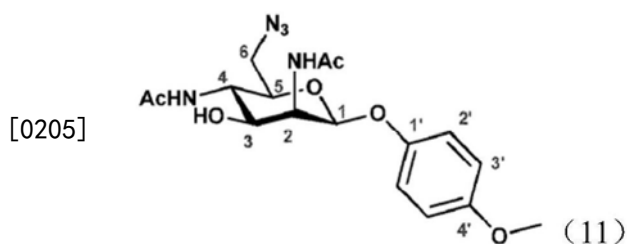
[0200] 在0℃,向化合物9(100mg,0.27mmol)的干燥吡啶(0.6mL)溶液中加入对甲苯磺酰氯(207mg,1.09mmol)的干燥吡啶(0.5mL)溶液,并将混合物搅拌30min。然后,使用CH₃OH(1.0mL)淬灭反应混合物,并减压蒸发溶剂。将固体残余物在硅胶上通过闪式柱色谱法纯化(CH₂Cl₂/CH₃OH 92:8),获得白色粉末化合物10a(90mg,64%)。

[0201] 2.8)制备下式的4-甲氧基苯基2,4-二乙酰氨基-2,4-二脱氧-6-O-甲磺酰基-β-D-吡喃甘露糖苷(10b):



[0203] 在-10℃,向化合物9(460mg,1.25mmol)的干燥吡啶(5.1mL)溶液中加入甲磺酰氯(0.145mL,1.88mmol),并将混合物在-10℃搅拌45min。然后,使用CH₃OH淬灭反应,并在真空下蒸发溶剂。将粗残余物在硅胶上通过闪式柱色谱法纯化(CH₂Cl₂/CH₃OH 92:8),以获得白色固体化合物10b(411mg,74%)。

[0204] 2.9) 制备下式的4-甲氧基苯基6-叠氮基-2,4-二乙酰氨基-2,4,6-三脱氧-β-D-吡喃甘露糖苷(11):



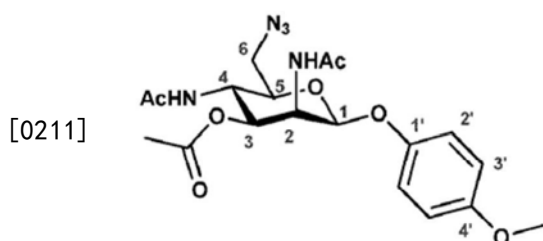
[0206] 2.9.1) 起始于对甲苯磺酸酯(10a):

[0207] 将对甲苯磺酸酯10a (43mg, 0.08mmol) 和NaN₃ (16mg, 0.25mmol) 溶解于干燥二甲基甲酰胺 (0.80mL) 中, 并将反应混合物在80℃搅拌15小时。然后, 将反应混合物冷却至室温并浓缩。将粗固体在硅胶上通过闪式柱色谱法纯化 (CH₂Cl₂/CH₃OH 92:8), 以获得化合物11 (16mg, 50%)。

[0208] 2.9.2) 起始于甲磺酸酯10b:

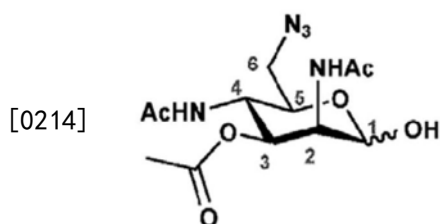
[0209] 将甲磺酸酯10b (100mg, 0.22mmol) 和NaN₃ (44mg, 0.67mmol) 溶解于干燥二甲基甲酰胺 (2.2mL) 中, 并将反应混合物在80℃搅拌15h。然后, 将反应混合物冷却至室温并减压蒸发溶剂。将残余物在硅胶上通过闪式柱色谱法纯化 (CH₂Cl₂/CH₃OH 92:8), 以获得白色固体化合物11 (59mg, 67%)。

[0210] 2.10) 制备下式的4-甲氧基苯基3-O-乙酰基-6-叠氮基-2,4-二乙酰氨基-2,4,6-三脱氧-β-D-吡喃甘露糖苷(11'):



[0212] 将干燥吡啶 (0.015mL, 0.18mmol) 和醋酸酐 (0.008mL, 0.09mmol) 加入至搅拌的化合物11 (12mg, 0.03mmol) 的干燥CH₂Cl₂ (0.25mL) 溶液中, 并将获得的混合物在室温搅拌3小时。加入更多的吡啶 (0.008mL, 0.09mmol) 和醋酸酐 (0.005mL, 0.05mmol), 并将反应混合物在室温搅拌2小时。然后, 加入饱和NH₄Cl溶液, 并使用CH₂Cl₂萃取水层。使用盐水洗涤合并的有机萃取物, 使用无水Na₂SO₄干燥, 过滤并减压浓缩。将粗残余物在硅胶上通过闪式柱色谱法纯化 (CH₂Cl₂/CH₃OH 95:5), 以获得白色固体化合物11' (12mg, 90%)。

[0213] 2.11) 制备下式的3-O-乙酰基-6-叠氮基-2,4-二乙酰氨基-2,4,6-三脱氧-D-甘露糖(Ia-1'):



[0215] 向化合物11' (20mg, 0.046mmol) 的CH₃CN/H₂O (0.8mL, 3:1) 溶液中加入硝酸铯铵

(75mg, 0.138mmol)。将获得的澄清橙色溶液在室温搅拌20min,然后装载在硅胶柱上。使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (94:6)洗脱获得化合物3和其他化合物的混合物。将混合物在硅胶上通过闪式柱色谱法纯化($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 94:6)获得白色固体的作为 α/β 异头物(17:83)的混合物的化合物3 (12mg, 79%)。

[0216] R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1): 0.46。

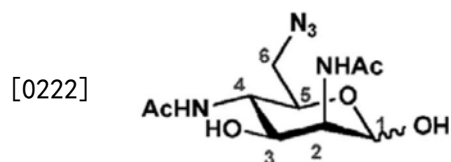
[0217] IR (cm⁻¹): 3277, 2103, 1660, 1372, 1071。

[0218] ¹H-NMR (500MHz, CD_3OD) δ : 5.27 (dd, 0.8H, $J=10.7$ 和 4.3Hz , H-3 β); 5.07 (d, 0.8H, $J=1.4\text{Hz}$, H-1 β); 4.95 (d, 0.2H, $J=1.4\text{Hz}$, H-1 α); 4.92 (dd, 0.2H, $J=11.1$ 和 4.2Hz , H-3 α); 4.57 (dd, 0.2H, $J=4.2$ 和 1.4Hz , H-2 α); 4.46 (dd, 0.8H, $J=4.3$ 和 1.4Hz , H-2 β); 4.13 (dd, 0.8H, $J=10.7$ 和 10.5Hz , H-4 β); 4.08 (ddd, 0.8H, $J=10.5$ 和 7.3 和 1.9Hz , H-5 β); 4.02 (dd, 0.2H, $J=11$ 和 9.8Hz , H-4 α); 3.55 (ddd, 0.2H, $J=9.8$ 和 7.9 和 2.1Hz , H-5 α); 3.51 (dd, 0.2H, $J=12.6$ 和 7.9 , H-6 $\alpha\alpha$); 3.46 (dd, 0.8H, $J=13.1$ 和 7.3Hz , H-6 $\alpha\beta$); 3.32-3.3 (m, 0.2H, H-6 $\beta\alpha$); 3.28 (dd, 0.8H, $J=13.1$ 和 1.9Hz , H-6 $\beta\beta$); 2.06, 2.05, 2.03, 2.02, 1.95, 1.93 (s, 9H, 3CO- CH_3)。

[0219] ¹³C-NMR (75MHz, CD_3OD): 174.0, 173.9, 172.1 (3C=O α 和 β); 94.7 (C-1 β); 94.5 (C-1 α); 76.4 (C-5 α); 73.4 (C-3 α); 71.9 (C-5 β); 70.8 (C-3 β); 53.3 (C-6 β); 53.2 (C-6 α); 52.6 (C-2 α); 52.0 (C-2 β); 48.5 (C-4 β); 47.7 (C-4 α); 22.8, 22.6 (2CO- CH_3 (NHAc) α 和 β); 21.0 (CO- $\text{CH}_3\alpha$ 和 β)。

[0220] HMRS (ESI⁺): [M+H]⁺ ($\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_6$) 计算值 m/z : 330.1408, 实测值: 330.1391。

[0221] 2.12) 制备下式的6-叠氮基-2,4-二乙酰氨基-2,4,6-三脱氧-D-甘露糖 (Ia-1):



[0223] 向化合物11 (90mg, 0.23mmol) 的 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (3.6mL, 3:1) 溶液中加入硝酸铯铵 (376mg, 0.69mmol)。将获得的澄清橙色溶液在室温搅拌20min,然后装载在硅胶柱上。使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (88:12)洗脱获得化合物2和其他化合物的混合物。将混合物在硅胶上通过闪式柱色谱法纯化($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 88:12)获得白色固体的作为 α/β 异头物(12:88)的混合物的化合物2 (54mg, 82%)。

[0224] R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 88:12): 0.23。

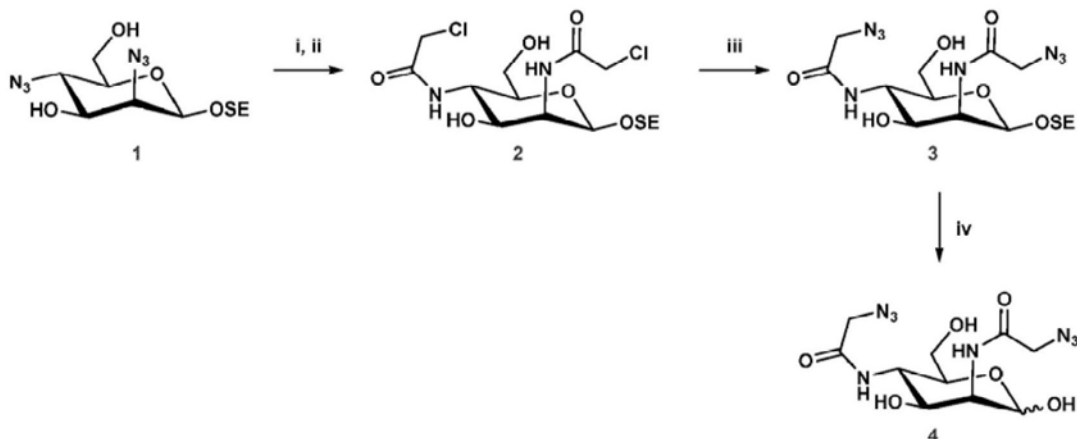
[0225] IR (cm⁻¹): 3302, 2988, 2107, 1646, 1552, 1376, 1075。

[0226] ¹H-NMR (500MHz, CD_3OD) δ : 5.09 (d, 0.88H, $J=1.2\text{Hz}$, H-1 β); 4.84 (d, 0.12H, $J=0.9\text{Hz}$, H-1 α); 4.44 (dd, 0.12H, $J=4.0$ 和 0.9Hz , H-2 α); 4.26 (dd, 0.88H, $J=4.5$ 和 1.2Hz , H-2 β); 4.07 (dd, 0.88H, $J=10.0$ 和 4.5Hz , H-3 β); 3.96 (ddd, 0.88H, $J=10.2$ 和 6.9 和 2.1Hz , H-5 β); 3.93 (dd, 0.88H, $J=10.2$ 和 10.0Hz , H-4 β); 3.79 (dd, 0.12H, $J=10.4$ 和 9.7Hz , H-4 α); 3.73 (dd, 0.12H, $J=10.4$ 和 4.0Hz , H-3 α); 3.38 (dd, 0.12H, $J=12.7$ 和 8.0 , H-6 $\alpha\alpha$); 3.44 (ddd, 0.12H, $J=9.7$ 和 8.0 和 2.3Hz , H-5 α); 3.40 (dd, 0.88H, $J=13.2$ 和 6.9Hz , H-6 $\alpha\beta$); 3.34-3.24 (m, 0.12H, H-6 $\beta\alpha$); 3.27 (dd, 0.88H, $J=13.2$ 和 2.1Hz , H-6 $\beta\beta$); 2.08, 2.05, 2.00, 1.98 (s, 6H, 2CO- CH_3)。

[0227] ^{13}C -NMR (75MHz, CD_3OD) δ : 174.5, 174.3 (2C=O α 和 β); 95.1 (C-1 α); 94.6 (C-1 β); 76.6 (C-5 α); 72.0 (C-3 α); 71.9 (C-5 β); 68.3 (C-3 β); 55.5 (C-2 α); 54.9 (C-2 β); 53.5 (C-6 β); 53.4 (C-6 α); 51.3 (C-4 β), 51.3 (C-4 α); 23.0, 22.9, 22.7 (2CO-CH₃ (NHAc) α 和 β)。

[0228] HMRS (ESI⁺): [M+H]⁺ ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_5$) 计算值m/z: 288.1302, 实测值: 288.1297。

[0229] 3) 2,4-二叠氮基乙酰氨基-2,4-二脱氧-D-甘露糖的合成。



[0230]

[0231] 条件和反应物: i) H_2 , Pd(OH)₂/C, CH_3OH , 30°C, 4小时; ii) $(\text{ClCH}_2\text{CO})_2\text{O}$, Et_3N , CH_3OH , r.t., 2天; iii) NaN_3 , DMF, 50°C, 过夜; iv) TFA, CH_2Cl_2 , 1小时。

[0232] 3.1) 1-三甲基甲硅烷基乙烷基2,4-二氯乙酰氨基-2,4-二脱氧- β -D-吡喃甘露糖苷(2)的合成。

[0233] 在30°C, 使用20%Pd(OH)₂/C (23.4mg) 将化合物1 (80.0mg, 0.24mmol, 1.0当量) 的 CH_3OH 溶液 (1.8mL, 0.13M) 氢化4小时。通过Celite®塞滤去催化剂, 并将滤液在真空下浓缩。将粗残余物 (70.8mg, 0.25mmol, 1.0当量) 溶解于 CH_3OH (2.1mL, 0.12M) 中, 加入氯乙酸酐 (299.3mg, 1.75mmol, 7.0当量) 和 Et_3N (244 μL , 1.75mmol, 3.0当量)。将混合物在室温搅拌2天, 然后减压浓缩。将残余物在硅胶上通过闪式色谱法纯化 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 100:0至80:20), 以获得无色油状物化合物2 (33.1mg, 31%)。

[0234] 3.2) 1-三甲基甲硅烷基乙炔基乙烷基2,4-二叠氮基乙酰氨基-2,4-二脱氧- β -D-吡喃甘露糖苷(3)。

[0235] 向2 (30.3mg, 72.0 μmol , 1.0当量) 的干燥DMF溶液 (0.5mL, 0.14M) 中加入 NaN_3 (54.5mg, 1.24mmol, 11.8当量)。将反应混合物在50°C搅拌过夜, 然后减压浓缩。将粗残余物在硅胶上通过闪式色谱法纯化 (CH_2Cl_2 /丙酮/ CH_3OH 90:6:4), 以获得白色泡沫状物化合物3 (26.8mg, 86%)。

[0236] 3.3) 2,4-二叠氮基乙酰氨基-2,4-二脱氧-D-甘露糖(4/Ib-1)。

[0237] 向化合物3 (20.6mg, 46.0 μmol , 1.0当量) 的 CH_2Cl_2 溶液 (460 μL , 0.10M) 中缓慢加入TFA (528 μL , 6.9mmol, 150.0当量)。将反应混合物在室温搅拌1小时, 然后与甲苯/ EtOAc 混合物共蒸发三次。将粗残余物通过C-18柱色谱法纯化 (H_2O) 并冻干, 以获得白色泡沫状的作为 α/β 异头物(1:3)的混合物的化合物4 (13.8mg, 87%)。

[0238] R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 95:5): 0.28。

[0239] IR (cm⁻¹): 3283, 2952, 2841, 2120, 1646, 1450, 1409, 1013。

[0240] HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_8\text{O}_6$) 计算值m/z 345.1271, 实测值345.1233。

[0241] α 异头物:

[0242] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 5.10 (d, 1H, $J_{1,2}$ 1.7Hz, H-1); 4.34 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 4.4, $J_{2,1}$ 1.7Hz, H-2); 4.17 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 10.9, $J_{3,2}$ 4.4Hz, H-3); 3.97 (d, 1H, $J_{2''a,2''b}$ 16.5Hz, CH-2''a); 3.94 (d, 1H, $J_{2''a,2''b}$ 16.5Hz, CH-2''b); 3.94 (d, 1H, $J_{2''c,2''d}$ 16.1Hz, CH-2''c); 3.91 (d, 1H, $J_{2''c,2''d}$ 16.1Hz, CH-2''d); 3.90-3.79 (m, 1H, H-5); 3.83 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 10.9, $J_{4,5}$ 9.8Hz, H-4); 3.70-3.60 (m, 2H, H-6)。

[0243] $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 171.4, 171.1 (2C=O); 94.8 (C-1); 72.5 (C-5); 68.0 (C-3); 62.8 (C-6); 54.9 (C-2); 53.2, 52.8 ($\text{CH}_2\text{-N}_3$); 50.2 (C-4)。

[0244] β 异头物:

[0245] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 4.88 (d, 1H, $J_{1,2}$ 1.6Hz, H-1); 4.46 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 3.9, $J_{2,1}$ 1.6Hz, H-2); 3.99-3.79 (m, 4H, 2CH-2''); 3.92-3.80 (m, 1H, H-4); 3.92-3.80 (m, 1H, H-3); 3.70-3.60 (m, 2H, H-6); 3.36 (ddd, 0.6H, $J_{5,4}$ 9.7, $J_{5,6}$ 4.0, $J_{5,6}$ 2.6Hz, H-5)。

[0246] $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 171.4, 171.1 (2C=O); 95.0 (C-1); 77.4 (C-5); 71.8 (C-3); 62.7 (C-6); 55.7 (C-2); 53.2, 52.8 ($\text{CH}_2\text{-N}_3$); 50.1 (C-4)。

[0247] 实施例2: 标记活嗜肺军团菌的LPS

[0248] 1) 材料和方法。

[0249] 1.1) 细菌株和生长条件。

[0250] 军团菌属菌株(表1)生长在补充有L-半胱氨酸、焦磷酸铁和 α -酮戊二酸的酵母提取介质(YEC)中。大肠杆菌K12 (MG1655) 和铜绿假单胞菌 (ATCC 9027) 生长在Luria-Bertani (LB) 介质中。所有菌株均生长在37℃的旋转摇床(160rpm)中。所有菌株均由CNRL(军团菌对照品国家中心(Centre National de Référence sur Legionella))提供。

[0251] 表1

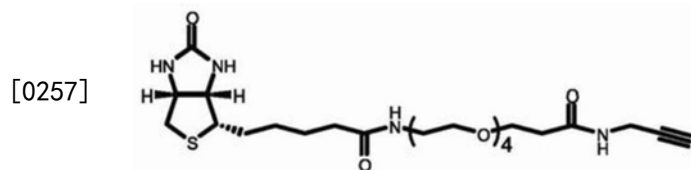
军团菌种	血清组	类型
嗜肺军团菌		
费城2	1	33152
巴黎	1	CIP 33152
朗斯(Lens)	1	CIP 108286
[0252]	1	LG 0901 3003
	3	LG 0903 1009
	4	LG 0905 1005
	5	LG 0905 3003
	6	LG 0846 3022
	7	LG 0824 4007

[0253]	军团菌属 (<i>Legionella spp.</i>)		
	戈曼军团菌 (<i>L. gormanii</i>)		HL 0540 3034
	马氏军团菌 (<i>L. maceachernii</i>)		HL 0540 G20 2029
	米克达德军团菌 (<i>L. micdadei</i>)		HL 0522 5034
	博兹曼军团菌 (<i>L. bozemanii</i>)		HL 0538 2034
	菲力军团菌 (<i>L. feeli</i>)		HL 0418 4001
	约旦军团菌 (<i>L. jordanis</i>)		HL 0450 5001
	图森军团菌 (<i>L. tucsonensis</i>)		HL 0438 3117
	茴香军团菌 (<i>L. anisa</i>)		CH47 ATCC 35291

[0254] 1.2) 铜催化的点击化学

[0255] 将过夜培养物在含有2或3 (4mM) 的新鲜介质 (终体积100μL) 中稀释100倍。将细菌在37℃孵育12小时, 然后通过室温以13,000x g离心2min用磷酸盐缓冲液 (0.05M, pH 7.5) 洗涤3次。

[0256] 使用下式4的生物素-炔烃探针:



[0258] 然后, 通过使用如下的荧光标记的抗生物素抗体的识别使生物素标记可视化。

[0259] 在37℃剧烈摇动下, 将终浓度分别为2mM和4mM的CuSO₄和TGTA在磷酸盐缓冲液 (0.05M, pH 7.5) 中混合过夜。然后, 将终浓度分别为4mM、5mM和1mM的氨基胍、抗坏血酸钠和生物素-炔烃 (4) 加入至CuSO₄/TGTA过夜混合物中。最后, 将细菌重新悬浮于该溶液中, 并在37℃孵育30分钟。然后, 将细胞通过在室温以13,000 x g离心2min用磷酸盐缓冲液洗涤3次, 然后重新悬浮于10μL补充有0.5μL Alexa Fluor 488-IgG级分 (fraction) 单克隆小鼠抗生物素抗体 (0.62mg/ml储备液, Jackson ImmunoResearch) 的磷酸盐缓冲液 (0.05M, pH 7.5) 中, 并通过显微镜进一步分析。

[0260] 1.3) 荧光显微镜。

[0261] 将细菌接种至玻璃盖玻片上, 并使用稀释的LB (1/10在磷酸盐缓冲液中 (0.05M, pH 7.5)) 制成的薄 (厚度为1mm) 半固态1%琼脂垫覆盖。使用装备有CoolSNAP HQ2照相机 (Roper Scientific, Roper Scientific SARL, 法国) 和100x/1.4DLL物镜的落射荧光 (epifluorescence) 自动显微镜 (Nikon TE2000-E-PFS, Nikon, 法国) 记录图像。通过120W金属卤化物灯发射激发光, 并且使用合适的滤光器监测信号。如前所述, 通过自定义自动化脚本 (Visual Basic) 在Metamorph 7.5 (Molecular Devices, Molecular Devices France, 法国) 下进行数字分析和图像处理[1]。

[0262] 2) 结果

[0263] 2.1) 已选择属于血清组1的四种不同的嗜肺军团菌株, 包括 (a) 分离自历史上的费

城爆发的一位受害者的菌株[10] (b) 巴黎株, 其是2000年在巴黎新建成的、现代化的且刚开张的乔治蓬皮杜医院 (Georges Pompidou Hospital) 中的院内流行病的罪魁祸首, 并且已在整个欧洲流行[11], (c) 朗斯株, 其在2003-2004年的冬季在法国北部感染86人并致死17人, 其因此对该国家最重要的流行病负责。

[0264] 这些菌株首先在化合物Ia-1的存在下生长, 并且以之前描述的条件[12]使用铜催化的叠氮化物-炔烃环加成反应, 使用硫酸铜、抗坏血酸钠、TGTA、铜(I)的水溶性三(三氮唑基)配体、和代替荧光染料的上式4的生物素-炔烃探针, 如上所公开的持续30分钟, 在后续步骤中监测叠氮基化学报告分子(reporter)合并入LPS中。

[0265] 然后, 通过使用荧光标记的抗生物素抗体的识别使生物素标记可视化。在这些实验中, 所有菌株均在它们的细胞膜上显示出高度差异性的荧光, 表明了化学报告分子的有效代谢性合并(图3)。那些结果与其他细菌如大肠杆菌和铜绿假单胞菌相反, 在相同条件中, 所述大肠杆菌和铜绿假单胞菌均没有显示任何标记(图5)。

[0266] 该结果导致测试这种标记策略对其他军团菌属菌株的特异性, 所述其他军团菌属菌株不属于嗜肺军团菌种, 因此未描述在它们的LPS中含有Legionaminic acid。因此, 使含有戈曼军团菌、马氏军团菌、米克达德军团菌、茴香军团菌、菲力军团菌、约旦军团菌、图森军团菌和博兹曼军团菌的这种菌株的代表性组经历相同的标记条件, 并且未观察到细胞膜荧光(图6), 这与在它们的脂多糖中不存在Leg相一致。因此, 该方法能够有效地将嗜肺军团菌血清组1与不属于嗜肺军团菌种的其他军团菌区分开。

[0267] 然后, 评价这种方法标记属于其他血清组的嗜肺军团菌株的能力。这是一个有趣的点, 因为尽管在大多数被感染病人病例中发现血清组1, 而在环境中大量的其他血清组。因此, 标记这些其他血清组的可能性将是重要的结果, 其允许更好地评价在给定样品中嗜肺军团菌的存在。已显示大多数这些血清组含有5-乙脒基-7-乙酰氨基-3,5,7,9-四脱氧非-2-酮糖酸的另一种异构体, 即, 5-N-亚氨代乙酰基-7-N-乙酰基-4-epi-legionaminic acid (5-N-acetimidoyl-7-N-acetyl-4-epi-legionaminic acid) (4eLeg5Am7Ac) [13], 其根据血清组具有不同程度的8-O-乙酰化。与Leg通路相反, 4eLeg生物合成通路还未被确定, 但是我们可以推测其可能涉及类似的中间体。属于血清组3、4、5、6的四种菌株显示出非常明亮的细胞膜标记(图4), 这些菌株与血清组1一起占到存在于环境中的嗜肺军团菌的68至85% [1]。这倾向于表明, Leg和4eLeg的生物合成似乎共享Ia作为共同前体。然而, 目前还不能下定论, Leg和4eLeg是由该共同前体的修饰(例如通过两种不同的醛缩酶)而直接获得的, 还是在所有菌株中都产生Leg, 并在通路的后续阶段被表异构酶进一步转化为4eLeg。然而, 该方法允许不属于血清组1的嗜肺军团菌株的清楚的特异性检测。

[0268] 有趣的是, 所观察到的唯一例外涉及属于血清组7的嗜肺军团菌株(图4), 该血清组在感染病例和环境中占比都非常小。已描述血清组7在其O-多糖中存在5-乙脒基-7-乙酰氨基-3,5,7,9-四脱氧非-2-酮糖酸的尚未确认的异构体[13]。该观察结果与不存在标记相一致, 其倾向于表明, 在相应的生物合成通路中化合物Ia不是中间体。Ia的异构体肯定作为醛缩酶的底物参与其中。

[0269] 使用Ia-1'进行另一组实验, 所述Ia-1'为Ia-1的单乙酰化衍生物, 其中R2为-OAc。预期这种更低极性的酯化的化合物可以通过被动转运更有效地进入细菌细胞, 并且可以通过细胞内的非特异性酯酶的作用在脱乙酰化为Ia-1后被进一步合并入LPS中。细菌细胞中

这种作用的有效性和程度是科学界最近讨论的主题[14]。在实验室中在体外条件下使用 Ia-1' 没有观察到标记,即使是在被2有效标记的嗜肺军团菌株的情况中也没有观察到标记(图7)。这提示在细菌细胞中这种酯酶的作用没有以足够的水平存在,以允许由 Ia-1' 有效生成 Ia-1,并将 Ia-1 进一步代谢和合并入至可检测的比例。

[0270] 以上方法表明特异性检测和鉴定活嗜肺军团菌的有效的策略,所述嗜肺军团菌是具有大的卫生和经济影响的致病菌。在以上实验室条件中使用乙酰化的前体不存在标记可以被以下事实解释,即,对于之前的乙酰化的碳水化合物前体在细菌细胞内的有效释放,这种军团菌中的非特异性酯酶的作用可能是不足的。然而,在真核细胞环境中存在这种非特异性酯酶,因此可以发生 Ia-1' 的代谢和合并,所述真核细胞环境如在制冷塔中产生的环境(其中阿米巴原虫中可以携带军团菌)或者在包含真核细胞的生物样品如人类样品中。

[0271] 2.2) 为了测试 Ib-1 的合并,已从表1中选择了四种不同的嗜肺军团菌株(参见表2)。

[0272] 表2

[0273]	军团菌种	血清组	类型
	嗜肺军团菌		
	费城2	1	33152
	巴黎	1	CIP 33152
		3	LG 0903 1009
		6	LG 0846 3022

[0274] 如上所提及,已进行相同的实验程序。这些菌株首先在化合物 Ib-1 的存在下生长,并且以之前描述的条件使用铜催化的叠氮化物-炔烃环加成反应,使用代替荧光染料的上式4的生物素-炔烃探针,如上所公开持续30分钟,在后续步骤中监测叠氮基化学报告分子合并入 LPS 中。然后,通过使用荧光标记的抗生物素抗体的识别使生物素标记可视化。在这些实验中,所有菌株均在它们的细胞膜上显示出高度差异性的荧光,表明了化学报告分子的有效代谢性合并。正如预期,这些结果表明化合物 Ib-1 也被嗜肺军团菌所同化。

[0275] 参考书目

[0276] Yu,V.L.et al.Distribution of Legionella Species and Serogroups Isolated by Culture in Patients with Sporadic Community-Acquired Legionellosis:An International Collaborative Survey.J.Infect.Dis.186,127-128 (2002);Doleans,A.et al.Clinical and Environmental Distributions of Legionella Strains in France Are Different.J.Clin.Microbiol.42,458-460 (2004);Harrison,T.G.,Afshar,B.,Doshi,N.,Fry,N.K.&Lee,J.V.Distribution of Legionella pneumophila serogroups,monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales(2000-2008).Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.28,781-791 (2009) .

[0277] Knirel,Y.A.,Rietschel,E.T.,Marre,R.&Zahringer,U.The structure of the O-specific chain of Legionella pneumophila serogroup 1lipopolysaccharide.Eur .J.Biochem.221,239-245 (1994) .

[0278] Glaze,P.A.,Watson,D.C.,Young,N.M.&Tanner,M.E.Biosynthesis of CMP-N,

N'-diacetyllegionaminic acid from UDP-N,N'-diacetylbacillosamine in *Legionella pneumophila*. *Biochemistry* 47,3272-3282 (2008) .

[0279] McGill,N.W.&Williams,S.J.2,6-Disubstituted Benzoates As Neighboring Groups for Enhanced Diastereoselectivity in β -Galactosylation Reactions: Synthesis of β -1,3-Linked Oligogalactosides Related to Arabinogalactan Proteins.*J.Org.Chem.*74,9388-9398 (2009) .

[0280] Zemplén,G.,Kunz,A. Über die Natriumverbindungen der Glucose und die Verseifung der acylierten Zucker.*Chem Ber* 56,1705-1710 (1923) .

[0281] Lee,D.&Taylor,M.S.Borinic Acid-Catalyzed Regioselective Acylation of Carbohydrate Derivatives.*J.Am.Chem.Soc.*133,3724-3727 (2011) .

[0282] Tsvetkov,Y.E.,Shashkov,A.S.,Knirel,Y.A.&Zahringer,U.Synthesis and NMR spectroscopy of nine stereoisomeric 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradexynon-2-ulosonic acids.*Carbohydr Res* 335,221-243 (2001) .

[0283] Dumont,A.,Malleron,A.,Awwad,M.,Dukan,S.&Vauzeilles,B.Click-mediated labeling of bacterial membranes through metabolic modification of the lipopolysaccharide inner core.*Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*51,3143-3146 (2012) .

[0284] Hewitt,M.C.&Seeberger,P.H.Solution and Solid-Support Synthesis of a Potential Leishmaniasis Carbohydrate Vaccine.*J.Org.Chem.*66,4233-4243 (2001) .

[0285] Moss,C.W.,Weaver,R.E.,Dees,S.B.&Cherry,W.B.Cellular fatty acid composition of isolates from Legionnaires disease.*J.Clin.Microbiol.*6,140-143 (1977) .

[0286] Aurell,H.et al.*Legionella pneumophila* Serogroup 1 Strain Paris: Endemic Distribution throughout France.*J.Clin.Microbiol.*41,3320 (2003) .

[0287] Baron,A.,Bleriot,Y.,Sollogoub,M.&Vauzeilles,B.Phenylenediamine catalysis of“click glycosylations”in water:practical and direct access to unprotected neoglycoconjugates.*Org.Biomol.Chem.*6,1898-1901 (2008) .

[0288] Knirel,Y.A.et al.Identification of a Homopolymer of5-Acetamidino-7-acetamido-3,5,7,9-tetradexy-d-glycero-d-talo-nonulosonic Acid in the Lipopolysaccharides of *Legionella pneumophila* Non-1 Serogroups.*Biochemistry (Moscow)* 66,1035-1041 (2001) .

[0289] Antonczak,A.K.,Simova,Z.&Tippmann,E.M.A critical examination of *Escherichia coli* esterase activity.*J.Biol.Chem.*284,28795-28800 (2009) .

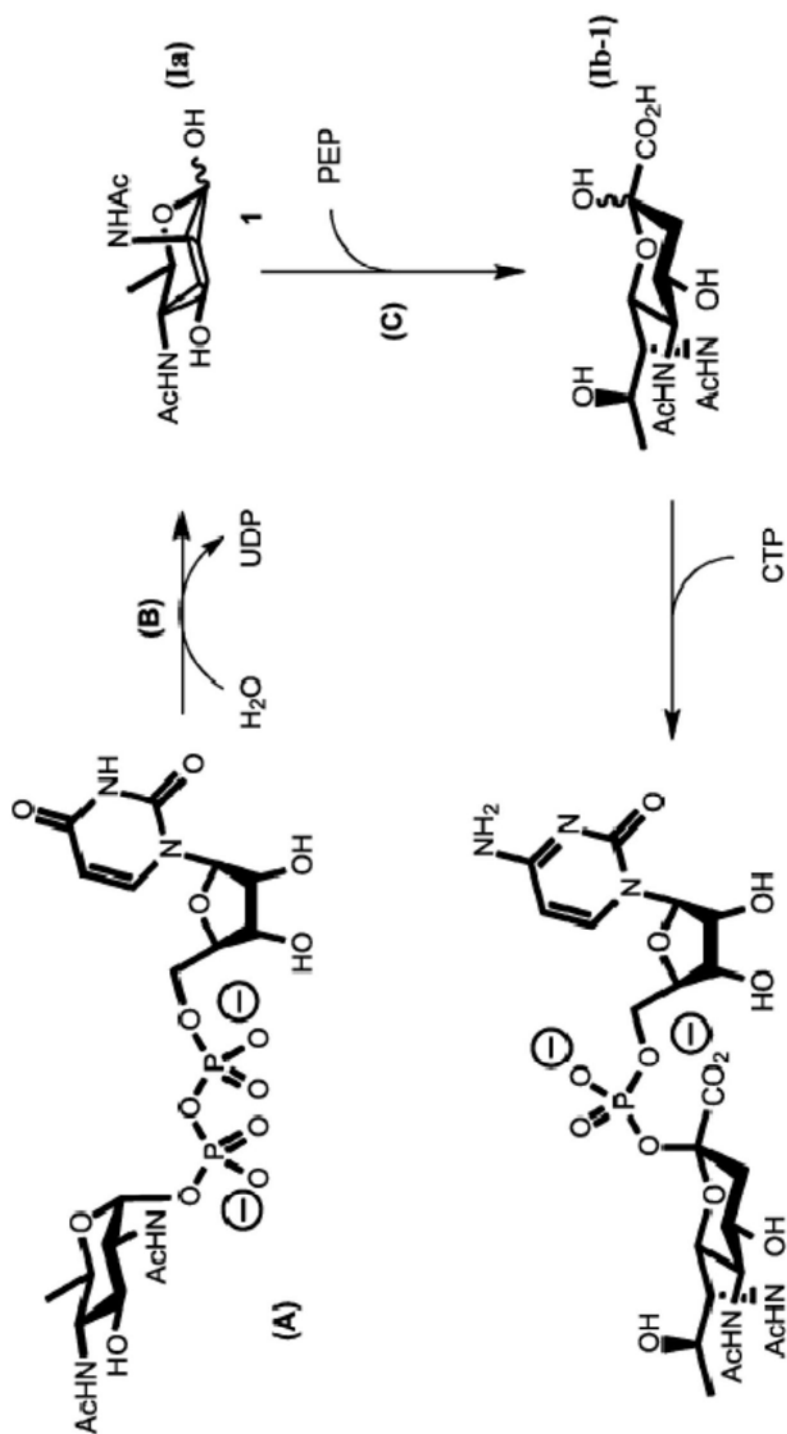


图1

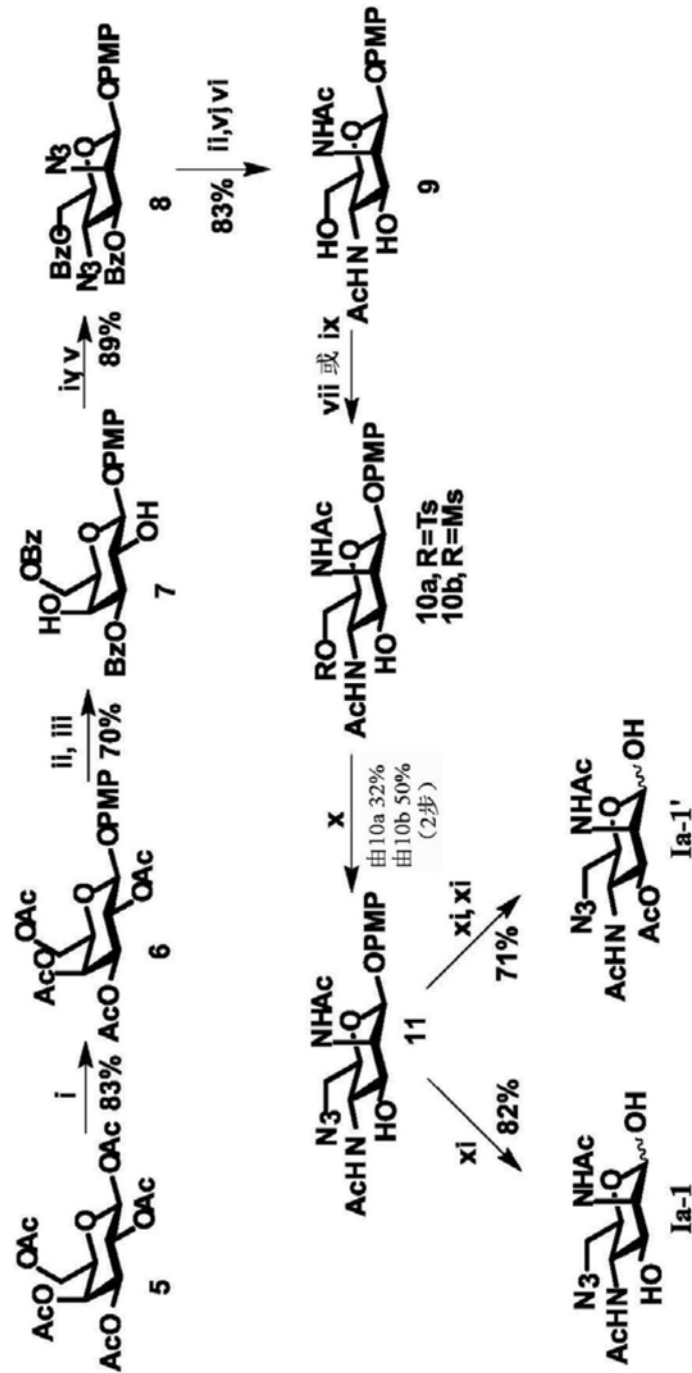


图2

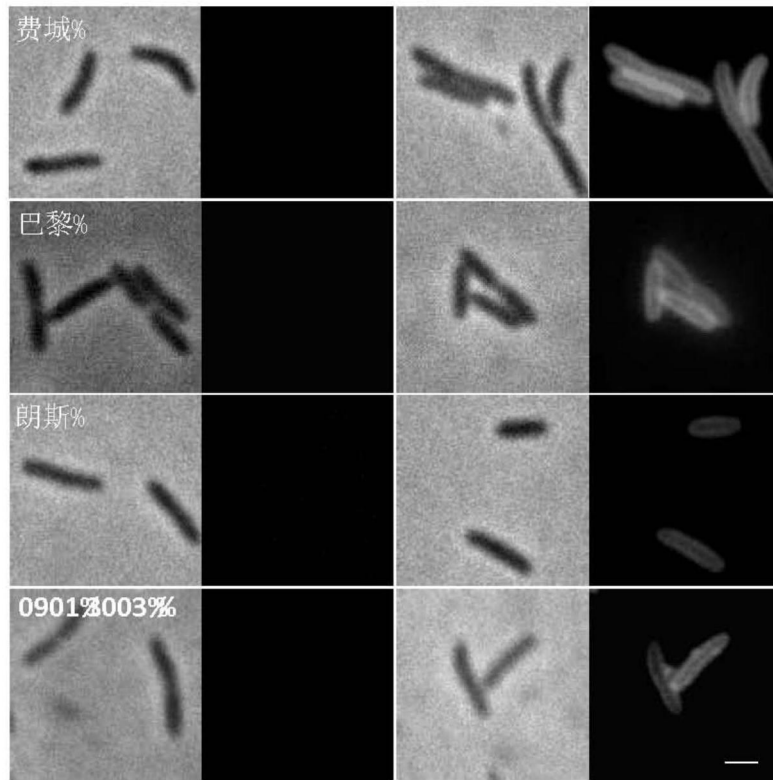


图3

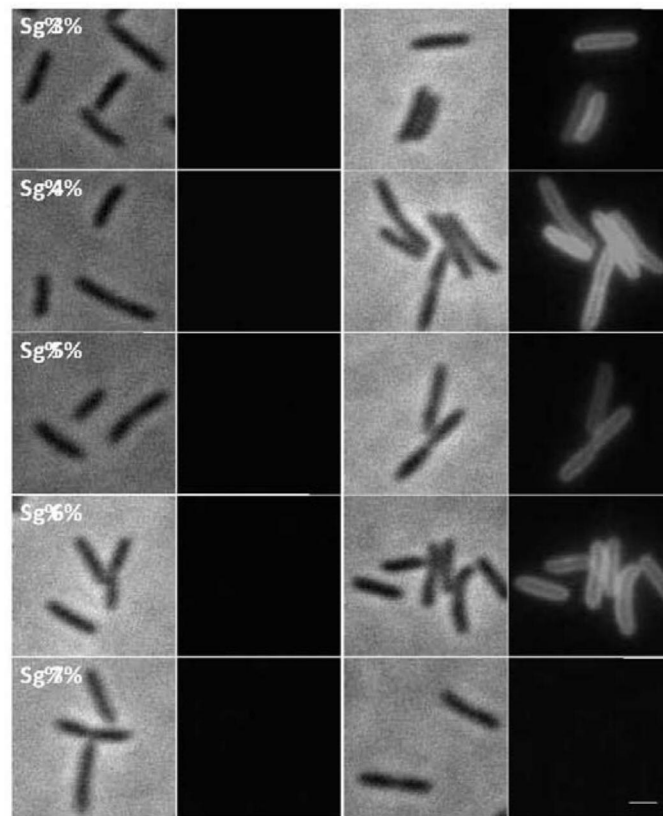


图4

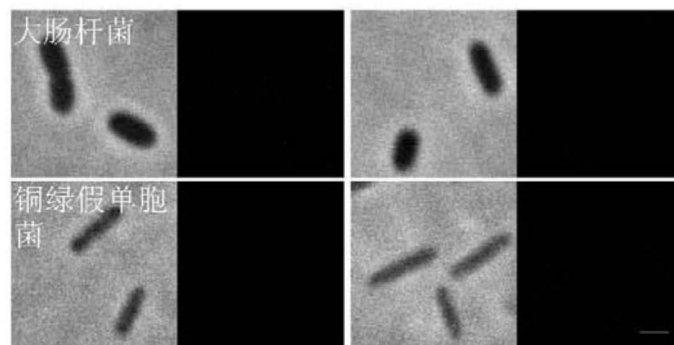


图5

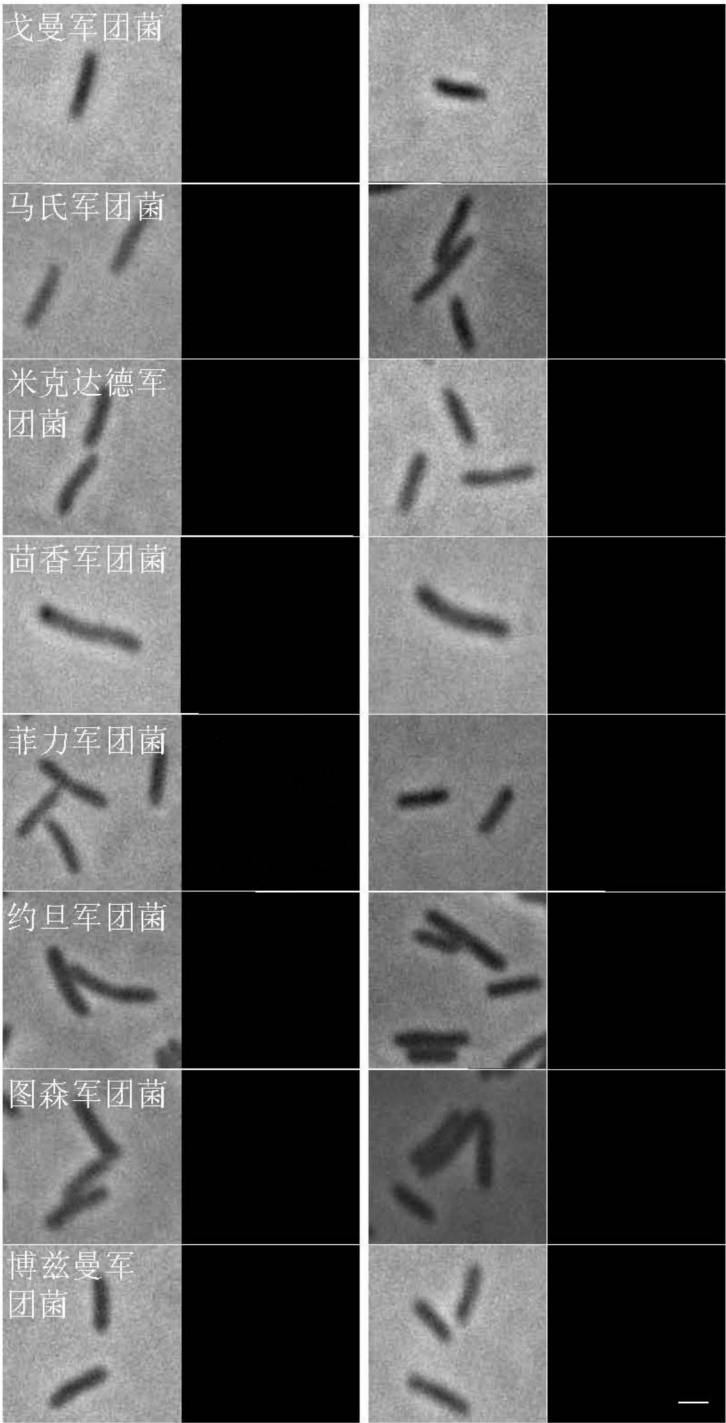


图6

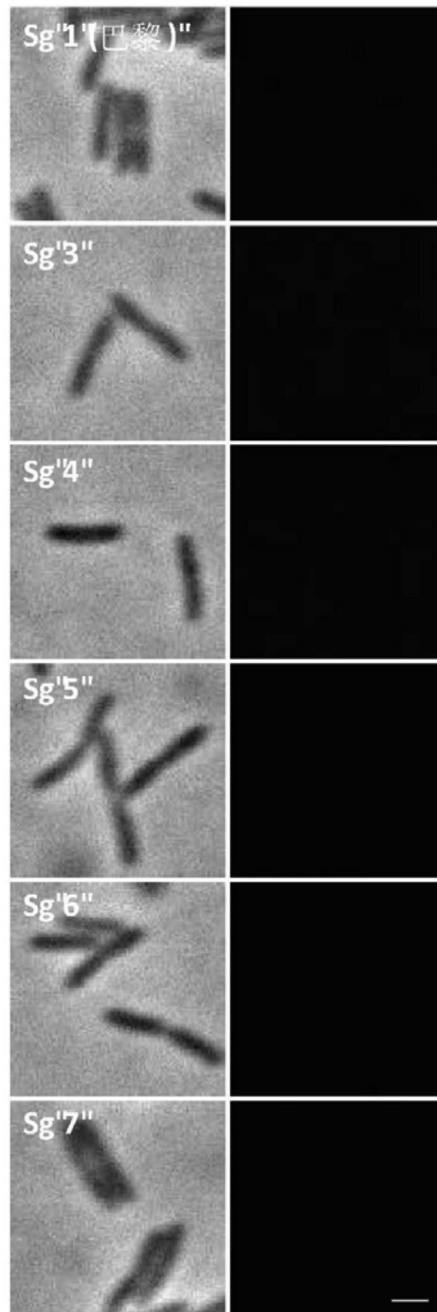


图7