

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 846 884**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2016 PCT/EP2016/059880**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016 WO16177724**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2016 E 16722831 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2020 EP 3292212**

54 Título: **Un método para marcar específicamente bacterias vivas que comprende el uso de compuestos monosacáridos no endógenos modificados**

30 Prioridad:

04.05.2015 EP 15166250

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.07.2021

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR y
UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DUKAN, SAM;
VAUZEILLES, BORIS;
MAS PONS, JORDI y
BARON, AURÉLIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 846 884 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un método para marcar específicamente bacterias vivas que comprende el uso de compuestos monosacáridos no endógenos modificados

5 La presente invención se refiere a un método para marcar bacterias vivas, incorporando compuestos que portan un grupo reactivo en la envoltura de dichas bacterias. La presente invención proporciona más particularmente un método que permite el marcaje de bacterias.

El término "envoltura" en esta memoria incluye cualquier pared, capa o membrana en la superficie de la bacteria, especialmente la pared celular, incluida la envoltura, más particularmente la membrana plasmática interna y la capa de peptidoglicano para las bacterias, así como la membrana externa para bacterias Gram-negativas.

10 La presente invención se refiere a un método para marcar bacterias vivas incorporando compuestos monosacáridos modificados en la envoltura de dichas bacterias, más particularmente en los polisacáridos (especialmente LPS o CPS) de la envoltura de las bacterias. La presente invención proporciona más particularmente un método que permite el marcaje de bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas utilizando un monosacárido no endógeno modificado, a saber, que no está específicamente presente dentro de la envoltura de la bacteria así marcada.

15 El documento WO 2013/107759 describe un método para marcar bacterias vivas, más particularmente, bacterias Gram-negativas. El método consiste esencialmente en incorporar en la membrana de dichas bacterias por asimilación un análogo de compuesto monosacárido endógeno del tipo ácido ulosónico modificado, de modo que porte una denominada primera función química reactiva tal como azida (-N₃) o alquino (-C≡CH), permitiendo así una reacción de este primer grupo reactivo con una molécula que porta el grupo reactivo complementario, especialmente a través de la denominada reacción química de clic.

20 Más particularmente, en el documento WO 2013/107759 se ha descrito que análogos modificados de este tipo de azúcares endógenos que comprenden ácido ulosónico o residuo de ulosonato son particularmente ventajosos, debido a que este tipo de residuos se puede encontrar en glicanos de la membrana bacteriana, especialmente LPS de todas las bacterias Gram-negativas y, además, se pueden asimilar directamente en la misma forma en la que se incorporarán en dichos glicanos del LPS de bacterias Gram-negativas.

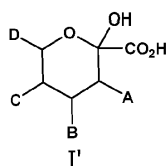
25 Los ácidos ulosónicos (también denominados ácidos cetoaldónicos o ácidos aldulosónicos) son monosacáridos de la familia de las cetosas, que presentan una función cetona en C-2 y un ácido carboxílico en C-1. Los ácidos octulosónico y nonulosónico se encuentran en diversos glicanos naturales, incluidas diferentes formas de glicanos bacterianos (especialmente LPS, polisacárido capsular, glicoproteínas). La vía biosintética que conduce a la elaboración de estos glicanos implica generalmente al ácido ulosónico libre como un compuesto intermedio, que luego se activa directamente en forma de un donante de CMP-azúcar. Todas las bacterias LPS Gram-negativas comprenden dichos residuos de ulosonato.

30 Más exactamente, el método descrito en el documento WO 2013/107759 es un método para marcar específicamente bacterias vivas de una categoría dada de bacterias en una muestra que comprende bacterias, comprendiendo el método comprende las etapas de:

35 a) incubar dichas bacterias de dicha muestra con al menos un análogo de un compuesto monosacárido, siendo dicho monosacárido un residuo monosacárido endógeno de glicanos de la membrana externa de categoría dada de bacterias de este tipo, comprendiendo dicho residuo monosacárido endógeno un residuo de ácido ulosónico o sal de ulosonato, siendo dicho análogo de un compuesto monosacárido un monosacárido modificado sustituido en una posición dada con un primer grupo químico reactivo capaz de reaccionar con un segundo grupo reactivo de una molécula marcadora, y

40 b) poner en contacto dichas bacterias con dicha molécula marcadora que comprende dicho segundo grupo reactivo, para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo de dicho residuo análogo incorporado dentro de dichos glicanos de la membrana externa de dichas bacterias vivas con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula marcadora.

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



50 en donde

- A, B y C pueden ser independientemente H, OH, NH₂, OH y NH₂ sustituidos o no por grupos protectores de los mismos, y

- D es una cadena de alquilo en C₂ a C₄, y

- al menos uno de los grupos A, B, C o D está sustituido con dicho primer grupo reactivo.

- 5 En el documento WO 2013/107759, dicho análogo de monosacárido incubado con las bacterias vivas en la etapa a) y luego incorporado dentro de su membrana externa después de la asimilación por las bacterias, puede ser idéntico al monosacárido endógeno incorporado en la cadena de glicanos de la membrana externa, excepto porque se modifica únicamente mediante la sustitución de dicho primer grupo reactivo. En el documento EP 2 617 833 análogos de azúcares endógenos que comprenden un residuo de ácido ulosónico o de ulosonato son particularmente ventajosos, debido a que este tipo de residuos se puede encontrar en glicanos de la membrana bacteriana, especialmente LPS de todas las bacterias Gram-negativas y, además, se pueden asimilar directamente en la misma forma en la que serán incorporados en dichos glicanos del LPS de bacterias Gram-negativas. FIROZ A. JAIPURI ET AL: 18 de enero de 2008 (18-01-2008) (ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION) y Reiko Sadamoto ET AL: 17 de noviembre de 2008 (17-11-2008) (CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL) describen análogos de manosa acilados y compuestos de glucosamino-6-fosfato, respectivamente.

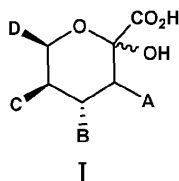
El objetivo de la presente invención fue descubrir otros compuestos monosacáridos capaces de ser asimilados dentro de otras bacterias o una gama más amplia de bacterias y, especialmente, dentro tanto de bacterias Gram-negativas como Gram-positivas y que presenten propiedades ventajosas y diferentes en cuanto a su especificidad de incorporación con respecto a la categoría de bacterias en cuestión.

- 20 Más exactamente, la presente invención proporciona un método para marcar específicamente bacterias vivas en una muestra que comprende bacterias, comprendiendo el método las etapas de:

a) incubar dichas bacterias de dicha muestra con al menos un compuesto de monosacárido modificado que comprende un primer grupo químico reactivo capaz de reaccionar químicamente con un segundo grupo reactivo, de modo que un residuo de monosacárido que porta dicho primer grupo reactivo se incorpore en la envoltura de dichas bacterias vivas, especialmente en los polisacáridos de la envoltura de dichas bacterias, más especialmente en el LPS o CPS de la membrana externa de dichas bacterias, y

- b) poner en contacto dicho residuo incorporado en la envoltura de dichas bacterias vivas, con una molécula marcadora que comprende dicho segundo grupo reactivo, para generar la reacción química de dicho primer grupo reactivo de dicho residuo incorporado dentro de dichas bacterias vivas con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula marcadora, dando como resultado un enlace covalente,

caracterizado porque dicho residuo no es un residuo de ácido ulosónico endógeno de la envoltura de dichas bacterias, preferiblemente dicho residuo es un estereoisómero que no se produce de forma natural de un residuo de ácido ulosónico endógeno de la envoltura de dichas bacterias, dicho compuesto de monosacárido modificado tiene la siguiente fórmula (I), o una sal del mismo:



- 35 en donde

- A es H, OH, NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con dicho grupo protector seleccionado del grupo que consiste en grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, y - B es OH, NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, y - C es OH, NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con dicho grupo protector y - D es un alquilo C₂ o C₄, estando cada uno de los carbonos sustituido o no con OH o NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con grupos protectores seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo e imidoilo, y - el grupo D está sustituido con dicho primer grupo reactivo, en donde el primer grupo reactivo Ra se selecciona entre grupos que consisten en o que portan el grupo azido y grupos que consisten en o que portan el grupo alquino, siendo dicho primer grupo reactivo preferiblemente el grupo azido, y dicho segundo grupo reactivo se selecciona entre grupos que consisten en o portan, respectivamente, los grupos alquino y azido, siendo dicho segundo grupo reactivo preferiblemente el grupo alquino, la reacción de dicho grupo reactivo azido con dicho grupo reactivo alquino se lleva a cabo realizando una cicloadición de azida alquino.

- Más particularmente, un compuesto de fórmula (I) de este tipo es un ácido ulosónico sustituido o una sal ulosonato del mismo.

La expresión "que no se produce de forma natural" significa que dicho compuesto de monosacárido que está modificado por dicho primer grupo reactivo, a saber, el residuo de monosacárido no modificado de dicho compuesto de monosacárido modificado, tampoco se recupera como un residuo de monosacárido endógeno de los glicanos de la envoltura de dichas bacterias, ni se recupera como un precursor de los mismos en la vía biosintética de un residuo de monosacárido endógeno de este tipo de los glicanos de la envoltura de dichas bacterias.

Las bacterias comprenden bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas, así como bacterias que no son ni Gram-negativas ni Gram-positivas.

Un compuesto de fórmula (I) de este tipo puede ser asimilado por una amplia gama de categorías de bacterias.

De acuerdo con la presente divulgación, los mecanismos precisos por los cuales dicho compuesto de monosacárido modificado es asimilado por las bacterias al incorporar dicho residuo que porta dicho primer grupo reactivo en el mismo no está completamente determinado.

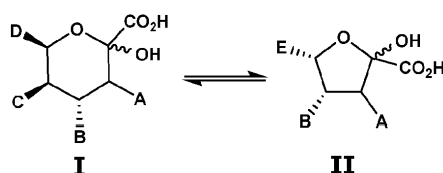
Sin embargo, parece que dicho compuesto de monosacárido es diferente a los residuos de monosacáridos endógenos de la envoltura de dichas bacterias y más particularmente, en el caso de bacterias Gram-negativas diferentes a los residuos de monosacáridos endógenos de polisacáridos de la membrana externa de este tipo de bacterias, tales como LPS o polisacáridos capsulares (CPS) de bacterias y que, sin embargo, sean capaces de penetrar e incorporarse en dichas bacterias.

La expresión "residuo de monosacárido endógeno" significa un residuo, presente de forma natural en la envoltura de dichas bacterias, más particularmente en polisacáridos de la envoltura de dichas bacterias.

Más particularmente, en el método de la presente divulgación, dichos compuestos de monosacáridos modificados no son estereoisómeros que se producen de forma natural de monosacáridos endógenos modificados de la fórmula (I') anterior descrita y reivindicada en el documento WO 2013/107759. Los compuestos de la presente divulgación podrían metabolizarse y convertirse durante la etapa de incubación a) para quedar incorporados dentro de glicanos de la envoltura de dichas bacterias, probablemente convertidos en residuos de monosacáridos endógenos modificados de los glicanos de la envoltura de bacterias de este tipo, es decir, residuos de monosacáridos endógenos modificados porque portan dichos primeros grupos reactivos.

Alternativamente, podría ser que dichos compuestos de monosacáridos modificados puedan ser metabolizados, convertidos o degradados en una molécula, dando lugar a dicho residuo distinto del residuo de monosacárido incorporado a dichas bacterias o dando lugar a un precursor de dicho residuo.

La fórmula con un ciclo piranósico (I) puede estar en parte en equilibrio con un siguiente ciclo furanósico (II), aunque generalmente predomina la fórmula (I):



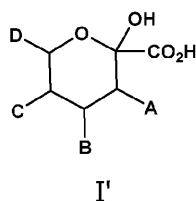
siendo C = OH, y siendo E tal que E = CHOHD.

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

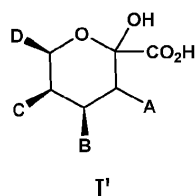
Más particularmente, para NH₂, los grupos protectores se pueden seleccionar entre grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo.

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

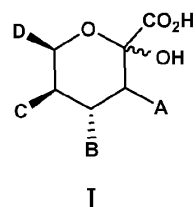
Debe entenderse que dicho residuo de monosacárido de dicho compuesto de monosacárido modificado no son estereoisómeros que se producen de forma natural del residuo de monosacárido endógeno de compuestos de fórmula (I') de la envoltura en dichas bacterias:



Especialmente, el siguiente estereoisómero como en Kdo:



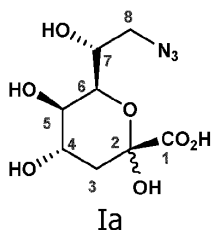
- 5 Preferiblemente, dicho compuesto de monosacárido modificado es un compuesto que tiene dicha fórmula (I), o una sal del mismo:



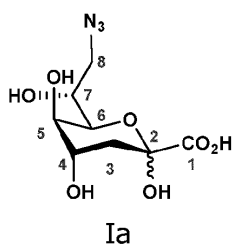
en donde:

- A es H, OH, NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con dicho grupo protector, y
- B es H, OH, NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con dicho grupo protector, y
- 10 - C es H, OH, NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con dicho grupo protector, y
- D es un alquilo C₂ o C₄, estando cada uno de los carbonos sustituido o no con OH o NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con grupos protectores de los mismos, preferiblemente estando OH y NH₂ sustituidos con grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, y
- al menos el grupo D está sustituido con dicho primer grupo reactivo Ra.
- 15 Más particularmente, dicho monosacárido modificado es un compuesto de fórmula (I), en donde D = -CHOH-CH₂-OH, A = H, B = OH, C = OH, estando OH de B, C y D sustituido o no con un grupo protector, preferiblemente un grupo alquilo, hidroxialquilo, acilo o formilo, y estando al menos un grupo OH de B, C o D sustituido con dicho primer grupo reactivo Ra.
- 20 Preferiblemente, dicho compuesto de monosacárido modificado es un compuesto (I) sustituido, en donde D = -CHOH-CH₂-Ra, A = H, B = OH, C = OH, estando OH de B, C y D sustituido o no preferiblemente con un grupo alquilo, hidroxialquilo, acilo o formilo.

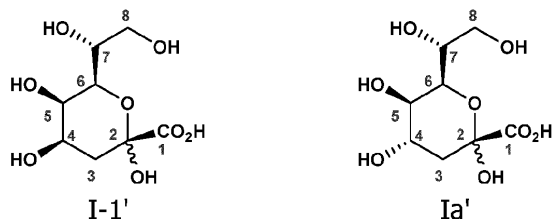
Más preferiblemente, dicho compuesto de monosacárido es un compuesto que tiene la siguiente fórmula de estereoisómero (Ia), o una sal del mismo, en donde:



- 25 (Ia) es el epímero C-4 de 8-azido-3,8-didesoxi-D-mano-octulosonato denominado 8-azido-3,8-didesoxi-D-gluco-octulosonato y también se puede representar como:



Dicho compuesto (Ia) es un 4eKdo (Ia') modificado que es un epímero que no se produce de forma natural en la posición C-4 del ácido ulosónico endógeno Kdo (I-1'):



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

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

- 10 Preferiblemente, el dicho primer grupo reactivo Ra se selecciona entre grupos que consisten en o que portan el grupo azido (-N₃) y grupos que consisten en o que portan el grupo alquino (-C≡C-), siendo dicho primer grupo reactivo preferiblemente el grupo azido, y dicho segundo grupo reactivo se selecciona entre grupos que consisten en o que portan, respectivamente, los grupos alquino y azido, siendo dicho segundo grupo reactivo preferiblemente el grupo alquino, y la reacción de dicho grupo azido reactivo con dicho grupo alquino reactivo se lleva a cabo al realizar una cicloadición de azida alquino.
- 15

Más preferiblemente, Ra es -N₃ o -C=CH, preferiblemente -N₃.

Un compuesto de fórmula (I) de este tipo puede ser asimilado por una amplia gama de categorías de bacterias y dar lugar a la incorporación de dicho residuo en la envoltura de este tipo de bacterias.

- 20 Más particularmente, el compuesto de fórmula (I) puede utilizarse para marcar bacterias que pueden seleccionarse entre *interalia* en el siguiente género de bacterias: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Vibrio*.

Más particularmente, el compuesto de fórmula (I) puede utilizarse para marcar bacterias Gram-negativas, así como Gram-positivas que pueden seleccionarse entre *interalia* en el siguiente género de bacterias:

- 25 Más particularmente, entre las bacterias Gram-negativas que pueden asimilar compuestos de fórmula (I), preferiblemente dicho compuesto de fórmula (Ia), se pueden citar las siguientes especies: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholera*.
- 30 Más particularmente, entre las bacterias Gram-positivas que pueden asimilar compuestos de fórmula (I), preferiblemente dicho compuesto de fórmula (Ia), se pueden citar las siguientes especies: *Bacillus cereus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*.

- 35 Entre las bacterias anteriores, las siguientes no asimilaron Kdo-N₃ (I-1') del documento WO 2013/107759: *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, siendo todas ellas bacterias Gram-positivas, excepto *Neisseria gonorrhoeae*.

- 40 Más particularmente, el tiempo de incubación en la etapa a) es de 1 h a 24 h, preferiblemente de 1 h a 12 h y la concentración de compuesto de monosacárido modificado es de 10⁻⁵ M a 1 M, para detectar una concentración de bacterias preferiblemente de no más de 10¹¹ células/ml, más particularmente no más de 10⁹ células/ml.

Las bacterias vivas son bacterias capaces de multiplicarse. Como la mayoría de las regulaciones sanitarias se refieren a la numeración de bacterias capaces de multiplicarse, especialmente capaces de multiplicarse en un medio de crecimiento sólido, ventajosamente la presente invención proporciona más particularmente un método para marcar específicamente bacterias capaces de multiplicarse, en el que dichas bacterias se incuban en un medio de cultivo en (medio líquido) o sobre (medio sólido) en el que dichas bacterias son capaces de multiplicarse.

Patógenos severos se esconden entre las bacterias arriba mencionadas, y el rápido marcaje y/o detección de bacterias vivas representa un importante desafío sanitario. Los monosacáridos modificados de la presente invención son asimilados rápidamente por las bacterias y permiten un rápido marcaje y detección de los mismos, tardando el proceso general menos de un día, de bacterias vivas de tipo salvaje. Este método es muy rápido en comparación con la detección habitual de bacterias vivas, que normalmente necesita entre 2 días y más de un mes dependiendo de la cepa bacteriana.

Ventajosamente, la presente invención comprende la etapa adicional (c) de detectar bacterias vivas para detectar si dichas bacterias comprenden dicha molécula marcadora unida a su envoltura y/o inmovilizar dichas bacterias vivas que portan dicha molécula marcadora sobre un sustrato sólido, en donde dicha molécula marcadora es una molécula que comprende una sustancia detectable o es capaz de reaccionar o unirse a una sustancia detectable o dicha molécula marcadora es una primera molécula que porta dicho segundo grupo reactivo, siendo dicha primera molécula capaz de reaccionar o de unirse a una segunda molécula y/o a un sustrato sólido, comprendiendo preferiblemente dicha segunda molécula una sustancia detectable y/o estando dicha segunda molécula unida o siendo capaz de unirse a dicho sustrato sólido.

Por consiguiente, la presente divulgación permite (a) numerar o identificar bacterias vivas detectadas, así como (b) concentrar y/o aislar las bacterias vivas inmovilizadas sobre un soporte sólido; especialmente con un soporte sólido constituido por perlas magnéticas que portan dicho segundo grupo reactivo.

Más particularmente, dicha molécula marcadora es una molécula detectable que comprende una sustancia detectable, comprendiendo el método la etapa c) de detectar bacterias vivas para detectar si dichas bacterias comprenden dicha molécula detectable unida a los glicanos de su membrana externa.

Dicha etapa de detección c) puede llevarse a cabo en un medio líquido o sobre un sustrato sólido.

Más particularmente, dicha molécula marcadora puede ser una molécula detectable, a saber, una molécula que consiste en o que porta una sustancia detectable, a saber, una sustancia susceptible de ser detectada por técnicas conocidas por un experto en la técnica, tales como fluorescencia, colorimetría o luminiscencia.

Más particularmente, dicha molécula marcadora es un primer ligando o primera proteína de unión que porta dicho segundo grupo reactivo y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando o primera proteína de unión se detectan y/o inmovilizan al poner en contacto dicho primer ligando o dicha primera proteína de unión con un segundo ligando o una segunda proteína de unión que reacciona o que se une específicamente a dicho primer ligando o primera proteína de unión.

Más particularmente, dicha molécula marcadora es un primer ligando, preferiblemente biotina, que porta dicho segundo grupo reactivo, y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando se detectan por reacción de dichas bacterias con un anticuerpo u otra proteína específica para dicho primer ligando, portando dicho anticuerpo una sustancia detectable, preferiblemente un fluorocromo o molécula luminiscente o una enzima.

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

- dicho compuesto de monosacárido modificado de fórmula (I) y

- dicha molécula marcadora que comprende dicho segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con dicho primer grupo reactivo, y

- si se requiere, reaccionantes para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula marcadora, y

- preferiblemente, un medio de cultivo o incubación que permita el crecimiento de dichas bacterias, preferiblemente específico para el crecimiento de dichas bacterias.

Preferiblemente, el dicho primer grupo reactivo Ra se selecciona entre los grupos que consisten en o que portan el grupo azido (-N₃) y grupos que consisten en o que portan el grupo alquino (-C≡C-), y dicho segundo grupo reactivo Rb se selecciona entre los grupos que consisten en o que portan respectivamente el grupos alquino (-C≡C-) y azido (-N₃), y el hacer reaccionar el dicho grupo reactivo azido con dicho grupo alquino (-C≡C-) se lleva a cabo al realizar una cicloadición de azida alquino.

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

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

Otros ligandos apropiados que se utilizan con frecuencia son: tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THPTA), ácido 2-(4-((bis((1-terc.-butil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etanosulfónico (BTES), tris((1-((O-etil)carboximetil)-(1,2,3-triazol-4-il))metil)amina, disulfonato de batofenantrolina o Tris(2-bencimidazolilmetil)aminas.

Alternativamente, la cicloadición de azida alquino se puede realizar en ausencia de cobre, si se utiliza un alquino deformado, tal como azidibenzociclooctina (ADIBO, DIBAC o DBCO) o tetrametoxidibenzociclooctina (TMDIBO).

Otros alquinos deformados apropiados que se utilizan con frecuencia para la reacción exenta de cobre incluyen: ciclooctina (OCT), ciclooctina exenta de arilo (ALO), monofluorociclooctina (MOFO), difluorociclooctina (DIFO), dibenzociclooctina (DIBO), dimetoxiazaciclooctina (DIMAC), biarilazaciclooctina (BARAC), biciclononina (BCN), tetrametiltepinio (TMTI, TMTI), difluorobenzociclooctina (DIFBO), oxa-dibenzociclooctina (ODIBO), carboximetilmonobenzociclooctina (COMBO) o benzociclononina.

Son posibles otros grupos reactivos y otras reacciones tales como; Ligadura de Staudinger (primer grupo reactivo = azida y segundo grupo reactivo = fosfina), química de clic exenta de cobre (primer grupo reactivo = azida y segundo grupo reactivo = alquino restringido (alquino intracíclico)), condensación de carbonilo (primer grupo reactivo = aldehído o cetona y segundo grupo reactivo = hidrazida u oxiamina), química de clic tiol-eno (primer grupo reactivo = tiol y segundo grupo reactivo = alqueno), química de clic óxido de nitrilo-eno (primer grupo reactivo = óxido de nitrilo o aldehído, oxima, o cloruro de hidroximoilo o cloroxima y segundo grupo reactivo = alqueno o alquino), química de clic de nitrilo imina-eno (primer grupo reactivo = nitrilo imina o aldehído, hidrazona o cloruro de hidrazonoilo o clorohidrazona y segundo grupo reactivo = alqueno o alquino), ligadura inversa de Diels-Alder con demanda de electrones (primer grupo reactivo = alqueno y segundo grupo reactivo = tetrazina), química de clic de isonitrilo-tetrazina (primer grupo reactivo = isonitrilo y segundo grupo reactivo = tetrazina), acoplamiento de Suzuki-Miyaura (primer grupo reactivo = haluro de arilo y segundo grupo reactivo = boronato de arilo), etiqueta His (primer grupo reactivo = oligo-histidina y segundo grupo reactivo = complejo de níquel o ligando de níquel).

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

Puede obtenerse otra especificidad de detección y más alta incubando la muestra de bacterias con dos de dichos compuestos monosacáridos modificados diferentes y dos moléculas detectables diferentes.

En otra divulgación particular del método de la presente invención, dicha incubación de la etapa a) y la reacción de la etapa b) se llevan a cabo en un filtro de membrana de manera que se agrupan las bacterias cultivadas que emanan de una misma bacteria original que se ha multiplicado y se puede visualizar con un microscopio y dicha molécula detectable se puede detectar mediante visualización con dicho microscopio. Por lo tanto, el número de bacterias cultivables puede cuantificarse de ese modo.

Esta divulgación permite filtrar la muestra ensayada sobre dicho filtro de membrana tal como una membrana de poliéster, antes de la asimilación de dicho monosacárido modificado para evitar la sobre-estimación de bacterias vivas debido al posible crecimiento durante el período de asimilación. De hecho, cuando las células fijadas en la parte superior de una membrana de este tipo comienzan a crecer, permanecen juntas y forman una micro-colonia que puede detectarse fácilmente como procedente de la misma célula. Por tanto, esto permite numerar contando las bacterias cultivables.

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

El medio de cultivo o incubación de la divulgación comprende agentes que potencian y/o aceleran la velocidad de crecimiento y/o la capacidad de formar colonias de dicha categoría dada de bacterias. Más particularmente, el medio de incubación comprende al menos un agente antioxidante tal como piruvato o catalasa.

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

- dicha molécula detectable o dicha segunda molécula que porta una sustancia detectable, preferiblemente un fluorocromo o molécula luminiscente o una enzima, y/o

- un sustrato sólido que porta dicha segunda molécula capaz de reaccionar o unirse específicamente con dicha molécula marcadora.

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

- dicha molécula detectable que comprende dicho segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con dicho primer grupo reactivo, y

- un medio sólido que permite la visualización de las bacterias después de la incubación con dicho compuesto de monosacárido modificado, dichos reaccionantes y dicha molécula detectable.

10 Más particularmente de nuevo, el kit comprende:

- dicho compuesto de monosacárido modificado sustituido con dicho primer grupo reactivo que comprende un grupo azido o alquino, y

- dicho segundo grupo reactivo de la molécula detectable que porta un grupo alquino o, respectivamente, un grupo azido, y

15 - posiblemente, dichos reaccionantes comprenden un catalizador de cobre y un ligando de trisriazolilo.

En una primera divulgación particular, dicha molécula marcadora puede ser una molécula detectable, a saber, una molécula que consiste en o que porta una sustancia detectable, a saber, una sustancia susceptible de ser detectada como un fluorocromo o sustancia luminiscente o una enzima tal como peroxidasa, siendo dicha enzima detectada más particularmente después de reaccionar con un co-reaccionante.

20 En una divulgación particular adicional, útil para aislar y/o concentrar bacterias vivas, dicha molécula marcadora puede unirse a un sustrato sólido cuando se lleva a cabo la etapa b).

En una divulgación particular adicional, dicha molécula marcadora es una molécula que es un primer ligando o primera proteína de unión que porta dicho segundo grupo reactivo y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando o primera proteína de unión se detecta y/o inmoviliza poniendo en contacto dicho primer ligando o primera proteína de unión con una segunda molécula que es un segundo ligando o una segunda proteína de unión que reacciona o se une específicamente a dicho primer ligando o primera proteína de unión.

25 Entonces, ventajosamente, dicho primer o segundo ligando o proteína de unión puede reaccionar o unirse a una tercera proteína de unión que porta dicha sustancia detectable, tal como un fluorocromo o sustancia luminiscente o una enzima, tal como peroxidasa, dicha tercera proteína de unión se une específicamente a dicho primer y/o segundo ligando o proteína de unión. La detección de dicha sustancia detectable a través de dicho segundo ligando o segunda proteína de unión o tercera proteína de unión permite amplificar la señal de dicha sustancia detectable.

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

- biotina, siendo dicha segunda proteína de unión avidina o estreptavidina y siendo dicha tercera proteína de unión un anticuerpo producido contra biotina, o

35 - avidina o estreptavidina, siendo entonces dicha segunda proteína de unión al ligando biotina y siendo dicha tercera proteína de unión un anticuerpo producido contra avidina o estreptavidina, o

- un primer anticuerpo, siendo entonces dicha segunda proteína de unión un segundo anticuerpo específico para dicho primer anticuerpo y siendo dicha tercera proteína de unión un tercer anticuerpo específico para dicho primer anticuerpo.

40 Más particularmente, dicha molécula marcadora es un primer ligando, preferiblemente biotina, que porta dicho segundo grupo reactivo, y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando son detectadas por reacción de dichas bacterias con un anticuerpo específico para dicho primer ligando, portando dicho anticuerpo una sustancia detectable, preferiblemente un fluorocromo o molécula luminiscente o una enzima.

45 Más particularmente de nuevo, dicha molécula marcadora es un primer ligando, preferiblemente biotina, que porta dicho segundo grupo reactivo, y en la etapa c) dicha bacteria viva acoplada a dicha primera proteína de unión se inmoviliza haciendo reaccionar dicho primer ligando con un sustrato sólido, preferiblemente perlas magnéticas, acoplado a dicha segunda proteína de unión, preferiblemente avidina o estreptavidina, antes de detectar dichas bacterias vivas por amplificación enzimática de ADN bacteriano o por reacción de dichas bacterias con una tercera proteína de unión que reacciona o se une específicamente a dicho primer ligando o segunda proteína de unión, portando dicha tercera proteína de unión una sustancia detectable, preferiblemente un fluorocromo o molécula

luminiscente o una enzima, siendo dicha tercera proteína de unión preferiblemente un anticuerpo específico para dicho primer ligando o primera proteína de unión.

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

- 5 Una realización de este tipo, en la que dichas bacterias vivas están inmovilizadas sobre dicho sustrato sólido permite concentrar la muestra en dichas bacterias y cuantificar dichas bacterias vivas mediante cualquier método conocido, incluida la amplificación enzimática de ADN, tal como la PCR, especialmente la PCR en tiempo real o un método que implica una reacción inmunológica con un anticuerpo marcado, tal como un ensayo ELISA.

- 10 Otras características y ventajas de la presente invención serán más evidentes a la vista de la siguiente descripción detallada y ejemplos de realizaciones ilustrativas y no limitantes.

Ejemplo 1: Síntesis del compuesto (1a): 4eKdo-N₃ (6).

En la síntesis se han utilizado los siguientes reactivos y condiciones: (i) TsCl, piridina, (ii) piridina, Ac₂O. (iii) azida sódica, DMF. (iv) CH₃ONa, CH₃OH. (v) ácido oxaloacético, NaOH, H₂O. (vi) Dowex® 50 (H⁺). (viii) NH₄OH.

- 15 La cromatografía en capa fina se realizó sobre Merck 60 F₂₅₄ con detección por UV y/o carbonizando con soluciones de ácido sulfúrico o KMnO₄ o ácido fosfomolibdico. Se utilizó gel de sílice 60 de 40-63 µm para la cromatografía en columna de resolución instantánea.

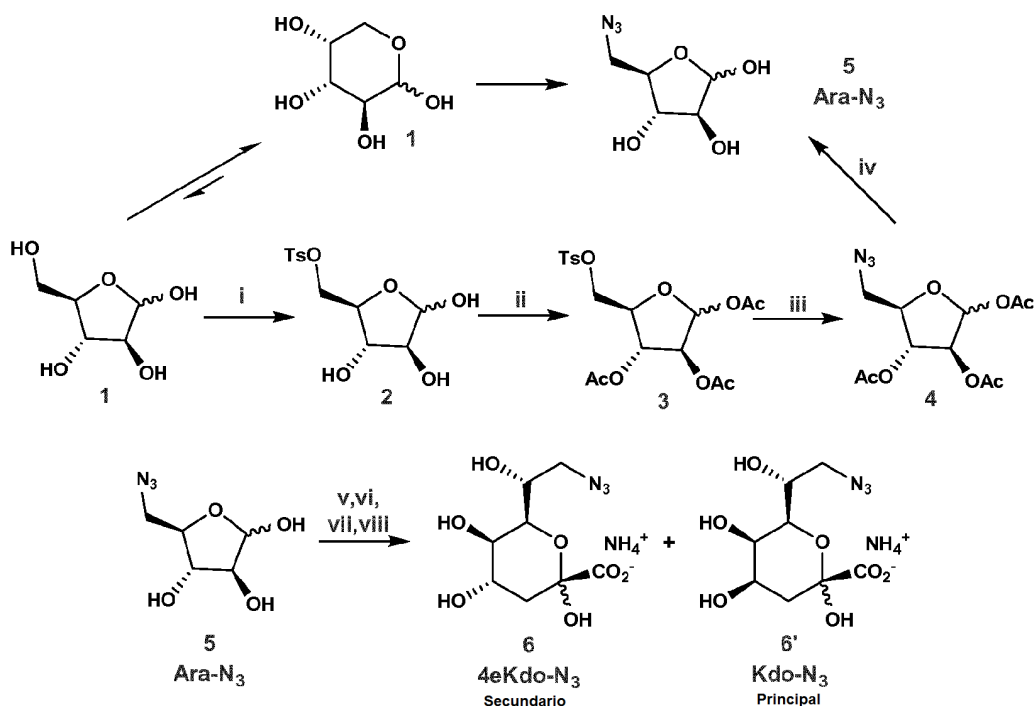
- 20 Los espectros de RMN se tomaron en espectrómetros Bruker Avance de 300 o 500 MHz, utilizando el disolvente protonado residual como patrón interno. Los desplazamientos químicos δ se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento se expresan en hercios (Hz). Los patrones de división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

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

- 25 Los espectros IR-FT se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum 100. Las absorciones características se expresan en cm⁻¹.

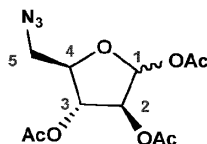
El compuesto (1a o 6) se preparó como sigue con una purificación final del epímero (1a o 6) de la mezcla (1a o 6)/(1-1 o 6').

El siguiente esquema 1 muestra los diversos compuestos implicados en las etapas de la síntesis.



Los reactivos y las condiciones en las diversas etapas son: (i) TsCl (1,1 eq.), piridina (1,0 M), 100°C -> t. r., 18 h. (ii) piridina/Ac₂O (2:1, 0,7 M), 18 h. (iii) NaN₃ (2,0 eq.), DMF (0,4 M), 80°C, 20 h, 15% a lo largo de 3 etapas, (iv) CH₃ONa (0,1 eq.), CH₃OH (0,2 M), t. r., 3 h, 99%. (v) Ácido oxaloacético (1,6 eq.), NaOH (pH 11), H₂O (0,5 M), t. r., 2 h. (vi) Dowex® 50 (H⁺). (vii) 80°C, 20 min. (viii) NH₄OH. 1% de 4eKdo-N₃ aislado en 4 etapas.

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



Se calentó D-arabinosa (1) comercial (6,00 g, 40 mmol) a 100°C durante 2 horas en piridina (40 mL). La solución se dejó enfriar, se trató adicionalmente con cloruro de tosilo (8,38 g, 44 mmol, 1,1 equiv.) y se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente ((2), no aislado). Luego se añadió anhídrido acético (20 mL). Después de la acetilación completa, determinada por TLC, los disolventes se evaporaron y las trazas residuales se co-evaporaron varias veces con tolueno ((3), no aislado). El residuo se disolvió en DMF (100 mL), se añadió azida sódica (5,20 g, 80 mmol, 2,0 eq.) y la suspensión se calentó a 80°C durante 20 horas. Después de diluir con acetato de etilo y lavar con agua, la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (éter de petróleo/acetato de etilo 7: 3). Se determinó que el primer producto eluido era la 5-azido-1,2,3-tri-O-acetil-D-arabinofuranosa (4) esperada (1,83 g, 15%, $\alpha/\beta \sim 2:1$).

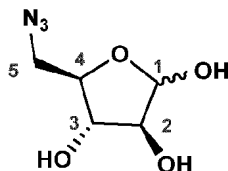
¹H-RMN (360 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6,41 (d, 0,33 H, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1 β); 6,23 (d, 0,67 H, $J_{1,2} \sim 1$ Hz, H-1 α); 5,40-5,37 (m, 1,34 H, H-2 β , H-3 β); 5,23 (d, 0,67 H, $J_{1,2} \sim 1$ Hz, H-2 α); 5,06 (d, 0,67H, $J_{3,4}$ 4,6 Hz, H-3 α); 4,30 (ddd, 0,67 H, H-4 α); 4,16-4,10 (m, 0,33 H, H-4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

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

LRMS (ESI⁺): [M + H]⁺ 324,0.

HRMS (ESI⁺): [M + H]⁺ (C₁₁H₁₅N₃NaO₇) Calc. m/z: 324,0802, encontrado: 324,0802.

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



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

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

IR (cm⁻¹): 3367, 2106, 1281, 1040.

HRMS (ESI⁺): [M + H-N₂]⁺ (C₅H₁₀NO₄) Calc. m/z: 148,0604, encontrado: 148,0610.

Anómero alfa (5a):

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

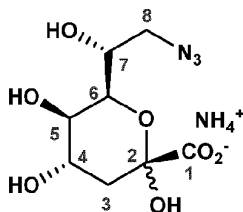
¹³C-RMN (125 MHz, D₂O) δ (ppm): 101,0 (C-1); 81,3 (C-4); 81,2 (C-2); 76,3 (C-3); 51,5 (C-5).

Anómero beta (5 β):

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

^{13}C -RMN (125 MHz, D_2O) δ (ppm): 95,2 (C-1); 79,6 (C-4); 75,8 (C-2); 74,7 (C-3); 52,6 (C-5).

3) Preparación de 8-azido-3,8-didesoxi-D-gluc-octulosonato de amonio (4eKdo- N_3) (6):



- Se añadió una solución fría (4°C) de 5-azido-5-desoxi-D-arabinofuranosa (5) (437 mg, 2,5 mmol) en agua (2,1 mL) a una solución de ácido oxaloacético (528 mg, 4,0 mmol) en agua (2,5 mL), cuyo pH se ha ajustado a ~ 11 mediante la adición de NaOH acuoso (10 M). Después de agitarse durante dos horas a temperatura ambiente, la solución se neutralizó (Dowex® 50 (H^+)), se filtró y se calentó durante 20 min a 80°C. Después de haber ajustado su pH a ~ 7 con AcOH (0,5 M), la mezcla de Kdo- N_3 /4eKdo- N_3 resultante se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico (Dowex® 1X8 (HCO_2^-)). La elución inicial con agua dio (5) sin reaccionar (150 mg, 34%). Elución adicional con un gradiente de concentración de ácido fórmico (0,5 mol.L $^{-1}$ a 2,0 mol.L $^{-1}$), liofilización, tratamiento con resina Dowex® 50 (H^+) y neutralización con amoníaco (0,2 mol.L $^{-1}$) dio, después de la concentración, una mezcla de Kdo- N_3 y 4eKdo- N_3 . Esta mezcla de (6) (Ia) y (6') (I-1) se purificó de nuevo por cromatografía de intercambio aniónico (Dowex 1X8 (HCO_2^-)) por elución con un gradiente de concentración lenta de ácido fórmico (1,5 mol.L $^{-1}$ a 2,0 mol.L $^{-1}$), liofilización, tratamiento con resina Dowex® 50 (H^+) y neutralización con amoníaco (0,2 mol.L $^{-1}$), dio, después de concentración, el amonio del epímero secundario 8-azido-3,8-dideoxi-D-gluc-octulosonato (6 o Ia), 7 mg.

Rf (acetato de etilo/etanol/agua 65:30:5): 0,22.

Rf (alcohol isopropílico/agua 9:1): 0,38.

IR (cm^{-1}): 3296, 2931, 2104 (N_3), 1612, 1384, 1283, 1072, 805.

LRMS (ESI): 262,1.

- HRMS (ESI): [$\text{M}-\text{H}$] ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_7$) Calc. m/z: 262,0681, encontrado: 262,0669.

Forma de piranosa del conformador principal (NMR 7,5):

- ^1H -RMN (600 MHz, D_2O) δ : 4,15 (dd, 1H, $J_{6,7}$ 9,1, $J_{5,6}$ 1,0 Hz, H-6); 4,10 (ddd, 1H, $J_{4,5}$ 4,1, $J_{4,3a}$ 3,7, $J_{4,3b}$ 2,6 Hz, H-4); 4,03 (ddd, 1H, $J_{6,7}$ 9,1, $J_{7,8b}$ 6,3, $J_{7,8a}$ 2,8 Hz, H-7); 3,82 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 4,1, $J_{5,6}$ 1,0 Hz, H-5); 3,63 (dd, 1H, $J_{8a, 8b}$ 13,1, $J_{7,8a}$ 2,8 Hz, H-8a); 3,47 (dd, 1H, $J_{8a, 8b}$ 13,1, $J_{7,8b}$ 6,3 Hz, H-8b); 2,23 (dd, 1H, $J_{3a, 3b}$ 15,0, $J_{4,3a}$ 3,7 Hz, H-3a); 1,84 (dd, 1H, $J_{3a, 3b}$ 15,0, $J_{4,3b}$ 2,6 Hz, H-3b).

^{13}C -RMN (150 MHz, D_2O) δ : 177,9 (C-1); 97,1 (C-2); 69,3 (C-7); 68,6 (C-6); 68,5 (C-4); 66,8 (C-5); 54,7 (C-8); 32,7 (C-3).

Forma de furanosa del conformador principal (NMR 3,0):

- ^1H -RMN (600 MHz, D_2O) δ : 4,61 (ddd, 1H, $J_{4,3b}$ 6,0, $J_{4,3}$ 5,0, $J_{4,5}$ 4,8 Hz, H-4); 4,37 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 4,8, $J_{5,6}$ 3,5 Hz, H-5); 3,91 (dd, 1H, $J_{6,7}$ 8,2, $J_{5,6}$ 3,5 Hz, H-6); 3,90 (ddd, 1H, $J_{6,7}$ 8,2, $J_{7,8b}$ 6,7, $J_{7,8a}$ 2,6 Hz, H-7); 3,59 (dd, 1H, $J_{8a, 8b}$ 13,0, $J_{7,8a}$ 2,6 Hz, H-8a); 3,51 (dd, 1H, $J_{8a, 8b}$ 13,0, $J_{7,8b}$ 6,7 Hz, H-8b); 2,40 (dd, 1H, $J_{3a, 3b}$ 13,9, $J_{4,3a}$ 5,0 Hz, H-3a); 2,37 (dd, 1H, $J_{3a, 3b}$ 13,9, $J_{4,3b}$ 6,0 Hz, H-3b).

^{13}C -RMN (150 MHz, D_2O) δ : 178,4 (C-1); 103,8 (C-2); 82,0 (C-5); 72,7 (C-4); 71,8, 71,6 (C-6, C-7); 54,1 (C-8); 45,6 (C-3).

- Forma de piranosa de conformador secundario (NMR 1,5):

^1H -RMN (600 MHz, D_2O) δ : 4,01 (ddd, 1H, $J_{4,5}$ 4,2, $J_{4,3}$ 4,0, $J_{4,3b}$ 3,1 Hz, H-4); 3,96 (ddd, 1H, $J_{6,7}$ 8,9, $J_{7,8b}$ 6,2, 2,7 Hz, H-7); 3,91 (dd, 1H, $J_{6,7}$ 8,9, $J_{5,6}$ 1,2 Hz, H-6); 3,76 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 4,2, $J_{5,6}$ 1,2 Hz, H-5); 3,62 (dd, 1H, $J_{8a, 8b}$ 13,2, $J_{7,8a}$ 2,7 Hz, H-8a); 3,45 (dd, 1H, $J_{8a, 8b}$ 13,2, $J_{7,8b}$ 6,2 Hz, H-8b); 2,16 (dd, 1H, $J_{3a, 3b}$ 15,1, $J_{4,3a}$ 4,0 Hz, H-3a); 2,12 (dd, 1H, $J_{3a, 3b}$ 15,1, $J_{4,3b}$ 3,1 Hz, H-3b).

- ^{13}C -RMN (150 MHz, D_2O) δ : 176,7 (C-1); 96,8 (C-2); 69,4 (C-7); 70,9 (C-6); 68,5 (C-4); 66,9 (C-5); 54,8 (C-8); 34,2 (C-3).

Forma de furanosa del conformador secundario (NMR 1,0):

¹H-RMN (600 MHz, D₂O) δ: 4,58 (ddd, 1H, J_{4,3} 5,6, J_{4,5} 4,1, J_{4,3b} 1,7 Hz, H-4); 4,24 (dd, 1H, J_{5,6} 4,5, J_{4,5} 4,1 Hz, H-5); 3,97 (dd, 1H, J_{6,7} 7,5, J_{5,6} 4,5 Hz, H-6); 3,91 (ddd, 1H, J_{6,7} 7,5, J_{7,8b} 6,6, J_{7,8a} 3,1 Hz, H-7); 3,60 (dd, 1H, J_{8a,8b} 13,2, J_{7,8a} 3,1 Hz, H-8a); 3,51 (dd, 1H, J_{8a,8b} 13,2, J_{7,8b} 6,6 Hz, H-8b); 2,55 (dd, 1H, J_{3a,3b} 14,3, J_{4,3a} 5,6 Hz, H-3a); 2,15 (dd, 1H, J_{3a,3b} 14,3, J_{4,3b} 1,7 Hz, H-3b).

- 5 ¹³C-RMN (150 MHz, D₂O) δ: 178,3 (C-1); 104,3 (C-2); 83,7 (C-5); 73,0 (C-4); 71,9 (C-6); 70,9 (C-7); 54,5 (C-8); 45,6 (C-3).

Ejemplo 2: Comparación del marcaje de bacterias vivas con los compuestos 4eKdo-N₃ (Ia) de la presente invención y el compuesto Kdo-N₃ (I-1).

1) Material y métodos.

- 10 1.1) Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Las 28 cepas bacterianas enumeradas en la Tabla 1 se cultivan en los medios de cultivo y las condiciones enumeradas en las Tablas 1 y 2. Todas las cepas se cultivaron en un agitador rotatorio (160 rpm) a 30 o 37°C.

Tabla 1:

microorganismos	REFERENCIAS	Condiciones de crecimiento
BACTERIAS		
<i>Bacillus cereus</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Bacillus cereus</i>	CIP 66.24T	TSB-24H-37°C
<i>Bacillus cereus paris</i>	Cepa de laboratorio (equipo HENRY/CNRS)	TSB-24H-30°C
<i>Enterococcus durans</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Escherichia coli K12</i>	MG1655	LB-24H-37°C
<i>Escherichia coli O86</i>	Cepa de laboratorio (equipo DENAMUR/INSERM)	LB-24H-37°C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CIP 101114	TSB + 5% sangre de oveja – 24H-30°C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marsella, La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Legionella pneumophila sg6</i>	LG 0846 3022 (CNRL, cepa medioambiental)	YEC + sup. Legionella 10%-24H-37°C
<i>Listeria monocytogenes 1/2</i>	CIP 82.110T	BHI-24H-37°C
<i>Listeria monocytogenes 1/2a</i>	CIP 100607	BHI-24H-37°C
<i>Micrococcus luteus</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-30°C
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CIP 79.18T	TSB+10% Sangre de Caballo-24H-

		37°C
<i>Neisseria meningitidis</i>	CIP 107858	TSB+10% Sangre de Caballo-24H-37°C
<i>Proteus mirabilis</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marsella, La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Providencia stuartii</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marsella, La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Pseudomonas fluorescens Migula</i>	ATCC 4927	TSB-24H-37°C
<i>Pseudomonas fluorescens Paris</i>	Cepa de laboratorio (equipo HENRY/CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Salmonella typhimurium 12023</i>	Cepa de laboratorio (equipo BARRAS LCB/CNRS)	LB-24H-37°C
<i>Serratia marcescens</i>	CIP 102446	TSB-24H-30°C
<i>Serratia marcescens</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marsella, La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cepa clínica (equipo DUKAN LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	CIP 53-156	TSB-24H-37°C
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Cepa de laboratorio (equipo FIEROBE LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marsella, La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Staphylococcus maltophilia</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marsella, La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cepa clínica (LASCOLA/Marsella, La Timone)	TSB-24H-37°C
<i>Vibrio cholerae</i>	CIP 104151	TSB-24H-37°C

Tabla 2:

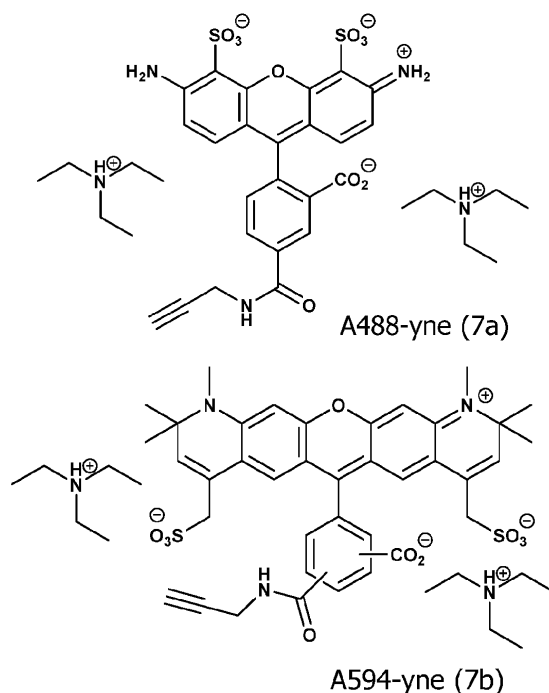
	Composición	Proveedor	Referencia
Caldo de Soja Triptico (TSB)	Caseína peptona (pancreática) 17 g/l + Peptona de soja (papaína digest.) 3 g/l + Cloruro sódico 5 g/l + Hidrógeno-fosfato disódico 2,5 g/l + Glucosa 2,5 g/l pH 7,3	Sigma Aldrich (EE.UU.)	22092
Infusión Cerebro Corazón (BHI)	sólidos de infusión del cerebro 12,5 g/l + sólidos de infusión del corazón de vacuno 5 g/l + proteosa peptona 10 g/l + glucosa 2		

	g/l + cloruro sódico 5 g/l + fosfato disódico 2,5 g/l	Oxide (Gran Bretaña)	CM1135
YEC	Extracto de levadura 10 g/l + casaminoácido	Becton Dickinson (EE.UU.)	Bacto 212720
Luria Bertani (LB)	Bactotripton 10 g/l +	Becton Dickinson (EE.UU.)	211699
	Bacto extracto de levadura 5 g/l +	Becton Dickinson (EE.UU.)	212720
	Cloruro sódico +	Sigma Aldrich (EE.UU.)	55886
	peptagar 15 g/l	Biorad (EE.UU.)	64946
	pH 7,2		

1.2) Química de clic catalizada por cobre

Los cultivos durante la noche se diluyeron 100 veces en medio de reciente aportación (volumen final 100 µl) que contenía Kdo-N₃ (I-1) o 4eKdo-N₃ (Ia) (10 mM). Las bacterias se incubaron a 30 o 37°C durante 24 horas y luego se lavaron 3 veces con tampón fosfato (0,05 M, pH 7,5) mediante centrifugación a 13.000 x g durante 2 min a temperatura ambiente.

Se utilizaron dos sondas de fluorocromo-alquino de la siguiente fórmula A488-ino (7a) y A594-ino (7b):



CuSO₄ y TGTA, a una concentración final de 2 mM y 4 mM, respectivamente, se mezclaron durante la noche en tampón fosfato (0,05 M, pH 7,5) a 37°C bajo agitación vigorosa. A continuación, se añadieron aminoguanidina, ascorbato de sodio y fluorocromo-alquino (7a) o (7b) a una concentración final de 4 mM, 5 mM y 1 mM, respectivamente a la mezcla de CuSO₄/TGTA durante la noche. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en esta solución y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. A continuación, las células se lavaron 3 veces con tampón fosfato mediante centrifugación a 13.000 x g durante 2 min a temperatura ambiente y se analizaron mediante microscopía.

1.3) Microscopía de fluorescencia.

Las bacterias se inocularon sobre cubreobjetos de vidrio y se cubrieron con una almohadilla de agar semisólida al 1% delgada (1 mm de espesor), preparada con LB diluido (1/10 en tampón fosfato (0,05 M, pH 7,5)). Las imágenes se registraron con un microscopio automático de epifluorescencia (Nikon TE2000-E-PFS, Nikon, Francia) equipado con una cámara CoolSNAP HQ 2 (Roper Scientific, Roper Scientific SARL, Francia) y un objetivo 100x/1.4 DLL. La luz de excitación se emitió mediante una luz de haluro metálico de 120 W y la señal se controló utilizando filtros apropiados. El análisis digital y el procesamiento de imágenes se llevaron a cabo mediante un script de automatización personalizado (Visual Basic) bajo Metamorph 7.5 (Molecular Devices, Molecular Devices France, Francia).

2) Resultados

21.) Se han testado 28 cepas diferentes de bacterias con ambos compuestos 4eKdo-N₃ (Ia) y Kdo-N₃ (I-1) en comparación.

Estas cepas se cultivaron primero en presencia del compuesto (Ia) o (I-1) y en una etapa posterior se controló la incorporación del informador químico azido en las bacterias, utilizando cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre en las condiciones descritas anteriormente, con sulfato de cobre, ascorbato de sodio, TGTA, un ligando de tris(triazolilo) hidrosoluble para el cobre (I) y una sonda de fluorocromo-alquino de la fórmula (7a) o (7b) anterior, durante 30 minutos como se describe arriba.

En estos experimentos, las cepas que muestran fluorescencia muy distintiva en su membrana, indicativa de una incorporación metabólica eficaz del informador químico, se han marcado con "+" en la tabla 3 que figura a continuación, la ausencia de marcaje se ha marcado con "-" en la tabla 3, y las bacterias no testadas se han marcado como "NT" en la tabla 3.

Tabla 3:

Cepa	Kdo-N ₃	4eKdo-N ₃
<i>Bacillus cereus</i>	NT	+
<i>Bacillus cereus</i>	NT	+
<i>Bacillus cereus parís</i>	NT	+
<i>Enterococcus durans</i>	NT	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+
<i>Escherichia coli K12</i>	+	+
<i>Escherichia coli O86</i>	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+
<i>Legionella pneumophila sg6</i>	+	+
<i>Listeria monocytogenes 1/2</i>	-	+
<i>Listeria monocytogenes 1/2a</i>	-	+
<i>Micrococcus luteus</i>	-	+
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	+
<i>Neisseria meningitides</i>	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+
<i>Providencia stuartii</i>	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens Migula</i>	+	+
<i>Salmonella typhimurium 12023</i>	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+

<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	-	+
<i>Staphylococcus epidermis</i>	-	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	NT	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	NT	+
<i>Vibrio cholera</i>	+	+

Estos experimentos demuestran que el compuesto (Ia) de la presente invención es asimilado por una amplia gama de bacterias y, curiosamente, el compuesto (Ia) es asimilado por las siguientes bacterias Gram-positivas que no asimilaron el compuesto (I-1): *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus aureus* y *Staphylococcus epidermis*, así como *Neisseria gonorrhoeae* Gram-negativa.

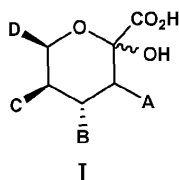
5

REIVINDICACIONES

1. Método para marcar específicamente bacterias Gram-negativas y bacterias Gram-positivas vivas en una muestra que comprende bacterias, comprendiendo el método las etapas de:

- a) incubar dichas bacterias de dicha muestra con al menos un compuesto de monosacárido modificado que comprende un primer grupo químico reactivo capaz de reaccionar químicamente con un segundo grupo reactivo, de modo que un residuo de monosacárido que porta dicho primer grupo reactivo se incorpore en la envoltura de dichas bacterias vivas, y
- b) poner en contacto dicho residuo incorporado en la envoltura de dichas bacterias vivas, con una molécula marcadora que comprende dicho segundo grupo reactivo, para generar la reacción química de dicho primer grupo reactivo de dicho residuo incorporado dentro de dichas bacterias vivas con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula marcadora, dando como resultado un enlace covalente,

caracterizado porque dicho residuo no es un residuo de ácido ulosónico endógeno de la envoltura de dichas bacterias, dicho compuesto de monosacárido modificado tiene la siguiente fórmula (I), o una sal del mismo:



en donde

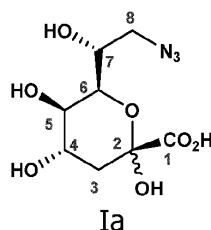
- A es H, OH, NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con dicho grupo protector seleccionado del grupo que consiste en grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, y
- B es OH, NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, y
- C es OH, NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con dicho grupo protector y
- D es un alquilo C₂ o C₄, estando cada uno de los carbonos sustituido o no con OH o NH₂, estando OH y NH₂ sustituidos o no con grupos protectores seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo e imidoilo, y
- el grupo D está sustituido con dicho primer grupo reactivo, en donde el primer grupo reactivo Ra se selecciona entre grupos que consisten en o que portan el grupo azido y grupos que consisten en o que portan el grupo alquino, siendo dicho primer grupo reactivo preferiblemente el grupo azido, y dicho segundo grupo reactivo se selecciona entre grupos que consisten en o portan, respectivamente, los grupos alquino y azido, siendo dicho segundo grupo reactivo preferiblemente el grupo alquino, la reacción de dicho grupo reactivo azido con dicho grupo reactivo alquino se lleva a cabo realizando una cicloadición de azida alquino.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho monosacárido modificado es un compuesto de fórmula (I), en donde D = -CHOH-CH₂-OH, A = H, B = OH, C = OH, estando OH de B, C y D sustituido o no con un grupo protector, que es un grupo alquilo, hidroxialquilo, acilo o formilo, y estando el grupo D sustituido con el primer grupo reactivo Ra.

3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho compuesto de monosacárido modificado es un compuesto (I) sustituido, en donde D = -CHOH-CH₂-Ra, A = H, B = OH, C = OH, estando OH de B, C y D sustituido o no con un grupo alquilo, hidroxialquilo, acilo o formilo.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que Ra es -N₃ o -C≡CH.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho compuesto de monosacárido modificado es un compuesto que tiene la siguiente fórmula de estereoisómero (Ia), o una sal del mismo, en donde:



6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichas bacterias son bacterias Gram-positivas.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para marcar bacterias seleccionadas entre las siguientes especies de bacterias: *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus paris*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas fluorescens* Migula, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus agalactiae* y *Vibrio cholerae*.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para marcar bacterias seleccionadas entre las siguientes especies de bacterias: *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus aureus* o *Staphylococcus epidermis*.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende la etapa adicional de:

- c) detectar bacterias vivas para detectar si dichas bacterias comprenden dicha molécula marcadora unida a su envoltura y/o inmovilizar dichas bacterias vivas que portan dicha molécula marcadora sobre un sustrato sólido, en donde dicha molécula marcadora es una molécula que comprende una sustancia detectable o es capaz de reaccionar o unirse a una sustancia detectable o dicha molécula marcadora es una primera molécula que porta dicho segundo grupo reactivo, siendo dicha primera molécula capaz de reaccionar o de unirse a una segunda molécula y/o a un sustrato sólido, comprendiendo preferiblemente dicha segunda molécula una sustancia detectable y/o estando dicha segunda molécula unida o siendo capaz de unirse a dicho sustrato sólido.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, para detectar específicamente bacterias vivas de dichas bacterias en una muestra que comprende bacterias, en el que dicha molécula marcadora es una molécula detectable que comprende una sustancia detectable, comprendiendo el método la etapa c) de detectar bacterias vivas para detectar si dichas bacterias comprenden dicha molécula detectable unida a los glicanos de su membrana externa.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que dicha molécula marcadora es un primer ligando o primera proteína de unión que porta dicho segundo grupo reactivo y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando o primera proteína de unión se detectan y/o inmovilizan al poner en contacto dicho primer ligando o dicha primera proteína de unión con un segundo ligando o una segunda proteína de unión que reacciona o que se une específicamente a dicho primer ligando o primera proteína de unión.

12. El método de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicha molécula marcadora es un primer ligando, preferiblemente biotina, que porta dicho segundo grupo reactivo, y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando se detectan por reacción de dichas bacterias con un anticuerpo u otra proteína específica para dicho primer ligando, portando dicho anticuerpo una sustancia detectable, preferiblemente un fluorocromo o molécula luminiscente o una enzima.

13. Un kit para llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende:

- dicho compuesto de monosacárido modificado de fórmula (I) según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 precedentes, y
- dicha molécula marcadora que comprende dicho segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con dicho primer grupo reactivo según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 precedentes, y
- si se requiere, reaccionantes para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula marcadora.

14. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende, además,

- dicha molécula detectable o dicha segunda molécula que porta una sustancia detectable que comprende un fluorocromo o molécula luminiscente o una enzima, y/o

- un sustrato sólido que porta dicha segunda molécula capaz de reaccionar o unirse específicamente con dicha molécula marcadora y
- preferiblemente, un medio de cultivo o incubación que permita el crecimiento de dichas bacterias.