

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 851 378**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2014** **PCT/EP2014/073252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015** **WO15063173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2014** **E 14790614 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020** **EP 3063288**

54 Título: **Un método para marcar específicamente las bacterias vivas que comprende el uso de compuestos de tipo monosacárido modificado**

30 Prioridad:

30.10.2013 EP 13190794

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.09.2021

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR y
UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 851 378 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 las bacterias vivas que comprende el uso de compuestos de tipo monosacárido modificado

La presente descripción se refiere a un método para marcar las bacterias vivas que comprende la marcación de polisacáridos metabólicos específicos de especie al incorporar compuestos de tipo monosacárido modificado en los polisacáridos (sobre todo LPS o CPS) de la membrana externa de las bacterias gramnegativas. La presente invención da a conocer más en concreto un método que permite marcar específicamente sobre todo *Legionella pneumophila* mediante el uso de precursores de monosacáridos endógenos, que están específicamente presentes dentro del LPS de la membrana externa de esta bacteria.

En la solicitud de patente internacional WO 2013/107759 se describe un método para marcar bacterias vivas, más en concreto, bacterias gramnegativas. El método consiste esencialmente en incorporar por asimilación en la membrana de dichas bacterias un análogo de un compuesto de tipo monosacárido del tipo del ácido ulosónico modificado de tal forma que lleva una denominada primera función química reactiva tal como un grupo azida (-N₃) o alquino (-C≡CH), lo que permite así una reacción de este primer grupo reactivo con una molécula que lleva el grupo reactivo complementario especialmente mediante una denominada reacción química de tipo clic.

Más en concreto, se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 2013/107759 que tales análogos modificados de azúcares endógenos que comprenden el resto de ácido ulosónico o ulosonato son particularmente ventajosos por que tales restos se pueden encontrar en los glucanos de la membrana bacteriana, sobre todo el LPS de todas las bacterias gramnegativas, y además se pueden asimilar directamente en la misma forma en la que se incorporarán en dichos glucanos del LPS de las bacterias gramnegativas.

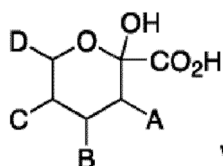
Los ácidos ulosónicos (también denominados ácidos cetoaldónicos o ácidos aldulosónicos) son monosacáridos de la familia de las cetosas, que presentan una función cetona en el C-2 y un ácido carboxílico en el C-1. El ácido octulosónico y el ácido nonulosónico se encuentran en diferentes glucanos naturales, entre ellos diferentes formas de glucanos bacterianos (sobre todo LPS, polisacárido capsular, glucoproteínas). En la ruta biosintética que conduce a la elaboración de estos glucanos suele participar el ácido ulosónico libre como intermedio, que luego se activa directamente en forma de un donante de tipo CMP-azúcar. Todos los LPS de las bacterias gramnegativas comprenden uno de dichos restos de ulosonato.

Más exactamente, el método descrito en la solicitud de patente internacional WO 2013/107759 es un método para marcar de manera específica las bacterias vivas de una determinada categoría de bacterias en una muestra que comprende bacterias, en donde el método comprende las etapas de:

a) incubar dichas bacterias de dicha muestra con al menos un análogo de un compuesto de tipo monosacárido, en donde dicho monosacárido es un resto de monosacárido endógeno de glucanos de la membrana externa de tal categoría de bacterias, en donde dicho resto de monosacárido endógeno comprende un resto de ácido ulosónico o de sal de ulosonato, en donde dicho análogo de un compuesto de tipo monosacárido es un monosacárido modificado en una determinada posición por una sustitución con un primer grupo químico reactivo capaz de reaccionar con un segundo grupo reactivo de una molécula marcadora, y

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

En concreto, en la solicitud de patente internacional WO 2013/107759, el mencionado monosacárido análogo es un ácido ulosónico sustituido que tiene una de las siguientes fórmulas (I') o una sal de ulosonato del mismo:



en donde

- A, B y C pueden ser independientemente H, OH, NH₂, en donde OH y NH₂ que están 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 por un mencionado primer grupo reactivo.

En la solicitud de patente internacional WO 2013/107759, dicho análogo de monosacárido incubado con las bacterias vivas en la etapa a) y luego incorporado en su membrana externa después de la asimilación por la bacteria puede ser idéntico al monosacárido endógeno incorporado en la cadena de glucanos de la membrana externa, salvo por estar modificado solo mediante la sustitución de dicho primer grupo reactivo.

- 5 El objetivo de la presente descripción era hallar compuestos de tipo monosacárido mejorados capaces de ser asimilados por las bacterias gramnegativas e incorporarse en el LPS de su membrana externa que presentan propiedades ventajosas como su especificidad de incorporación con respecto a la categoría de bacterias a la que incumbe y/o a su mayor capacidad para penetrar dentro de las células bacterianas y/o la mayor facilidad de síntesis química de los mismos.
- 10 De acuerdo con la presente descripción, se ha hallado que era imposible utilizar en la etapa a) un compuesto de tipo monosacárido modificado por el mencionado primer grupo reactivo, en donde dicho compuesto de tipo monosacárido es diferente al resto de monosacárido endógeno de polisacáridos de los glucanos de la membrana externa de tales bacterias, tales como el LPS o el polisacárido capsular (CPS), y que luego son, sin embargo, capaces de penetrar y de incorporarse en la membrana externa de las bacterias de tipo silvestre, es decir, de las bacterias que no son deficientes en la ruta de la biosíntesis del correspondiente monosacárido endógeno.
- 15

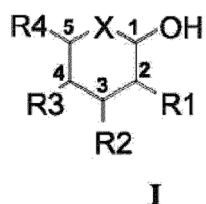
La presente invención es tal y como se define en las reivindicaciones adjuntas. El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones se da a conocer solo a modo de información.

- 20 De acuerdo con la presente descripción, dichos compuestos de tipo monosacárido que están modificados con el mencionado primer grupo reactivo comprenden precursores de monosacáridos endógenos de la ruta biosintética de los mismos. Más en concreto, la parte de la molécula del compuesto de tales precursores de la presente descripción en los cuales está sustituido el mencionado primer grupo reactivo es diferente al resto de monosacárido endógeno incorporado en la cadena de glucanos de la membrana externa, pero se metaboliza en dicho resto de monosacárido endógeno incorporado en la cadena de glucanos de la membrana externa tal y como se especifica más adelante en el presente documento, en donde dicho monosacárido endógeno está modificado por dicho primer grupo reactivo.
- 25

- Más en concreto, la presente descripción da a conocer precursores de monosacáridos endógenos modificados de la fórmula I' de más arriba descrita y reivindicada en la solicitud de patente internacional WO 2013/107759. De hecho, los precursores modificados de la presente descripción se metabolizan y se convierten durante la etapa a) de incubación en monosacáridos modificados en forma de las mismas moléculas que los restos de monosacáridos endógenos de los glucanos de la membrana externa de tales bacterias, salvo que lleva los dichos primeros grupos reactivos.
- 30

De manera más exacta, la presente descripción da a conocer un método para marcar específicamente bacterias vivas de una categoría determinada de bacterias en una muestra que comprende bacterias, en donde el método comprende las etapas de:

- 35 a) incubar dichas bacterias de dicha muestra con al menos un compuesto de tipo monosacárido modificado que comprende un primer grupo químico reactivo capaz de reaccionar químicamente con un segundo grupo reactivo, de tal forma que un resto de monosacárido que lleva dicho primer grupo reactivo se incorpora en los polisacáridos de la membrana externa de tales bacterias, en concreto en el LPS o el CPS de la membrana externa de tales bacterias, y
- 40 b) poner en contacto dicho resto de monosacárido modificado incorporado en la membrana externa de las bacterias con una molécula marcadora que comprende un mencionado segundo grupo reactivo para generar la reacción química de dicho primer grupo reactivo de dicho resto de monosacárido incorporado en dicha membrana externa de dichas bacterias vivas con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula marcadora, lo que da lugar a un enlace covalente, caracterizado por que dicho compuesto de tipo monosacárido modificado es un precursor endógeno modificado de un resto de ácido ulosónico endógeno de los dichos polisacáridos de la membrana externa de dichas bacterias, en donde
- 45 dicho compuesto de tipo monosacárido modificado tiene la siguiente fórmula (I), o una sal del mismo:



en donde

- X puede ser O, NH o S, preferiblemente O y NH, más preferiblemente O, y

- R1, R2 y R3 pueden ser independientemente H, OH, NH₂, en donde OH y NH₂ están sustituidos o no por grupos protectores de los mismos, preferiblemente sustituidos por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoílo, y

- R4 es H o una cadena de alquilo de C1 a C4, en donde cada carbono está sustituido o no por OH o NH₂ sustituido o no por grupos protectores de los mismos, preferiblemente por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoílo, y

- 5 - en donde al menos uno de los grupos X, R1, R2, R3 y R4, preferiblemente R1, R3 o R4, está sustituido por un mencionado primer grupo reactivo Ra.

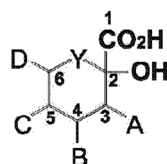
Dicha reacción química entre dichos primer y segundo grupos reactivos da lugar a un enlace covalente que en unos pocos ejemplos puede ser un enlace de coordinación covalente en un complejo metálico coordinado con ligandos.

- 10 Se debe interpretar que dicho monosacárido de dicho compuesto de tipo monosacárido modificado es un precursor endógeno (sin modificar) que tiene una fórmula como la fórmula (I), pero sin el mencionado primer grupo reactivo. Los dichos precursores endógenos modificados de la presente descripción son más fáciles de preparar químicamente que un mencionado resto de monosacárido endógeno modificado del tipo del ácido ulosónico de los dichos polisacáridos de la membrana externa de dichas bacterias mientras dichos precursores endógenos modificados se metabolizan en la célula bacteriana y dan lugar a la asimilación en la membrana externa en una forma diferente, es decir, en forma de
- 15 dicho resto de monosacárido endógeno modificado de los polisacáridos de la membrana externa de las bacterias a las que incumbe.

Otra ventaja de estos precursores de la presente descripción es que no comprenden grupos polares tal como -COOH y, por lo tanto, pueden entrar en las células bacterianas con más rapidez y/o más facilidad.

- 20 Otra ventaja de tales precursores de la presente descripción es que se pueden metabolizar en varios monosacáridos endógenos modificados diferentes presentes en los correspondientes serogrupos o subespecies diferentes de una misma especie de bacterias como se especifica adicionalmente más adelante en la presente memoria en relación con la especie *Legionella pneumophila*.

- 25 En un aspecto, se ha encontrado que dicho compuesto de la fórmula I definida más arriba se puede convertir durante el procedimiento de asimilación por las bacterias en un monosacárido endógeno modificado del tipo del ácido ulosónico de la siguiente fórmula I':



I'

en donde:

- Y es O o NH tal que R2 = YH, en donde Y es O cuando R2 es OH e Y es NH cuando R2 es NH₂;

- 30 - A puede ser independientemente H, OH, NH₂, preferiblemente H u OH, que está sustituido o no por grupos protectores de los mismos, preferiblemente sustituido por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoílo, y

- B puede ser independientemente H, OH, NH₂, preferiblemente OH o NH₂, que está sustituido o no por grupos protectores de los mismos, preferiblemente sustituido por grupos alquilo, hidroxialquilo, acil(Ac), formilo o imidoílo, y

- C es R1, y

- D es -CHR3-CXHR4.

- 35 En consecuencia, en dicho precursor modificado de fórmula I, R1, R2, R3 y R4 son de tal forma que están comprendidos en Y, C y D de dicho monosacárido endógeno modificado del tipo del ácido ulosónico de la fórmula I' como se mencionó más arriba.

- 40 Tal compuesto de fórmula (I) de la descripción puede ser asimilado por una categoría de bacterias gramnegativas e incorporarse en la membrana externa de tales bacterias en la forma de un resto de monosacárido endógeno modificado de glucanos del LPS de la membrana externa del mismo, en donde dicho resto de monosacárido endógeno comprende un resto de ácido ulosónico o de una sal de ulosonato, en donde el mencionado primer grupo reactivo está después de la incorporación de dicho compuesto de tipo monosacárido modificado dentro de dichos glucanos de la membrana externa en una posición que es un grupo libre en dicho resto de monosacárido endógeno modificado.

Se ha encontrado que los compuestos de la fórmula (I) en la presente descripción pueden entrar satisfactoriamente

en competición con el correspondiente precursor natural siempre y cuando se utilice a una concentración suficientemente alta, sobre todo a una concentración de al menos 10^{-5} M, más en concreto de 10^{-5} M a 1 M.

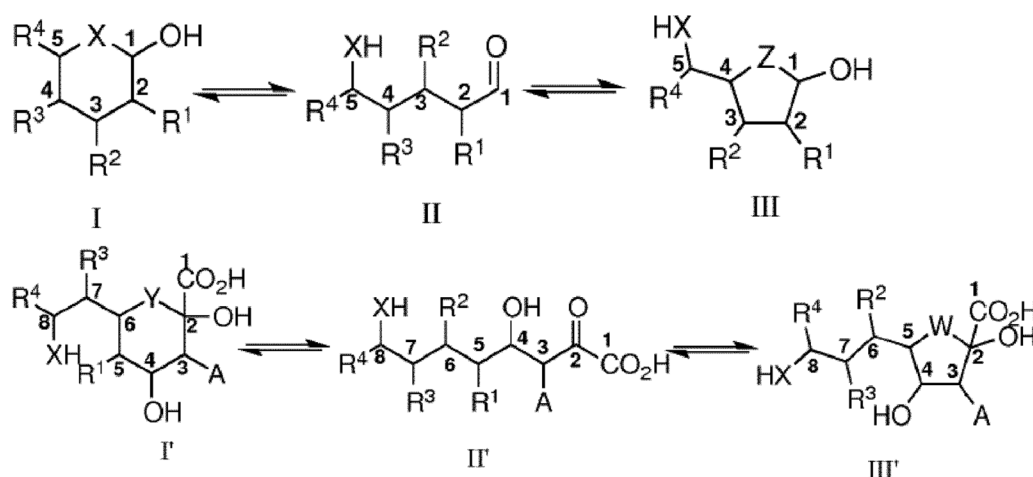
Más en concreto, el tiempo de incubación en la etapa a) es de 1 h a 24 h, preferiblemente de 2 h a 12 h, y la concentración del compuesto de tipo monosacárido modificado es de 10^{-5} M a 1 M, para detectar una concentración de bacterias preferiblemente de no más de 10^{11} células/ml, más en concreto de no más de 10^9 células/ml.

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

Más en concreto, para NH_2 , los grupos protectores se pueden seleccionar entre los grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo.

NH_2 puede estar protegido por uno o dos grupos protectores, sobre todo un grupo CH_3 y un grupo alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo. Más en concreto, en la fórmula I de más arriba, los grupos NH_2 pueden estar en forma de N-acetilo (NHAc) o pueden estar en forma de N-acetimidilo (NHAm), N-(N-metilacetimidilo), N-(N,N-dimetilacetimidilo), N-formilo (NHFo), NH-hidroxibutanoilo (NH-Hb), y pueden estar N-metilados adicionalmente o no.

De acuerdo con la presente descripción, se observa que los compuestos de la fórmula I y de la fórmula I' pueden estar en equilibrio con los compuestos de las siguientes fórmulas II y III y respectivamente II' y III' tal y como sigue:



W, Y y Z son O o NH, tal que R¹ = WH, R² = YH y R³ = ZH.

En la etapa a), dicho primer grupo reactivo está sustituido preferiblemente en una posición del mencionado compuesto de tipo monosacárido que comprende un grupo libre en el mencionado resto de monosacárido endógeno incorporado en dicho polisacárido de la membrana externa de las bacterias. Por «grupo libre» se quiere decir una posición que no está comprometida en un enlace covalente en el mencionado LPS.

El compuesto de fórmula (I) de la presente descripción se puede utilizar para marcar bacterias patógenas gramnegativas que tienen al menos una de las posiciones de un resto libre de ácido ulosónico o de ulosonato en su LPS de la membrana externa que se puede seleccionar entre estos últimos compuestos que son precursores de los monosacáridos endógenos del tipo del ácido ulosónico o sal del mismo que se pueden encontrar, entre otros, en los siguientes géneros de bacterias: *Legionella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Listeria*, *Escherichia*, *Pseudoalteromonas*, *Sinorhizobium*, *Shigella*, *Yersinia*, *Schewanella*, *Salmonella*, *Providencia*, *Proteus*, *Tenacibaculum*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Brachyspira*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Chlamydomphila*, *Coxiella*, *Francisella*, *Cardiobacterium*, *Edwardsiella*, *Ehrlichia*, *Eikenella*, *Elizabethkingia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Leptospira*, *Morganella*, *Neisseria*, *Neorickettsia*, *Pasteurella*, *Plesiomonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Providencia*, *Rickettsia*, *Streptobacillus*, *Treponema*.

En un aspecto en concreto, dichas bacterias se escogen entre *Acinetobacter baumannii*, *Bacteroides fragilis*, *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* (*Rochalimaea quintana*), *Bartonella* spp. (*Rochalimaea* spp.), *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Brachyspira* spp, *Brucella melitensis* (en sentido estricto), *Brucella melitensis* biovar Abortus (*Brucella abortus*), *Brucella melitensis* biovar Canis (*Brucella canis*), *Brucella melitensis* biovar Suis (*Brucella suis*), *Burkholderia mallei* (*Pseudomonas mallei*), *Burkholderia pseudomallei* (*Pseudomonas pseudomallei*), *Chlamydomphila psittaci* (*Chlamydia psittaci*), *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* subsp. *Tularensis* («*Francisella tularensis* subsp. *neartica*»), *Francisella tularensis* biovar *Tularensis*, *Francisella tularensis* tipo A), *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter* spp., *Cardiobacterium hominis*, *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila caviae*, *Chlamydomphila felis*, *Chlamydomphila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*), *Edwardsiella tarda*, *Ehrlichia* spp., *Eikenella corrodens*, *Elizabethkingia meningoseptica* (*Flavobacterium*

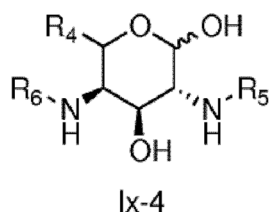
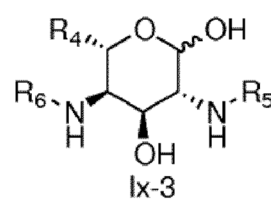
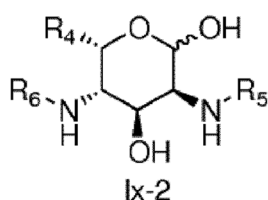
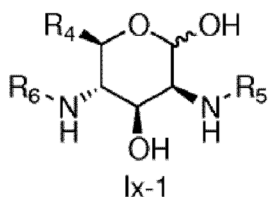
meningosepticum, *Chryseobacterium meningosepticum*), *Enterobacter aerogenes* (= *Klebsiella mobilis*), *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Francisella tularensis* subsp. *holartica* («*Francisella tularensis* var. *palaeartica*»), *Francisella tularensis* de tipo B), *Fusobacterium necrophorum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus* spp., *Helicobacter pylori*, *Campylobacter pylori*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* spp., *Legionella bozemanii* corrig. (*Fluoribacter bozemanii*), *Legionella pneumophila*, *Legionella* spp., *Leptospira interrogans*, *Leptospira interrogans* sensu lato entre ellas *Leptospira alexanderi*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira fainei*, *Leptospira inadai*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira noguchii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira weilli*, *Morganella morganii* (*Proteus morganii*), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Neorickettsia sennetsu* (*Ehrlichia sennetsu*, *Rickettsia sennetsu*), *Pasteurella multocida*, *Pasteurella* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus vulgaris*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri* (*Proteus rettgeri*), *Providencia stuartii*, *Providencia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas distincta*, *Rickettsia* spp., y se excluye *Orientia* (*Rickettsia*) *tsutsugamushi*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia canadensis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia montanensis*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia typhi*, *Salmonella enterica* subsp. *Arizonae* (*Salmonella arizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (*Salmonella enteritidis*), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi A* (*Salmonella paratyphi*), *Paratyphi B* y *Paratyphi C*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (*Salmonella typhimurium*), *Schewanella Japonica*, *Shewanella putrefaciens*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, excepto el tipo 1, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Streptobacillus moniliformis*, *Tenacibaculum maritimum*, *Treponema carateum*, *Treponema pallidum*, «*Treponema pertenue*» («*Treponema pallidum* subsp. *pertenue*»), *Treponema* spp., *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* (= *Beneckeia parahaemolytica*), *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia ruckeri*, *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis*.

Preferiblemente, dicho compuesto de tipo monosacárido modificado de la presente descripción es un compuesto que tiene la fórmula (I) o una sal de la misma, en donde:

- 25 - X es O, y
- R1 es H, OH, NH₂, en donde OH y NH₂ están sustituidos o no por dicho grupo protector, y
- R3 es NH₂ sustituido o sin sustituir por el grupo protector del mismo, preferiblemente Ac;
- R2 es OH sustituido o preferiblemente sin sustituir por un grupo protector del mismo, y
- al menos uno de R1, R3 y R4 está sustituido por dicho primer grupo reactivo Ra.
- 30 Más en concreto, R4 es -CH₃, -CH₂OH o -CH₂NH₂, en donde estos grupos están sustituidos por dicho primer grupo reactivo Ra.

Preferiblemente, dichas bacterias son bacterias gramnegativas, que comprenden un resto de monosacárido endógeno en la capa del LPS de su membrana externa y los últimos compuestos de más arriba se pueden utilizar para marcar dichas bacterias, seleccionadas preferiblemente entre las siguientes bacterias mencionadas: *Legionella pneumophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio salmonicida*, *Tenacibaculum maritimum* (antes *Flexibacter maritimus*), *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Schewanella Japonica*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia ruckeri*, *Salmonella arizonae*, *Morganella morganii*, *Shewanella putrefaciens*, *Shigella boydii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas distincta*, *Sinorhizobium fredii*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum* y *Yersinia enterocolitica*.

De acuerdo con la presente invención, dicho compuesto de tipo monosacárido modificado es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas (Ix-1) a (Ix-4) o una sal de las mismas:



en donde

- R4 es H o una cadena de alquilo de C1 a C4, en donde cada carbono está sustituido o no por OH o NH₂ sustituido o no por los grupos protectores del mismo, preferiblemente por los grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoílo, en donde R4 es preferiblemente H, CH₃, CH₂OH o CH₂NH₂ y

- R5 y R6 son independientemente grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoílo, sustituidos o no, en donde R5 y R6 son preferiblemente un acilo (Ac), y

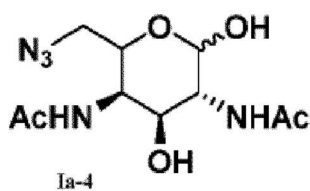
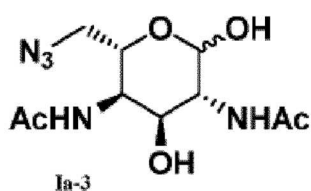
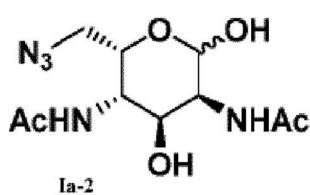
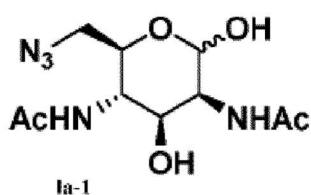
- al menos uno de los grupos R4, R5 y R6 está sustituido por dicho primer grupo reactivo.

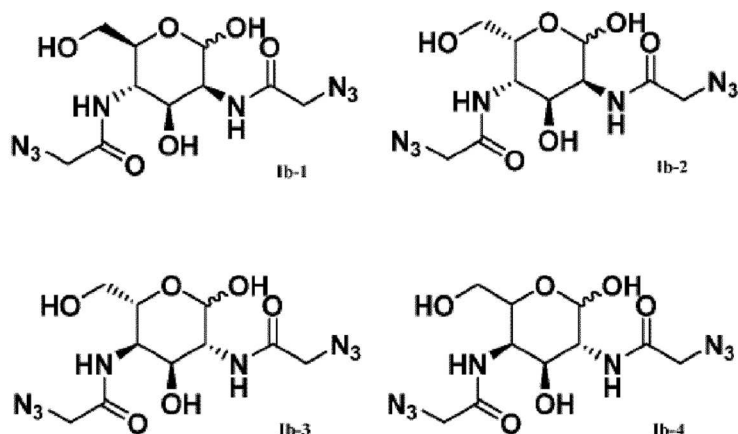
Más en concreto, dicho compuesto de tipo monosacárido modificado utilizado en la presente invención se selecciona entre los siguientes compuestos Ia e Ib:

- el compuesto Ia es un compuesto en donde R5 y R6 son -Ac y R4 es CH₂-Ra, preferiblemente -CH₂-N₃; y

- el compuesto Ib es un compuesto en donde R5 y R6 son -COCH₂Ra, preferiblemente en donde Ra es N₃ y R4 es CH₂OH.

Más en concreto, dicho compuesto de tipo monosacárido modificado de la presente invención es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas de estereoisómeros (Ia-1) a (Ia-4) e (Ib-1) a (Ib-4), o una sal de los mismos:





Las fórmulas Ia-1 e Ib-1 están incluidas en la fórmula Ix-1.

Las partes de monosacárido de los compuestos de las fórmulas (Ix-1) a (Ix-4) como están definidas más arriba y de acuerdo con la invención son precursores de los siguientes monosacáridos endógenos del tipo ácido nonulosónico de las fórmulas Ic-1 a Ic-5, respectivamente, a saber:

- (Ix-1) es un precursor de los compuestos de tipo monosacárido endógeno de las siguientes fórmulas (Ic-1) y (Ic-2);

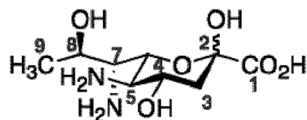
- (Ix-2) es un precursor del compuesto de tipo monosacárido endógeno de la siguiente fórmula (Ic-3);

- (Ix-3) es un precursor del compuesto de tipo monosacárido endógeno de la siguiente fórmula (Ic-4);

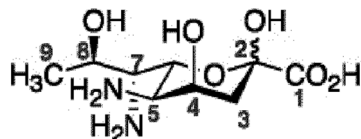
y

- (Ix-4) es un precursor del compuesto de tipo monosacárido endógeno de la siguiente fórmula (Ic-5);

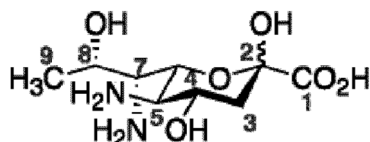
en donde



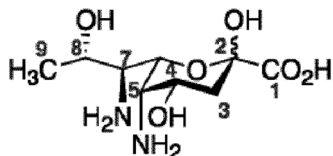
- (Ic-1) es *Leg* (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradesoxy-D-glicero-D-galactonon-2-ulosónico), (Ib-6), que se puede encontrar en *Legionella pneumophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fluorescens* y *Vibrio salmonicida*;



- (Ic-2) es *4eLeg* (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradesoxy-D-glicero-D-galactonon-2-ulosónico), (Ib-1), que se puede encontrar en el LPS de las bacterias *Legionella pneumophila* y en *Schewanella Japonica*;

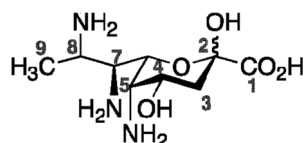


- (Ic-3) es *8eLeg* (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradesoxy-L-glicero-D-galactonon-2-ulosónico), (Ib-2), que se puede encontrar en las cepas de *E. coli*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia ruckeri*, *Salmonella arizonae*, *Morganella morganii*, *Shewanella putrefaciens*;



- (Ic-4) es *Pse* (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradesoxy-L-glicero-L-manonon-2-

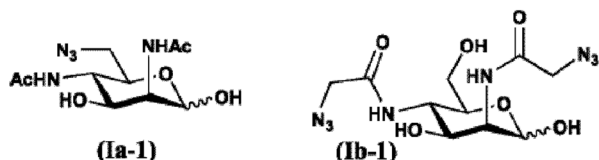
ulosónico), (Ib-5), que se puede encontrar en el O-antígeno (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella boydii*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas distincta*, *Sinorhizobium fredii* y *Vibrio cholerae*, *Pseudoalteromonas atlantica* y la pared celular de *Kribella* spp. 5 (grampositiva) y *Actinoplanes utahensis* (grampositiva) y el núcleo del LPS de *Vibrio parahaemolyticus* y en las glucoproteínas flagelares de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Helicobacter pylori* y *Clostridium butulinum*, y en el CPS de las bacterias de *Sinorhizobium*;



- (Ic-5) es , ácido 5,7,8-triamino-3,5,7,8,9-pentadesoxinon-2-ulosónico (configuración desconocida en C-8) que se puede encontrar en *Tenacibaculum maritimum* (antes *Flexibacter maritimus*).

Por consiguiente, para los compuestos de las fórmulas la-1 a la-4, dichas bacterias se seleccionan preferiblemente entre *Legionella pneumophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio salmonicida*, *Shewanella Japonica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Tenacibaculum maritimum*.

Más preferiblemente, el mencionado compuesto de tipo monosacárido modificado de la presente invención es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas (Ia-1), (Ib-1) o una sal de las mismas:



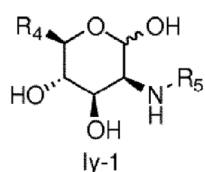
En una realización preferida, el método permite marcar las bacterias vivas de *Legionella pneumophila* con dicho compuesto de fórmula Ia-1.

En la práctica, las muestras tomadas de medio ambiental que contiene agua en donde se puede encontrar *Legionella pneumophila*, tal como agua de una instalación o dispositivo de aire acondicionado, sobre todo torres de refrigeración, u otra instalación que contiene agua, tales como piscinas, no comprenden otras bacterias que comprenden dicho resto endógeno de fórmula (Ic-1) o (Ic-2) de tal forma que si se detecta una marcación, el método se puede considerar que marca específicamente *Legionella pneumophila*.

Legionella pneumophila es una bacteria patógena implicada en brotes periódicos que se caracterizan por una tasa de mortalidad relativamente alta y un impacto importante en la sociedad. Se necesita el seguimiento con regularidad de la presencia de esta bacteria en las muestras ambientales de agua para impedir estos acontecimientos epidémicos, pero la detección basada en el cultivo tradicional y el método de identificación llega a tardar 10 días. La presente invención da a conocer un método que permite una identificación específica más rápida de *Legionella pneumophila* mientras que otras especies de *Legionella* y otros géneros no quedan marcados.

Este compuesto Ia-1 (6-azido-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-manopiranoside) puede penetrar en la mayoría de los serogrupos de *Legionella pneumophila* y puede metabolizarse en Leg-N₃ y/o bien en 4eLeg-N₃ e incorporarse en la membrana externa en un mencionado resto de monosacárido endógeno de dicha capa de LPS de la membrana externa de las bacterias que puede ser un 4eLeg (ácido 4-epilegionamínico o ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradexoxi-D-glicero-D-talonon-2-ulosónico) o resto de 4-epilegionamínato, o un leg (ácido legionamínico = (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradexoxi-D-glicerol-D-galactonon-2-ulosónico) o resto de legionamínato, en donde estos dos monosacáridos endógenos 4eLeg y Leg están presentes en la mayoría de los numerosos serogrupos diferentes de la especie *Legionella pneumophila* entre otros, tal y como se ha mostrado con los numerosos serogrupos diferentes de *Legionella pneumophila* que se han analizado.

Como alternativa, el compuesto de tipo monosacárido modificado que se utiliza en la presente invención es un compuesto que tiene la siguiente fórmula (Iy-1), o una sal del mismo, en donde:

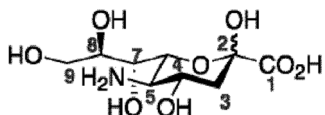


en donde

- R4 es H o una cadena de alquilo de C1 a C4, en donde cada carbono está sustituido o no por OH o NH₂ sustituido o no por los grupos protectores de los mismos, preferiblemente por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoílo, en donde preferiblemente R4 es CH₂OH, y

5 -R5 puede ser grupo alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoílo, sustituido o no, en donde preferiblemente R5 es COCH₃, y

- en donde al menos uno de los grupos R4 y R5 está sustituido por dicho primer grupo reactivo; y en donde la parte del monosacárido de los compuestos de fórmula (Iy-1) es precursor del siguiente monosacárido endógeno del tipo del ácido nonulosónico de fórmula Ic-6, a saber:



10 - (Ic-6) es Neu (ácido S-amino-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactonon-2-ulosónico), (Ic-6) que se puede encontrar en el CPS de *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella nonliquefaciens* y *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Streptococcus agalactiae* (grampositivo), *Streptococcus suis* (grampositivo) y en el O-antígeno del LPS de bacterias que incluyen *Hafnia alvei*, *Escherichia albertii*, *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Vibrio cholerae*, *Shewanella algae*, y en el núcleo del LPS de varios patógenos, entre ellos *N. meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Histophilus somni*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*.

15 En otra realización en concreto, el método de la presente invención permite marcar de manera específica las bacterias vivas de *Pseudomonas aeruginosa* y dicho resto de monosacárido endógeno de dicha capa de LPS de la membrana externa de las bacterias son:

20 - tanto un ácido 8-epilegionamínico (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradexoxi-L-glicero-D-galactonon-2-ulosónico) como un resto de 8-epilegionaminato, en donde el mencionado compuesto de tipo monosacárido modificado es un compuesto de fórmula (Ia-2)

- o un ácido pseudamínico (ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradexoxi-L-glicero-L-manonon-2-ulosónico) o resto de pseudaminato, y en donde dicho compuesto de tipo monosacárido modificado es un compuesto de fórmula (Ia-3).

25 Las bacterias vivas comprenden bacterias capaces de multiplicarse, así como bacterias viables que no son capaces de multiplicarse. Como la mayoría de las normas sanitarias se refieren al número de bacterias capaces de multiplicarse, sobre todo las capaces de multiplicarse en un medio de crecimiento sólido, ventajosamente, la presente invención da a conocer más en concreto un método para marcar específicamente las bacterias que son capaces de multiplicarse, en donde dichas bacterias se incuban en un medio de cultivo en el (medio líquido) o en el (medio sólido) en el que dichas bacterias son capaces de multiplicarse.

30 Los patógenos graves están ocultos entre las bacterias gramnegativas y la rápida identificación de las células viables representa un reto sanitario importante. Las bacterias asimilan con rapidez los monosacáridos modificados de la presente invención, lo que permite la marcación y detección rápida de los mismos: el procedimiento total tarda menos de un día, de las bacterias gramnegativas de tipo silvestre metabólicamente activas/viables. Este método es muy rápido en comparación con la detección habitual de bacterias viables que suele necesitar entre 2 días y más de un mes en función de la cepa bacteriana.

35 De forma ventajosa, la presente invención comprende además la etapa (c) de detectar bacterias vivas al detectar si dichas bacterias comprenden dicha molécula marcadora fijada a los glucanos de su membrana externa y/o de inmovilizar dichas bacterias vivas que llevan dicha molécula marcadora sobre un sustrato sólido, en donde dicha molécula marcadora es una molécula que comprende una sustancia detectable o capaz de reaccionar o de fijarse a una sustancia detectable, o dicha molécula marcadora es una primera molécula que lleva un mencionado segundo grupo reactivo, en donde dicha primera molécula es capaz de reaccionar o de fijarse a una segunda molécula y/o a un sustrato sólido, preferiblemente en donde dicha segunda molécula comprende una sustancia detectable y/o en donde dicha segunda molécula se fija o es capaz de fijarse a dicho sustrato sólido.

45 En consecuencia, la presente invención permite (a) contar o identificar las bacterias vivas detectadas, así como (b) concentrar y/o aislar las bacterias vivas inmovilizadas en un soporte sólido; sobre todo con un soporte sólido constituido por perlas magnéticas que llevan dicho segundo grupo reactivo.

Más en concreto, el método permite específicamente detectar bacterias vivas de una determinada categoría de bacterias en una muestra que comprende bacterias, en donde dicha molécula marcadora es una molécula detectable que comprende una sustancia detectable, en donde el método comprende la etapa c) de detectar las bacterias vivas al detectar si dichas bacterias comprenden dicha molécula detectable fijada a los glucanos de su membrana externa.

50 Dicha etapa c) de detección se puede llevar a cabo en un medio líquido o en un sustrato sólido.

Más en concreto, la detección se puede producir con una sustancia detectable detectada por fluorescencia.

Más en concreto, dicha molécula marcadora es un primer ligando o una primera proteína de fijación que lleva dicho segundo grupo reactivo, y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando o a la primera proteína de fijación se detecta y/o se inmoviliza al poner en contacto dicho primer ligando o dicha primera proteína de fijación con un segundo ligando o una segunda proteína de fijación, que reacciona o que se fija específicamente a dicho primer ligando o primera proteína de fijación.

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

Más en concreto, dicho primer grupo reactivo se selecciona entre los grupos que consisten en o que llevan el grupo azido y grupos que consisten en o llevan el grupo alquino, en donde el mencionado primer grupo reactivo es preferiblemente el grupo azido, y el mencionado segundo grupo reactivo se selecciona entre grupos que consisten en o que llevan, respectivamente, los grupos alquino y azido, en donde el mencionado segundo grupo reactivo es preferiblemente el grupo alquino, y la reacción de dicho grupo reactivo de azido con el mencionado grupo reactivo de alquino se lleva a cabo al realizar una cicloadición de azida-alquino.

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

- un mencionado análogo de un compuesto de tipo monosacárido de las fórmulas (Ix-1) a (Ix-4) o (Iy-1) sustituido por un mencionado primer grupo reactivo, en donde dicho compuesto de fórmula I es un precursor modificado capaz de convertirse en un resto de ácido ulosónico endógeno modificado que se incorpora en un polisacárido de la membrana externa de una bacteria, sobre todo en el LPS o el CPS de la membrana externa de tales bacterias, y

- en donde dicha molécula marcadora comprende un mencionado segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con dicho primer grupo reactivo, y

- optativamente, los reactantes para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo de dicho resto análogo incorporado dentro de dichos polisacáridos de la membrana externa de dichas bacterias con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula marcadora, y

- preferiblemente, un cultivo o medio de incubación que permite el crecimiento de una mencionada categoría dada de bacterias, preferiblemente específico para el crecimiento de dicha categoría dada de bacterias.

Preferiblemente, el mencionado primer grupo reactivo Ra se selecciona entre los grupos que consisten en o que llevan el grupo azido ($-N_3$) y grupos que consisten en o que llevan el grupo alquino ($-C\equiv C-$), y el mencionado segundo grupo reactivo Rb se selecciona entre los grupos que consisten en o que llevan, respectivamente, los grupos alquino ($-C\equiv C-$) y azido ($-N_3$), y la reacción del mencionado grupo reactivo de tipo azido con un mencionado grupo alquino ($-C\equiv C$) se lleva a cabo al realizar una cicloadición de azida-alquino.

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

Más en concreto, 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 lleva un grupo alquino terminal con un catalizador de tal forma que realiza una cicloadición de azida-alquino de dicho fluorocromo y dicho compuesto análogo de fórmula (I).

Otros ligandos adecuados que se utilizan con frecuencia son: tris(3-hidroxipropiltriázolilmetil)amina (THPTA), ácido 2-(4-((bis((1-*tert*-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 (53).

Como alternativa, se puede llevar a cabo una cicloadición de azida-alquino en ausencia de cobre, si se utiliza un alquino tensionado, tal como el azadibenzociclooctino (ADIBO, DIBAC o DBCO) o el tetrametildibenzociclooctino (TMDIBO).

Otros alquinos tensionados adecuados que se utilizan con frecuencia para la reacción sin cobre incluyen: ciclooctino (OCT), ciclooctino sin arilo (ALO), monofluorociclooctino (MOFO), difluorociclooctino (DIFO), dibenzociclooctino (DIBO), dimetoxiazaciclooctino (DIMAC), biarilazaciclooctinona (BARAC), biciclononino (BCN), tetrametiltepinio (TMTI, TMTH), difluorobenzociclooctino (DIFBO), oxadibenzociclooctino (ODIBO), carboximetilmonobenzociclooctino (COMBO) o benzociclononina.

Se pueden usar otros grupos reactivos y otras reacciones, tales como: ligación de Staudinger (primer grupo reactivo = azida y un segundo grupo reactivo = fosfina), química clic sin cobre (primer grupo reactivo = azida y un segundo grupo reactivo = alquino tensionado (alquino intracíclico)), condensación de carbonilo (primer grupo reactivo = aldehído o cetona y un segundo grupo reactivo = hidrazida u oxiamina), química clic de tiol-eno (primer grupo reactivo = tiol y segundo grupo reactivo = alqueno), química clic de óxido de nitrilo-eno (primer grupo reactivo = óxido de nitrilo o aldehído, oxima, o cloruro de hidroximoilo o clororoxima y segundo grupo reactivo = alqueno o alquino), química clic de nitriloimina-eno (primer grupo reactivo = nitriloimina o aldehído, hidrazona, o cloruro de hidrazonoilo o clorohidrazona y segundo grupo reactivo = alqueno o alquino), ligación de Diels-Alder de demanda de electrones inversa (primer grupo reactivo = alqueno y segundo grupo reactivo = tetrazina), química clic de inonitrilo-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 de His (primer grupo reactivo = oligohistidina y segundo grupo reactivo = complejo de níquel o ligando de níquel).

En la lista mencionada más arriba de grupos implicados en las reacciones, se pueden permutar el primer grupo reactivo y el segundo grupo reactivo. Todas las reacciones químicas mencionadas más arriba dan lugar a un enlace covalente.

Se puede obtener otra especificidad de detección más alta al incubar la muestra de bacterias con dos de los mencionados compuestos análogos de monosacárido diferentes y dos moléculas detectables diferentes.

En otra realización en concreto del método de la presente invención, la mencionada incubación de la etapa a) y la reacción de la etapa b) se llevan a cabo sobre un filtro de tipo membrana, de tal forma que las bacterias cultivadas que emanan de la misma bacteria original que se ha multiplicado se agrupan juntas y se pueden visualizar con un microscopio, y la mencionada molécula detectable se puede detectar mediante la visualización con un microscopio como el mencionado. Gracias a esto, se puede cuantificar el número de bacterias cultivables.

Esta realización permite filtrar la muestra analizada en dicho filtro de tipo membrana, tal como una membrana de poliéster, antes de la asimilación de dicho monosacárido modificado para evitar la sobreestimación de las bacterias viables debido al posible crecimiento durante el periodo de asimilación. De hecho, cuando las células fijadas en la superficie de tal membrana comienzan a crecer, permanecen juntas y forman una microcolonia que puede detectarse con facilidad que proceden de la misma célula suelta. Por lo tanto, esto permite cuantificarlas mediante el recuento de las bacterias cultivables.

La presente invención también da a conocer un uso de un kit para llevar a cabo el método de la invención que además comprende un cultivo o medio de incubación que permite el crecimiento de dicha categoría dada de bacterias, preferiblemente específico para el crecimiento de dicha categoría dada de bacterias.

Preferiblemente, dicho cultivo o medio de incubación comprende además agentes que potencian y/o aceleran la velocidad de crecimiento y/o la capacidad para formar colonias que tiene dicha categoría dada de bacterias. Más en concreto, el medio de incubación comprende al menos un antioxidante, tal como piruvato o catalasa.

Para marcar específicamente las bacterias gramnegativas, puede ser más ventajoso utilizar un medio de cultivo específico para las bacterias gramnegativas en las etapas a) y b), con lo que no se permite el cultivo de bacterias grampositivas.

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

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

- un sustrato sólido que lleva una mencionada segunda molécula capaz de reaccionar o de fijarse, de manera específica, a dicha molécula marcadora.

Más en concreto, en una realización, el kit de la presente invención comprende adicionalmente:

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

- un medio sólido que permite visualizar las bacterias después de incubarlas con el mencionado análogo de un compuesto de tipo monosacárido, dichos reactantes y dicha molécula detectable.

Más en concreto de nuevo, el kit comprende:

- un mencionado compuesto de tipo monosacárido modificado sustituido por un mencionado primer grupo reactivo que comprende un grupo azido o alquino, y

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

- posiblemente, dichos reactantes comprenden un catalizador de cobre y un ligando de trisiazolilo.

En una primera realización en concreto, dicha molécula marcadora puede ser una molécula detectable, a saber, una molécula que consiste en o que lleva una sustancia detectable, a saber, una sustancia capaz de ser detectada, tal como un fluorocromo o una sustancia luminiscente o una enzima, tal como la peroxidasa, en donde dicha enzima se detecta más en concreto después de la reacción con un correactante.

En otra realización determinada, es útil para aislar y/o concentrar las bacterias vivas que dicha molécula marcadora se pueda fijar a un sustrato sólido cuando se lleva a cabo en la etapa b).

En otra realización determinada, dicha molécula marcadora es una molécula que es un primer ligando o una primera proteína de fijación que lleva un mencionado segundo grupo reactivo y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando o primera proteína de fijación se detecta y/o inmoviliza al poner en contacto dicho primer ligando o primera proteína de fijación con una segunda molécula que es un segundo ligando o una segunda proteína de fijación que reacciona o que se fija específicamente a dicho primer ligando o primera proteína de fijación.

A continuación, ventajosamente, dicho primer o segundo ligando o proteína de fijación puede reaccionar o fijarse a una tercera proteína de fijación que lleva una mencionada sustancia detectable, tal como un fluorocromo o una sustancia luminiscente o una enzima, tal como la peroxidasa, en donde dicha tercera proteína de fijación se fija específicamente a dicho primer y/o segundo ligando o proteína de fijación. La detección de dicha sustancia detectable mediante un mencionado segundo ligando o segunda proteína de fijación o tercera proteína de fijación permite amplificar la señal de la mencionada sustancia detectable.

Más en concreto, el primer ligando o la primera proteína de fijación puede ser:

- biotina, en donde dicha segunda proteína de fijación es entonces avidina o estreptavidina y dicha tercera proteína de fijación es un anticuerpo generado contra la biotina, o

- avidina o estreptavidina, en donde dicha segunda proteína de fijación a ligando es entonces biotina y dicha tercera proteína de fijación es un anticuerpo generado contra la avidina o la estreptavidina, o

- un primer anticuerpo, en donde dicha segunda proteína de fijación es entonces un segundo anticuerpo específico contra dicho primer anticuerpo y dicha tercera proteína de fijación es un tercer anticuerpo específico contra dicho primer anticuerpo.

Más en concreto, dicha molécula marcadora es un primer ligando, preferiblemente biotina, que lleva un mencionado segundo grupo reactivo, y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando se detectan mediante la reacción de dichas bacterias con un anticuerpo específico contra dicho primer ligando, en donde dicho anticuerpo lleva una sustancia detectable, preferiblemente un fluorocromo o una molécula luminiscente o una enzima.

Más en concreto de nuevo, dicha molécula marcadora es un primer ligando, preferiblemente biotina, que lleva un mencionado segundo grupo reactivo, y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicha primera proteína de fijación se inmovilizan al hacer reaccionar dicho primer ligando con un sustrato sólido, preferiblemente perlas magnéticas, acoplado a una mencionada segunda proteína de fijación, preferiblemente avidina o estreptavidina, antes de detectar dichas bacterias vivas mediante la amplificación enzimática del ADN bacteriano o mediante la reacción de dichas bacterias con una tercera proteína de fijación que reacciona o se fija específicamente a dicho primer ligando o segunda proteína de fijación, en donde dicha tercera proteína de fijación lleva una sustancia detectable, preferiblemente un fluorocromo o una molécula luminiscente o una enzima, en donde dicha tercera proteína de fijación es preferiblemente un anticuerpo específico contra dicho primer ligando o la primera proteína de fijación.

Tal realización en donde 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, que incluye la amplificación enzimática del ADN, tal como la PCR, sobre todo la PCR en tiempo real, o un método que implica una reacción inmunitaria con un anticuerpo marcado, tal como un ensayo de tipo ELISA.

Otras características y ventajas de la presente invención serán más evidentes a la luz de la descripción detallada que viene a continuación y los ejemplos de realizaciones ilustrativas y no limitantes que hacen referencia a las figuras que vienen a continuación, en donde:

- en la figura 1 se representa la ruta de Leg (compuesto Ib-1) en *L. pneumophila*;

- en la figura 2 se representan las reacciones sucesivas de la síntesis de los compuestos Ia-1 y Ia-1' (solo para referencia);

- en las figuras 3 a 7 se representa la detección del compuesto Ia-1 o Ia-1' incorporado metabólicamente (solo para referencia) por las diferentes cepas de bacterias, tal y como se muestra mediante la reacción de tipo clic catalizada con CuI con la biotina-alquino 5, y la posterior visualización con el uso de un anticuerpo antibiotina de tipo IgG conjugado a Alexa Fluor 488. Las imágenes de contraste de fases y de fluorescencia en presencia de Ia-1 o Ia-1' (solo

para referencia) (panel derecho) o en ausencia de la-1 o la-1' (solo para referencia) (panel izquierdo), barra de escala =1 μm ;

- en la figura 3 se presentan fotografías de la detección del compuesto la-1 incorporado metabólicamente por diferentes cepas del serogrupo 1 de *L. pneumophila*;

5 - en la figura 4 se presentan fotografías de la detección del compuesto la-1 incorporado metabólicamente por diferentes cepas de *L. pneumophila* que pertenecen a otros serogrupos que no son el serogrupo 1;

- en la figura 5 se presentan fotografías de la detección del compuesto la-1 incorporado metabólicamente por *E. coli* y *P. aeruginosa* (el compuesto la-1 no se incorpora en *E. coli* ni en *P. aeruginosa*);

10 - en la figura 6 se presentan fotografías de la detección del compuesto la-1 incorporado metabólicamente por diferentes cepas de *Legionella* (el compuesto la-1 no se incorpora en las *Legionella* que no pertenecen a la especie *L. pneumophila*), y

- en la figura 7 se presentan fotografías de la detección de: detección del compuesto la-1' incorporado metabólicamente (solo para referencia, la-1' = la-1 en donde OH es AcO en la posición R3). El compuesto la-1' no se incorpora en *L. pneumophila* en estas condiciones.

15 El O-antígeno del serogrupo 1 de *L. pneumophila*, que es prevalente entre los casos infectados, se ha demostrado [1] que está compuesto de una repetición homopolisacáridica con enlaces α -(2 $\rightarrow$ 4) del ácido 5-N-acetimidóil-7-N-acetil-legionamínico (Leg5Am7Ac), con 8-O-acetilación en el subgrupo Pontiac [2]. La biosíntesis de Leg (figura 1) comienza con la UDP-N,N'-diacetilbacilosamina (A), que se transforma en la 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-manopiranososa (la) mediante la acción dual de una 2-epimerasa hidrolizante (B). En la siguiente etapa, el precursor libre la se transforma directamente en lb-I = ácido N,N'-diacetil-legionamínico (Leg5Ac7Ac) lb-1 a través de la acción de una aldolasa (C), en presencia de fosfoenolpiruvato (PEP) [3]. Este acontecimiento controla la estereoquímica del nuevo centro estereogénico generado en C-4. A continuación, el ácido legionamínico se activa en forma de un donante de monofosfato de citidina (CMP)-Leg5Ac7Ac. Se cree que se producen más transformaciones en una etapa posterior.

25 Para actuar selectivamente sobre la ruta del Leg para la marcación metabólica de glucanos, se ha llevado a cabo la síntesis de la-1, un derivado de azido de la, a saber, 6-azido-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-O-manopiranososa (la-1), así como su derivado monoacetilado menos polar (la-1'), que podría entrar con mayor facilidad en la célula humana a través del transporte pasivo, o en las amebas o en muestras biológicas que comprenden células eucariotas, tales como muestras de humano, y que se transforma adicionalmente en la-1 por la acción de esterasas inespecíficas intracelulares. Se ha desarrollado una estrategia sintética que comienza con la O-galactosa y se han aislado y analizado los productos finales por su capacidad para marcar específicamente el LPS de las *L. pneumophila* vivas del serogrupo 1.

35 Se sintetizaron los compuestos la-1 e la-1' (figura 2) mediante un método inspirado en la estrategia descrita por Tsvetkov et al. [7] para la síntesis de 1. El compuesto deseado, la 6-azido-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-O-manosa la-1, se preparó en 11 etapas a partir del pentaacetato de β -D-galactosa comercial con un rendimiento global del 17 %, mientras que la 3-O-acetil-6-azido-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-manosa la-1' se obtuvo a partir del mismo material de partida en 12 etapas con un rendimiento global del 15 %.

40 En la síntesis de la figura 2, se han utilizado los siguientes reactantes y condiciones: (i) *para*-metoxifenol, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 ; (ii) CH_3ONa , CH_3OH ; (iii) difenilborinato de 2-aminoetilo, DIPEA, cloruro de benzoílo, CH_3CN ; (iv) Tf_2O , piridina, CH_2Cl_2 ; (v) Bu_4NN_3 , tolueno; (vi) $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, H_2 , CH_3OH , (vii) Ac_2O , CH_3OH ; (viii) cloruro de tosilo, piridina; (ix) cloruro de mesilo, piridina; (x) NaN_3 , DMF; (xi) CAN, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (3:1); (xii) Ac_2O , piridina, CH_2Cl_2 .

45 La glucosilación del pentaacetato de β -D-galactosa con el *p*-metoxifenol en presencia de eterato de trifluoruro de boro dio 6 con un buen rendimiento del 83 % [4]. La desacetilación de Zemplén con el uso de metóxido de sodio [5] seguida de la benzoilación selectiva mediante el método desarrollado por Taylor, en presencia del difenilborinato de 2-aminoetilo como catalizador condujo a 7 (rendimiento del 70 % durante 2 etapas) [6]. La conversión de 7 en el derivado de tipo bis-triflato y su posterior reacción con azida de tetrabutilamonio en tolueno dio lugar al compuesto 8 de tipo bis-azido (89 % en 2 etapas), [7] cuya configuración manna se confirmó por RMN ^1H ($J_{1,2} = 1,2 \text{ Hz}$; $J_{2,3} = 3,6 \text{ Hz}$; $h_{4,4} = 10,0 \text{ Hz}$; $J_{4,3} = 10,2 \text{ Hz}$). A la desbenzoilación convencional de 8 con el uso del metóxido de sodio y la reducción de los grupos azido con dihidrógeno en presencia de $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ le siguió la N-acetilación para dar 9 con un rendimiento alto (82 % en 3 etapas) [7]. El derivado de tipo azido 11 se obtuvo en 2 etapas mediante la tosilación o mesilación selectiva en la piridina, seguida de la sustitución nucleófila con el uso de azida de sodio en dimetilformamida [8].

55 En esta estrategia, la mesilación seguida de la sustitución dio un mejor resultado (50 %) que la ruta de tosilación (32 %). Se obtuvo el producto final la-1 con un buen rendimiento (82 %) a partir de 11 mediante la desprotección de la posición anomérica con el uso de nitrato de amonio y cerio en una mezcla de acetonitrilo/agua [9]. Como alternativa, se preparó el producto la-1' en 2 etapas a partir de 11 con un rendimiento respetable del 71 %, mediante la acetilación seguida de la desprotección de la posición anomérica con el uso de las mismas condiciones de antes [9].

Ejemplos

Ejemplo 1: síntesis de los compuestos Ia-1, Ia-1' (solo para referencia) y Ib-1.

1) Materiales para la síntesis

Se realizó una cromatografía en capa fina sobre Merck 60 F254 con detección por UV y/o carbonización con soluciones de ácido sulfúrico o KMnO_4 o ácido fosfomolibdico. Se utilizó gel de sílice 60, 40-63 μm , para la cromatografía en columna ultrarrápida.

Los espectros de RMN se tomaron en espectrómetros Avance 300 o 500 MHz de Bruker, con el uso del solvente protonado residual como estándar interno. Los desplazamientos químicos se dan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento se describen en hercios (Hz). Los patrones de separación se designan como singulete (s), doblete (d), triplete (t), doblete de dobletes (dd), doblete de doblete de dobletes (ddd). Los patrones de separación que no se pudieron interpretar ni visualizar con facilidad se designan como multiplete (m).

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

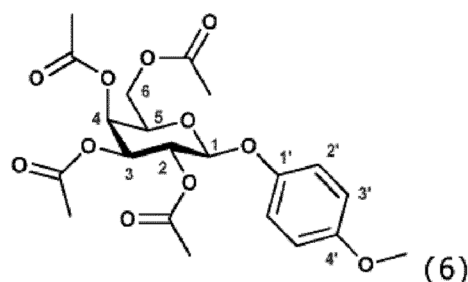
Los espectros de IR-FT se registraron en un espectrómetro Spectrum 100 de Perkin Elmer. Cada absorción característica se describe en cm^{-1} .

Cada rotación óptica específica se midió a 20 °C con un polarímetro MCP 300 de Anton Paar en una celda de 10 cm a 20 °C y 589 nm.

Cada punto de fusión se midió con un instrumento B-540 para punto de fusión de Büchi.

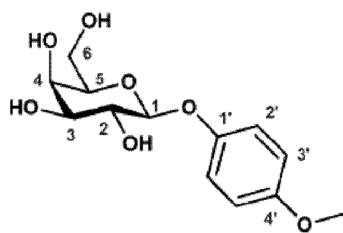
2) Método para la síntesis de los compuestos Ia-1 e Ia-1'.

2.1) Preparación del 4-metoxifenil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-galactopiranosido (6) (primera etapa de la figura 2) de la siguiente fórmula:



A una solución de pentaacetato de β -D-galactosa 5 (25,00 g, 64,0 mmol) y p-metoxifenol (9,54 g, 76,9 mmol) en CH_2Cl_2 (500 ml) se le añadió $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (9,73 ml, 76,9 mmol) a 0 °C. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente, se agitó durante 15 h y a continuación se paró con HCl (1 mol l^{-1} , 250 ml). La capa orgánica se lavó con NaHCO_3 acuoso saturado (2 $\times$ 250 ml) y salmuera (150 ml), luego se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento pálido. El residuo se retrocristalizó a partir de CH_3OH para dar el compuesto 6 (24,1 g, 83 %) como cristales blancos.

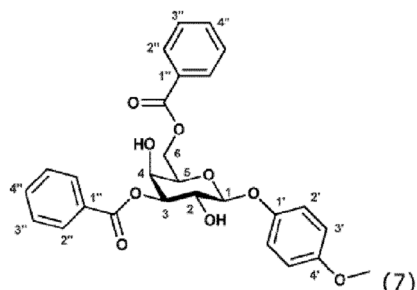
2.2) Preparación del 4-metoxifenil- β -D-galactopiranosido (6') de la siguiente fórmula:



Una solución recién preparada de metóxido de sodio (0,2 mol l^{-1} , 4,4 15 ml) se añadió a una solución agitada del compuesto 6 (4,0 g, 8,80 mmol) en CH_3OH (44 ml). La mezcla se agitó durante 40 min a temperatura ambiente y a continuación se le añadió la resina Amberlite IRN-77 (forma H^+) para neutralizar la solución. La filtración y la evaporación del solvente desde el filtrado proporcionó un sólido amorfo blanco (6', 2,52 g) que no se purificó más. Se retrocristalizó una pequeña porción desde etanol para obtener agujas blanquecinas que se utilizaron para la

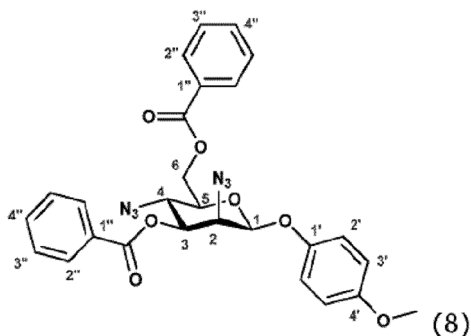
caracterización del compuesto.

2.3) Preparación del 4-metoxifenil-3,6-di-O-benzoil-β-D-galactopiranosido (7) (segunda etapa en la figura 2) de la siguiente fórmula:



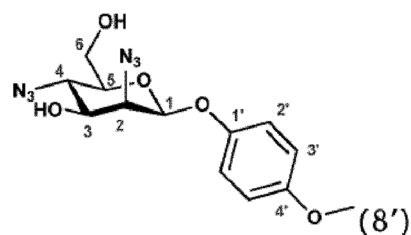
- 5 Se colocaron difenilborinato de 2-aminoetilo (79 mg, 0,35 mmol) y el compuesto 6' (1,00 g, 3,49 mmol) en un matraz con fondo redondo de 50 ml, se secaron al vacío durante 30 min, y a continuación se disolvieron en CH₃CN seco (17,5 ml). Se le añadieron N,N-diisopropiletilamina (2,43 ml, 13,96 mmol) y cloruro de benzoilo (1,62 ml, 13,96 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (30 ml), se lavó con H₂O (30 ml) y se extrajo 3 veces con acetato de etilo (30 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El material bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice (CH₂Cl₂/acetato de etilo 92:8) para dar el compuesto 7 (1,21 g, 70 %) como un polvo blanco.

2.4) Preparación del 4-metoxifenil-2,4-diazido-2,4-didesoxi-3,6-di-O-benzoil-β-D-manopiranosido (8) (tercera etapa en la figura 2) de la siguiente fórmula:



- 15 A una solución del compuesto 7 (1,98 g, 4,0 mmol) y piridina seca (1,94 ml, 24,0 mmol) en CH₂Cl₂ (27,0 ml) se le añadió gota a gota el anhídrido trifluorometanosulfónico (2,02 ml, 12,0 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1,5 h, se diluyó con CHCl₃ (60 ml) y se lavó sucesivamente con H₂O (50 ml), una solución acuosa de HCl a 1 N (50 ml), H₂O (50 ml), una solución acuosa saturada de CuSO₄ y una solución saturada de NaCl, y a continuación se concentró al vacío. El bis-triflato bruto (R_f = 0,48, ciclohexano/acetato de etilo 7:3) obtenido se disolvió en tolueno (27,0 ml) y se le añadió la azida de tetra-n-butilamonio (6,83 g, 24,0 mmol). Después de agitar 1,5 h a 65-70 °C y 1,5 h a 100 °C, la mezcla se enfrió, se diluyó con tolueno (60 ml), se lavó 2 veces con agua (50 ml), una solución saturada de NaCl, y se concentró. El residuo se cromatografió en columna ultrarrápida en gel de sílice (ciclohexano/acetato de etilo 8:2) y dio el compuesto 8 (1,95 g, 89 %) como una espuma blanquecina.

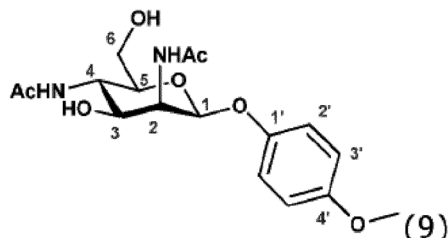
- 25 2.5) Preparación del 4-metoxifenil-2,4-diazido-2,4-dideoxi-β-D-manopiranosido (8') de la siguiente fórmula:



A una solución del compuesto 8 (630 mg, 1,15 mmol) en CH₃OH seco (4,6 ml) se le añadió una solución de metóxido de sodio en CH₃OH (2 mol l⁻¹, 0,22 ml, 0,44 mmol) y la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. A

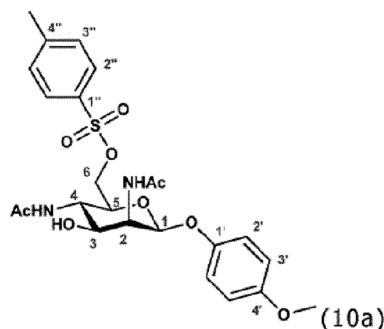
continuación, la mezcla de reacción se neutralizó con la adición de una resina de intercambio iónico Amberlite IRN-77 (forma H⁺). La filtración y la evaporación del filtrado dieron el compuesto 8' bruto (380 mg) como un sólido blanco que se utilizó para la siguiente etapa sin más purificación. Una muestra analítica se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice (ciclohexano/acetato de etilo de 9:1 a 6:4) para la caracterización.

- 5 2.6) Preparación del 4-metoxifenil-2,4-diacetamido-2,4-didesoxi-β-D-manopiranosido (9) de la siguiente fórmula:



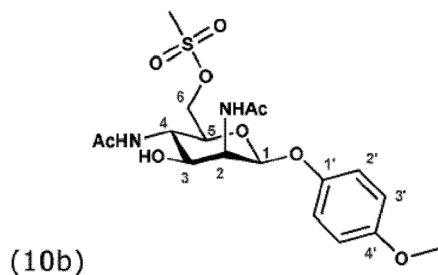
- 10 Una solución del compuesto 8' bruto (380 mg, 1,13 mmol) en CH₃OH (8,5 ml) se hidrogenó con Pd(OH)₂/C al 20 % (101 mg) a 30 °C durante 1,5 h. El catalizador se retiró por filtración a través de Celite® y el filtrado se concentró hasta la sequedad. El residuo bruto se disolvió en CH₃OH (5 ml), se le añadió anhídrido acético (0,43 ml, 4,52 mmol) y la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. El residuo obtenido después de la evaporación del solvente se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice (CH₂Cl₂/CH₃OH, 92:8) para dar el compuesto 9 (342 mg, 82 %) como un sólido blanco.

2.7) Preparación del 4-metoxifenil-2,4-diacetamido-2,4-didesoxi-6-O-tosil-β-D-manopiranosido (10a) de la siguiente fórmula:



- 15 A una solución del compuesto 9 (100 mg, 0,27 mmol) en piridina seca (0,6 ml) se le añadió una solución de cloruro de tosilo (207 mg, 1,09 mmol) en piridina seca (0,5 ml) a 0 °C y la mezcla se agitó durante 30 min. A continuación, la mezcla de reacción se paró con CH₃OH (1,0 ml) y el solvente se evaporó a presión reducida. La purificación del residuo sólido mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice (CH₂Cl₂/CH₃OH 92:8) dio el compuesto 10a (90 mg, 64%) como un polvo blanco.
- 20

2.8) Preparación del 4-metoxifenil-2,4-diacetamido-2,4-didesoxi-6-O-mesil-β-D-manopiranosido (10b) de la siguiente fórmula:



- 25 A una solución del compuesto 9 (460 mg, 1,25 mmol) en piridina seca (5,1 ml) a -10 °C se le añadió cloruro de mesilo (0,145 ml, 1,88 mmol) y la mezcla se agitó a -10 °C durante 45 min. A continuación, la reacción se paró con CH₃OH y el solvente se evaporó al vacío. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice (CH₂Cl₂/CH₃OH, 92:8) para proporcionar el compuesto 10b (411 mg, 74 %) como un sólido blanco.

2.9) Preparación del 4-metoxifenil-6-azido-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-β-D-manopiranosido (11) de la siguiente

fórmula:

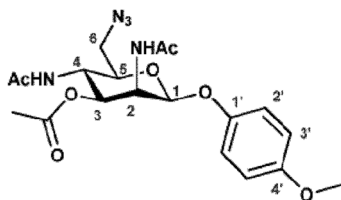
2.9.1) Se comienza a partir del tosilato (10a):

El tosilato 10a (43 mg, 0,08 mmol) y la NaN_3 (16 mg, 0,25 mmol) se disolvieron en dimetilformamida seca (0,80 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 h a 80 °C. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El sólido bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 92:8) para dar el compuesto 11 (16 mg, 50 %).

2.9.2) Se comienza a partir del mesilato 10b:

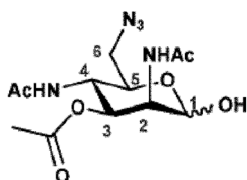
El mesilato 10b (100 mg, 0,22 mmol) y la NaN_3 (44 mg, 0,67 mmol) se disolvieron en dimetilformamida seca (2,2 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 h a 80 °C. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 92:8) para dar el compuesto 11 (59 mg, 67 %) como un sólido blanco.

2.10) Preparación del 4-metoxifenil-3-O-acetil-6-azido-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- β -D-manopiranosido (11') de la siguiente fórmula:



A una solución agitada del compuesto 11 (12 mg, 0,03 mmol) en CH_2Cl_2 seco (0,25 ml) se le añadieron piridina seca (0,015 ml, 0,18 mmol) y anhídrido acético (0,008 ml, 0,09 mmol), y la mezcla resultante se agitó 3 h a temperatura ambiente. Se le añadieron más piridina (0,008 ml, 0,09 mmol) y anhídrido acético (0,005 ml, 0,05 mmol), y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se le añadió una solución saturada de NH_4Cl y se extrajo la capa acuosa con CH_2Cl_2 . Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5) para dar el compuesto 11' (12 mg, 90 %) como un sólido blanco.

2.11) Preparación de la 3-O-acetil-6-azido-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-manosa (1a-1') de la fórmula siguiente:



A una solución del compuesto 11' (20 mg, 0,046 mmol) en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,8 ml, 3:1) se le añadió nitrato de cerio y amonio (75 mg, 0,138 mmol). La solución anaranjada transparente resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 min y luego se cargó en una columna de gel de sílice. La elución con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (94:6) dio el compuesto 3 y una mezcla de otros compuestos. La purificación de la mezcla mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 94:6) dio el compuesto 3 (12 mg, 79 %) como una mezcla de anómeros α/β (17:83) como un sólido blanco.

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1): 0,46

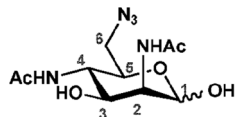
IR (cm^{-1}): 3277, 2103, 1660, 1372, 1071.

^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD) δ : 5,27 (dd, 0,8 H, $J = 10,7$ y 4,3 Hz, H-3 β); 5,07 (d, 0,8 H, $J = 1,4$ Hz, H-1 β); 4,95 (d, 0,2 H, $J = 1,4$ Hz, H-1 α); 4,92 (dd, 0,2 H, $J = 11,1$ y 4,2 Hz, H-3 α); 4,57 (dd, 0,2 H, $J = 4,2$ y 1,4 Hz, H-2 α); 4,46 (dd, 0,8 H, $J = 4,3$ y 1,4 Hz, H-2 β); 4,13 (dd, 0,8 H, $J = 10,7$ y 10,5 Hz, H-4 β); 4,08 (ddd, 0,8 H, $J = 10,5$ y 7,3 y 1,9 Hz, H-5 β); 4,02 (dd, 0,2 H, $J = 11$ y 9,8 Hz, H-4 α); 3,55 (ddd, 0,2 H, $J = 9,8$ y 7,9 y 2,1 Hz, H-5 α); 3,51 (dd, 0,2 H, $J = 12,6$ y 7,9, H-6a α); 3,46 (dd, 0,8 H, $J = 13,1$ y 7,3 Hz, H-6a β); 3,32-3,3 (m, 0,2 H, H-6b α); 3,28 (dd, 0,8 H, $J = 13,1$ y 1,9 Hz, H-6b β); 2,06, 2,05, 2,03, 2,02, 1,95, 1,93 (s, 9 H, 3 CO- CH_3).

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD) δ : 174,0, 173,9, 172,1 (3 C=O α y 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 (2 CO- CH_3 (NHAc) α y β); 21,0 (CO- CH_3 α y β).

HMRS (ESI+): $[M+H]^+$ ($C_{12}H_{20}N_5O_6$) m/z calculado: 330,1408, encontrado: 330,1391.

2.12) Preparación de la 6-azido-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-manosa (1a-1) de la siguiente fórmula:



A una solución del compuesto 11 (90 mg, 0,23 mmol) en CH_3CN/H_2O (3,6 ml, 3:1) se le añadió nitrato de cerio y amonio (376 mg, 0,69 mmol). La solución anaranjada transparente resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 min y a continuación se cargó en una columna de gel de sílice. La elución con CH_2Cl_2/CH_3OH (88:12) dio el compuesto 2 y una mezcla de otros compuestos. La purificación de la mezcla mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice (CH_2Cl_2/CH_3OH , 88:12) produce el compuesto 2 (54 mg, 82 %) como una mezcla de anómeros α/β (12:88) como un sólido blanco.

R_f (CH_2Cl_2/C_3OH , 88:12): 0,23.

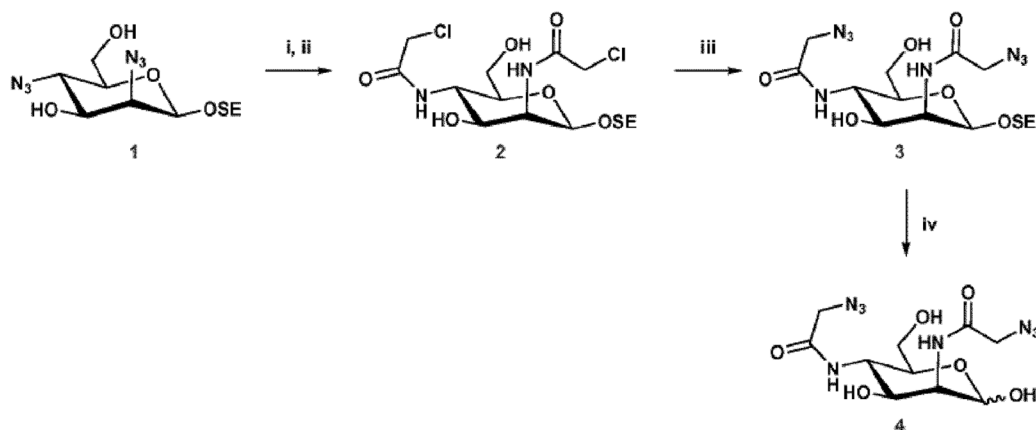
IR (cm^{-1}): 3302, 2988, 2107, 1646, 1552, 1376, 1075.

1H -RMN (500 MHz, CD_3OD) δ : 5,09 (d, 0,88 H, $J = 1,2$ Hz, H-1 β); 4,84 (d, 0,12 H, $J = 0,9$ Hz, H-1 α); 4,44 (dd, 0,12 H, $J = 4,0$ y 0,9 Hz, H-2 α); 4,26 (dd, 0,88 H, $J = 4,5$ y 1,2 Hz, H-2 β); 4,07 (dd, 0,88 H, $J = 10,0$ y 4,5 Hz, H-3 β); 3,96 (ddd, 0,88 H, $J = 10,2$ y 6,9 y 2,1 Hz, H-5 β); 3,93 (dd, 0,88 H, $J = 10,2$ y 10,0 Hz, H-4 β); 3,79 (dd, 0,12 H, $J = 10,4$ y 9,7 Hz, H-4 α); 3,73 (dd, 0,12 H, $J = 10,4$ y 4,0 Hz, H-3 α); 3,38 (dd, 0,12 H, $J = 12,7$ y 8,0, H-6a α); 3,44 (ddd, 0,12 H, $J = 9,7$ y 8,0 y 2,3 Hz, H-5 α); 3,40 (dd, 0,88 H, $J = 13,2$ y 6,9 Hz, H-6a β); 3,34-3,24 (m, 0,12 H, H-6b α); 3,27 (dd, 0,88 H, $J = 13,2$ y 2,1 Hz, H-6b β); 2,08, 2,05, 2,00, 1,98 (s, 6 H, 2 CO- CH_3).

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD) δ : 174,5, 174,3 (2 C=O α y 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 (2 CO- CH_3 (NHAc) α y β).

HMRS (ESI+): $[M+H]^+$ ($C_{10}H_{18}N_5O_5$) m/z calculado: 288,1302, encontrado: 288,1297.

3) Síntesis de la 2,4-diazidoacetamido-2,4-didesoxi-D-manosa.



Condiciones y reactivos: i) H_2 , $Pd(OH)_2/C$, CH_3OH , 30 °C, 4 h; ii) $(ClCH_2CO)_2O$, Et_3N , CH_3OH , temperatura ambiente, 2 días; iii) NaN_3 , DMF, 50 °C, durante una noche; iv) TFA, CH_2Cl_2 , 1 h.

3.1) Síntesis del 1-trimetilsililetanil-2,4-dicloroacetamido-2,4-dideoxi- β -D-manopiranosido (2).

Una solución del compuesto 1 (80,0 mg, 0,24 mmol, 1,0 eq.) en CH_3OH (1,8 ml, 0,13 M) se hidrogenó con $Pd(OH)_2/C$ al 20 % (23,4 mg) a 30 °C durante 4 h. El catalizador se retiró por filtración a través de un tapón de Celite® y el filtrado se concentró al vacío. El residuo bruto (70,8 mg, 0,25 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en CH_3OH (2,1 ml, 0,12 M) y se le añadieron anhídrido cloroacético (299,3 mg, 1,75 mmol, 7,0 eq) y Et_3N (244 μ l, 1,75 mmol, 3,0 eq). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 días y luego se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (CH_2Cl_2/CH_3OH de 100:0 a 80:20) para dar el compuesto 2 (33,1 mg, 31 %) como un aceite incoloro.

3.2) 1'-Trimetilsililetanil-2,4-diazidoacetamido-2,4-dideoxi- β -D-manopiranosido (3).

A una solución de 2 (30,3 mg, 72,0 μ mol, 1,0 eq.) en DMF seco (0,5 ml, 0,14 M) se le añadió NaN_3 (54,5 mg, 1,24 mmol,

11,8 eq.). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante una noche y a continuación se concentró a presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/acetona/CH₃OH, 90:6:4) para dar el compuesto 3 (26,8 mg, 86 %) como una espuma blanquecina.

3.3) 2,4-Diazidoacetamido-2,4-didesoxi-D-manosa (4/lb-1).

5 A una solución de 3 (20,6 mg, 46,0 µmol, 1,0 eq.) en CH₂Cl₂ (460 µl, 0,10 M) se le añadió lentamente TFA (528 µl, 6,9 mmol, 150,0 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y a continuación se evaporó 3 veces con una mezcla de tolueno/EtOAc. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna C-18 (H₂O) y se liofilizó para dar el compuesto 4 (13,8 mg, 87 %) como una mezcla de anómeros α/β (1:3) como una espuma blanquecina.

10 R_f (CH₂Cl₂/CH₃OH, 95:5): 0,28.

IR (cm⁻¹): 3283, 2952, 2841, 2120, 1646, 1450, 1409, 1013.

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₁₀H₁₇N₈O₆) m/z calculado: 345,1271, encontrado 345,1233.

Anómero α:

15 ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ: 5,10 (d, 1 H, J_{1,2} 1,7 Hz, H-1); 4,34 (dd, 1 H, J_{2,3} 4,4, J_{2,1} 1,7 Hz, H-2); 4,17 (dd, 1 H, J_{3,4} 10,9, J_{3,2} 4,4 Hz, H-3); 3,97 (d, 1 H, J_{2''a,2''b} 16,5 Hz, CH-2''a); 3,94 (d, 1 H, J_{2''a,2''b} 16,5 Hz, CH-2''b); 3,94 (d, 1 H, J_{2''c,2''d} 16,1 Hz, CH-2''c); 3,91 (d, 1 H, J_{2''c,2''d} 16,1 Hz, CH-2''d); 3,90-3,79 (m, 1 H, H-5); 3,83 (dd, 1 H, J_{4,3} 10,9, J_{4,5} 9,8 Hz, H-4); 3,70-3,60 (m, 2 H, H-6).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ: 171,4, 171,1 (2 C=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 (CH₂-N₃); 50,2 (C-4).

20 Anómero β:

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ: 4,88 (d, 1 H, J_{1,2} 1,6 Hz, H-1); 4,46 (dd, 1 H, J_{2,3} 3,9, J_{2,1} 1,6 Hz, H-2); 3,99-3,79 (m, 4 H, 2 CH-2''); 3,92-3,80 (m, 1 H, H-4); 3,92-3,80 (m, 1 H, H-3); 3,70-3,60 (m, 2 H, H-6); 3,36 (ddd, 0,6 H, J_{5,4} 9,7, J_{5,6} 4,0, J_{5,6} 2,6 Hz, H-5).

25 ¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ: 171,4, 171,1 (2 C=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 (CH₂-N₃); 50,1 (C-4).

Ejemplo 2: Marcación del LPS de *L. pneumophila* vivas.

1) Material y métodos

1.1) Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

30 Se hacen crecer cepas de *Legionella* (tabla 1) en el medio con extracto de levadura suplementado con L-cisteína, pirofosfato férrico y α-cetoglutarato (YEC). Se hicieron crecer *E. coli* K12 (MG1655) y *P. aeruginosa* (ATCC 9027) en el medio de Luria-Bertani (LB). Todas las cepas se hicieron crecer en un agitador rotatorio (160 rpm) a 37 °C. Todas las cepas las suministró el CNRL (Centro Nacional de Referencia sobre *Legionella*).

Tabla 1

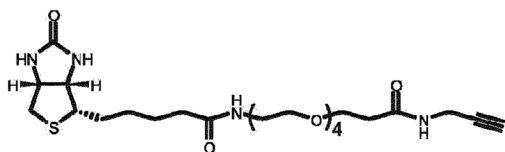
Especie de <i>Legionella</i>	Serogrupo	Tipo
<i>Legionella pneumophila</i>		
Philadelphia 2	1	33152
Paris	1	CIP 33152
Lens	1	CIP 108286
	1	LG 0901 3003
	3	LG 0903 1009
	4	LG 0905 1005
	5	LG 0905 3003
	6	LG 0846 3022
	7	LG 0824 4007
<i>Legionella</i> spp.		
<i>L. gormanii</i>		HL 0540 3034
<i>L. maceachernii</i>		HL 0540 G20 2029

<i>L. micdadei</i>		HL 0522 5034
<i>L. bozemanii</i>		HL 0538 2034
<i>L. feelii</i>		HL 0418 4001
<i>L. jordanis</i>		HL 0450 5001
<i>L. tucsonensis</i>		HL 0438 3117
<i>L. anisa</i>		CH47 ATTC 35291

1.2) Química clic catalizada por cobre

Los cultivos durante una noche se diluyeron 100 veces en medio recién preparado (volumen final de 100 μ l) que contenía 2 o 3 (4 mM). Las bacterias se incubaron a 37 °C durante 12 h y luego se lavaron 3 veces con el tampón de fosfato (0,05 M, pH 7,5) mediante centrifugación a 13 000 $\times g$ durante 2 min a temperatura ambiente.

- 5 Se utilizó una sonda de biotina-alquino de la siguiente fórmula 4:



La marcación de la biotina se visualizó a continuación por el reconocimiento con un anticuerpo antibiotina marcado con fluorescencia de la manera que se describe a continuación.

- 10 El CuSO_4 y la TGTA, a una concentración final de 2 mM y 4 mM, respectivamente, se mezclaron durante una noche en el tampón de fosfato (0,05 M, pH 7,5) a 37 °C con agitación vigorosa. A continuación, a CuSO_4 /TGTA se le añadieron aminoguanidina, ascorbato de sodio y biotina-alquino (4) a una concentración final de 4 mM, 5 mM y 1 mM, respectivamente, y se mezcló durante una noche. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en esta solución y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Las células se lavaron entonces 3 veces con el tampón de fosfato mediante centrifugación a 13 000 $\times g$ durante 2 min a temperatura ambiente antes de la resuspensión en 10 μ l del tampón de fosfato (0,05 M, pH 7,5) suplementado con 0,5 μ l de la fracción del anticuerpo monoclonal antibiotina de tipo IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 488 (solución concentrada a 0,62 mg/ml, Jackson ImmunoResearch) y se analizó adicionalmente por microscopía.

1.3) Microscopia de fluorescencia

- 20 Las bacterias se inoculaban sobre cubreobjetos de cristal y se cubrieron con una delgada capa de agar semisólido al 1 % (1 mm de grosor) hecha con LB diluido (1/10 en el tampón de fosfato (0,05 M, pH 7,5)). Las imágenes se registraron en el 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 100 $\times$ /1.4 DLL. La luz de excitación se emitió mediante una luz de haluro metálico de 120 W y se valoró la señal con los filtros adecuados. Se llevó a cabo el análisis digital y el procesamiento de imágenes con un script personalizado de automatización (Visual Basic) con Metmorph 7.5 (Molecular Devices, Molecular Devices France, Francia) tal y como se describió anteriormente [1].

2) Resultados

- 30 21) Se han seleccionado 4 cepas diferentes de *L. pneumophila* que pertenecen al serogrupo 1 y que incluyen (a) una cepa, Philadelphia, aislada de una de las víctimas del brote histórico de Filadelfia [10], (b) la cepa Paris, que fue responsable de la epidemia intrahospitalaria en el moderno y de nueva construcción Hospital Georges Pompidou que acababan de abrir en París en el año 2000, y que se volvió endémica en toda Europa [11], (c) la cepa Lens, que infectó a 86 personas y mató a 17 en el norte de Francia durante el invierno de 2003-2004 y que, por ello, se la considera responsable de la epidemia más importante en este país.

- 35 Estas cepas se hicieron crecer primero en presencia del compuesto Ia-1 y la incorporación del indicador químico azido en el LPS se rastreó en una etapa posterior, con el uso de la cicloadición de azida-alquino catalizada con cobre en las condiciones descritas anteriormente [12], con sulfato de cobre, ascorbato de sodio, TGTA, ligando de tris(triazolilo) hidrosoluble para el cobre (I), y una sonda de biotina-alquino de la fórmula 4 de más arriba en vez de un fluorocromo, durante 30 min, tal y como está descrito más arriba.

- 40 A continuación, la marcación de la biotina se visualizó mediante un anticuerpo antibiotínico marcado con fluorescencia. En estos experimentos, todas las cepas mostraban una fluorescencia muy distintiva en su membrana, lo que indicaba la incorporación metabólica eficaz del indicador químico (figura 3). Estos resultados contrastan con los de otras bacterias, tales como *E. coli* y *P. aeruginosa*, que no mostraron ninguna marcación en las mismas condiciones (figura 5).

Este resultado llevó a analizar la especificidad de esta estrategia de marcación en otras cepas de *Legionella*, que no pertenecían a la especie *pneumophila* y que, por lo tanto, no se ha descrito que contengan ácido legionamínico en su LPS. Un conjunto representativo de tales cepas, que contiene *L. gormanii*, *L. maceachernii*, *L. micdadei*, *L. anisa*, *L. feeli*, *L. Jordanis*, *L. tucsonensis* y *L. bozemanii* se sometieron, por lo tanto, a las mismas condiciones de marcación y no se observó ninguna fluorescencia en la membrana (figura 6), lo que es coherente con la ausencia de Leg dentro de sus lipopolisacáridos. El método es, por lo tanto, capaz de discriminar con eficacia entre el serogrupo 1 de *L. pneumophila* y otras *Legionella*, que no pertenecen a la especie *pneumophila*.

A continuación, se evaluó la capacidad de este método para marcar las cepas de *L. pneumophila* que pertenecen a otros serogrupos. Esto es un punto interesante, ya que, aunque el serogrupo 1 se encuentran en la mayoría de los casos infectados, en el entorno abundan otros serogrupos. Por lo tanto, la posibilidad de marcar estos otros serogrupos sería un resultado importante que permitiría una mejor evaluación de la presencia de *L. pneumophila* en una muestra dada. La mayoría de estos serogrupos se ha demostrado que contienen otro isómero de un ácido 5-acetamidino-7-acetamido-3,5,7,9-tetradexonon-2-ulosónico, denominado ácido 5-N-acetimidil-7-N-acetil-4-epilegionamínico (4eLeg5Am7Ac) [13], con diferentes grados de 8-O-acetilación en función del serogrupo. A diferencia de la ruta de Leg, no se ha identificado todavía la ruta biosintética de 4eLeg, pero se podría especular que implicaría intermedios similares. Cuatro cepas, que pertenecen a los serogrupos 3, 4, 5, 6 que representan juntas con el serogrupo 1 entre el 68 y el 85 % de las *L. pneumophila* presentes en el entorno [1], mostraron una marcación membranaria muy brillante (figura 4). Esto tiende a indicar que la biosíntesis de Leg y 4eLeg comparten aparentemente la como precursor común. No obstante, no se puede concluir en este punto si Leg y 4eLeg se obtienen directamente de la modificación de este precursor común, por ejemplo, mediante dos aldolasas diferentes, o si Leg se produce en todas las cepas y además se convierte en 4eLeg mediante una epimerasa en una etapa posterior de la ruta. No obstante, este método permite detectar de manera específica y clara las cepas de *L. pneumophila* que no pertenecen al serogrupo 1.

Es interesante que la única excepción observada incumba a una cepa de *L. pneumophila* que pertenece al serogrupo 7 (figura 4), un serogrupo que está poco representado tanto en los casos de infección como en el entorno. Se ha descrito que el serogrupo 7 presenta un isómero del ácido 5-acetamidino-7-acetamido-3,5,7,9-tetradexonon-2-ulosónico aún sin identificar dentro de su O-polisacárido [13]. Esta observación es coherente con la ausencia de marcación, que tiende a indicar que el compuesto no es un intermedio en la correspondiente ruta biosintética. Un isómero de la está muy probablemente implicado a modo de sustrato para la aldolasa.

Se realizó otra serie de experimentos con la-1', un derivado monoacetilado de la-1, en donde R2 es -OAc. Se esperaba que este compuesto esterificado menos polar pudiera entrar en la célula bacteriana con más eficacia mediante el transporte pasivo, y que se podría incorporar además en el LPS después de la desacetilación a la-1 por una actividad esterasa inespecífica dentro de la célula. La disponibilidad y extensión de tal actividad dentro de las células bacterianas ha sido objeto de debate recientemente en la comunidad científica [14]. No se observó ninguna marcación en el laboratorio en las condiciones *in vitro* con la-1', incluso en el caso de las cepas de *L. pneumophila* que se marcaron con eficacia con 2 (figura 7). Esto sugiere que tal actividad esterasa no está presente a un nivel suficiente dentro de la célula bacteriana para permitir una producción eficaz de la-1 a partir de la-1' y la posterior metabolización e incorporación de la-1 en una proporción detectable.

El método de más arriba parece una estrategia eficaz para detectar de forma específica e identificar las *L. pneumophila* vivas, una bacteria patógena de alto impacto sanitario y económico. La ausencia de marcación con un precursor acetilado en las condiciones de laboratorio de más arriba puede explicarse por el hecho de que la actividad inespecífica de la esterasa dentro de tal bacteria de *Legionella* podría no ser suficiente para la liberación eficaz al interior de la célula bacteriana de un precursor glucídico acetilado con anterioridad.

Sin embargo, tal esterasa inespecífica está presente y la metabolización e incorporación con la-1' podría producirse, por lo tanto, en el entorno de las células eucariotas, tal como en las circunstancias que se dan en una torre de refrigeración a la que *Legionella* puede llegar dentro de las amebas o en una muestra biológica que comprende células eucariotas, tales como las muestras de humano.

2.2) Para analizar la incorporación de lb-1, se han seleccionado cuatro cepas diferentes de *L. pneumophila* de la tabla 1 (véase la tabla 2).

Tabla 2

Especie de <i>Legionella</i>	Serogrupo	Tipo
<i>Legionella pneumophila</i>		
Philadelphia 2	1	33152
Paris	1	CIP 33152
	3	LG 0903 1009
	6	LG 0846 3022

Los mismos procedimientos experimentales se han llevado a cabo como se mencionó más arriba. Estas cepas se hicieron crecer primero en presencia del compuesto lb-1 y la incorporación del indicador químico azido en el LPS se rastreó en una etapa posterior, con el uso de una cicloadición de azida-alquino catalizada con cobre en las condiciones que se describen anteriormente y una sonda de biotina-alquino de la fórmula 4 de más arriba en vez de un fluorocromo, durante 30 min tal y como está descrito más arriba. A continuación, la marcación de la biotina se visualizó por el reconocimiento con un anticuerpo antibiotínico marcado con fluorescencia. En estos experimentos, todas las cepas mostraban una fluorescencia muy distintiva en la membrana, indicativa de una incorporación metabólica eficaz del indicador químico. Estos resultados indicaban, como se espera, que el compuesto lb-1 también es asimilado por *L. pneumophila*.

10 Referencias bibliográficas

- [1] 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).
- [2] Knirel, Y. A., Rietschel, E. T., Marre, R. & Zahringer, U. The structure of the a-specific chain of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 221, 239-245 (1994).
- [3] Glaze, P. A., Watson, D. C., Young, N. M. & Tanner, M. E. Biosynthesis of CMP-N,N'-diacetyllegionaminic acid from UDP-N,N'-diacetyl bacillosamine in *Legionella pneumophila*. *Biochemistry* 47, 3272-3282 (2008).
- [4] McGill, N. W. & Williams, S. J. 2,6-Disubstituted Benzoates As Neighboring Groups for Enhanced Diastereoselectivity in - Galactosylation Reactions: Synthesis of β -1,3-Linked Oligogalactosides Related to Arabinogalactan Proteins. *J. Org. Chem.* 74, 9388-9398 (2009).
- [5] Zemplén, G., Kunz, A. Ober die Natriumverbindungen der Glucose und die Verseifung der acylierten Zucker. *Chem Ber* 56, 1705- 1710 (1923).
- [6] Lee, D. & Taylor, M. S. Borinic Acid-Catalyzed Regioselective Acylation of Carbohydrate Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 3724-3727 (2011).
- [7] Tsvetkov, Y. E., Shashkov, A. S., Knirel, Y. A. & Zahringer, U. Synthesis and NMR spectroscopy of nine stereoisomeric 5,7- diacetyl-3,5,7,9-tetraoxynon-2-ulosonic acids. *Carbohydr Res* 335, 221-243 (2001).
- [8] 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).
- [9] Hewitt, M. C. & Seeberger, P. H. Solution and Solid-Support Synthesis of a Potential Leishmaniasis Carbohydrate Vaccine. *J. Org. Chem.* 66, 4233-4243 (2001).
- [10] 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).

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

[12] 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).

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

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

REIVINDICACIONES

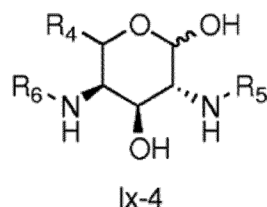
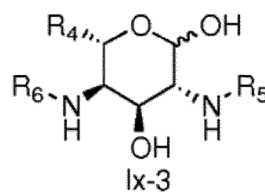
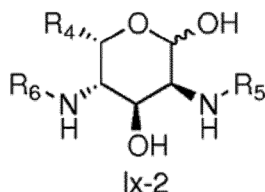
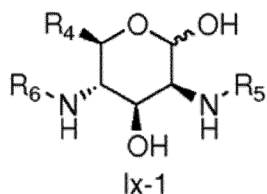
1. Un método para marcar de forma específica las bacterias vivas de una categoría dada de bacterias en una muestra que comprende bacterias, en donde el método comprende las etapas de:

a) incubar dicha bacteria de dicha muestra con al menos un compuesto de tipo monosacárido modificado que comprende un primer grupo químico reactivo capaz de reaccionar químicamente con un segundo grupo reactivo, de tal forma que un resto de monosacárido que lleva dicho primer grupo reactivo se incorpora en los polisacáridos de la membrana externa de tales bacterias, sobre todo en el LPS o el CPS de la membrana externa de tales bacterias, y

b) poner en contacto dicho resto de monosacárido modificado incorporado en la membrana externa de la bacteria, con una molécula marcadora que comprende un mencionado segundo grupo reactivo, para generar la reacción química de dicho primer grupo reactivo de dicho resto de monosacárido incorporado dentro de dicha membrana externa de dicha bacteria viva con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula marcadora, lo que da lugar a un enlace covalente,

caracterizado por que dicho compuesto de tipo monosacárido modificado es un precursor endógeno modificado de un resto de ácido ulosónico endógeno de dichos polisacáridos de la membrana externa de dicha bacteria,

dicho compuesto de tipo monosacárido modificado es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas (Ix-1) a (Ix-4) o una sal del mismo:



en donde:

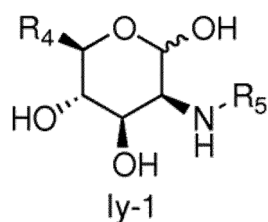
- R4 es H o una cadena de alquilo de C1 a C4, en donde cada carbono está sustituido o no por OH o NH₂ sustituido o no por grupos protectores de los mismos, preferiblemente por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoílo, y

- R5 y R6 son independientemente grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoílo, sustituidos o no, y

- en donde al menos uno de los grupos R4, R5 y R6 está sustituido por un mencionado primer grupo reactivo,

o

dicho compuesto de tipo monosacárido modificado es un compuesto que tiene la siguiente fórmula (Iy-1) o una sal del mismo, en donde:



en donde

- R4 es H o una cadena de alquilo de C1 a C4, en donde cada carbono está sustituido o no por OH o NH₂ sustituidos

o no por grupos protectores de los mismos, preferiblemente por grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, en donde R4 es preferiblemente CH₂OH, y

- R5 puede ser grupos alquilo, hidroxialquilo, acilo, formilo o imidoilo, sustituidos o no, en donde R5 es preferiblemente COCH₃, y

- 5 - al menos uno de los grupos R4 y R5 está sustituido por un mencionado primer grupo reactivo;

las partes monosacáridicas de los compuestos de las fórmulas (Ix-1) a (Ix-4) son precursores de los siguientes monosacáridos endógenos de las fórmulas Ic-1 a Ic-5 respectivamente, a saber:

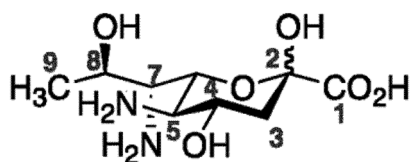
- (Ix-1) es un precursor de compuestos de tipo monosacárido endógeno de las siguientes fórmulas (Ic-1) e (Ic-2);

- (Ix-2) es un precursor del compuesto de tipo monosacárido endógeno de la siguiente fórmula (Ic-3);

- 10 - (Ix-3) es un precursor del compuesto de tipo monosacárido endógeno de la siguiente fórmula (Ic-4); y

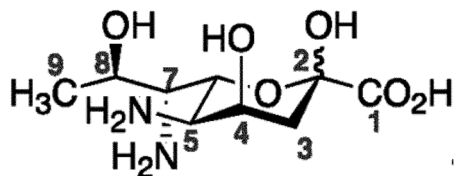
- (Ix-4) es un precursor del compuesto de tipo monosacárido endógeno de la siguiente fórmula (Ic-5);

- (Ic-1) es



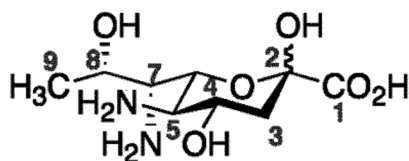
- 15 que se puede encontrar en *Legionella pneumophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fluorescens* y *Vibrio salmonicida*;

- (Ic-2) es



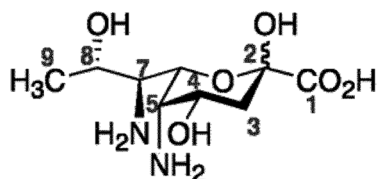
que se puede encontrar en el LPS de las bacterias *Legionella pneumophila* y en *Schewanella japonica*;

- (Ic-3) es



- 20 que se puede encontrar en las cepas de *E. coli*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia ruckeri*, *Salmonella arizonae*, *Morganella morganii*, *Shewanella putrefaciens*;

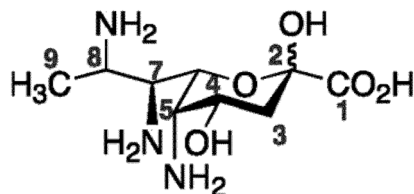
- (Ic-4) es



- 25 que se puede encontrar en el O-antígeno de *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella boydii*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas distincta*, *Sinorhizobium fredii*, *Vibrio cholerae*, *Pseudoalteromonas atlantica* y la pared celular de *Kribella* spp. 5 (grampositiva) y *Actinoplanes Utahensis* (grampositiva) y el núcleo del LPS de *Vibrio parahaemolyticus* y en las glucoproteínas del flagelo de *Campylobacter*

jejuni, *Campylobacter coli*, *Helicobacter pylori* y *Clostridium botulinum*, y en el CPS de las bacterias *Sinorhizobium*;

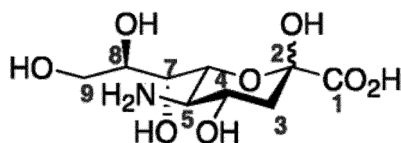
- (Ic-5) es



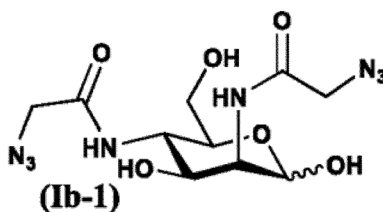
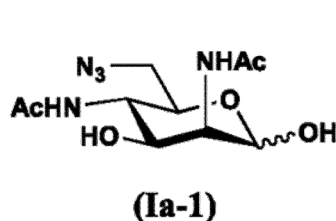
que se puede encontrar en *Tenacibaculum maritimum*;

- 5 la parte monosacáridica de los compuestos de las fórmulas (Iy-1) es el precursor del siguiente monosacárido endógeno de las fórmulas Ic-6, a saber:

- (Ic-6) es



- 10 que se puede encontrar en el CPS de *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella nonliquefaciens* y *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Streptococcus agalactiae* (grampositiva), *Streptococcus suis* (grampositiva) y en O-antígeno del LPS de las bacterias que incluyen *Hafnia alvei*, *Escherichia albertii*, *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Vibrio cholerae*, *Shewanella algae*, y en el núcleo del LPS de varios microorganismos patógenos, entre ellos *N. meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Histophilus somni*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mencionado compuesto de tipo monosacárido modificado se selecciona entre los siguientes compuestos Ia e Ib:
- en donde el compuesto Ia es un compuesto en donde R5 y R6 son -Ac, y R4 es CH₂-Ra, preferiblemente -CH₂-N₃; y
- en donde el compuesto Ib es un compuesto en donde R5 y R6 son -COCH₂Ra, en donde Ra es preferiblemente N₃ y R4 es CH₂OH.
- 20 3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dichas bacterias son bacterias gramnegativas que comprenden el resto de monosacárido endógeno en la capa de LPS de su membrana externa, seleccionada preferiblemente entre *Legionella pneumophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio salmonicida*, *Shewanella japonica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Tenacibaculum maritimum*.
- 25 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 a 3, en donde dicho compuesto de tipo monosacárido modificado es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas (Ia-1), (Ib-1) o una del mismo:



5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 para marcar específicamente las bacterias vivas de *Legionella pneumophila* y dicho compuesto de tipo monosacárido modificado es un compuesto de fórmula Ia-1.
- 30 6. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, que comprende la etapa adicional de:
- c) detectar las bacterias vivas al detectar si dichas bacterias comprenden dicha molécula marcadora fijada a los glucanos de su membrana externa y/o inmovilizar dichas bacterias vivas que llevan dicha molécula marcadora sobre un sustrato sólido, en donde dicha molécula marcadora es una molécula que comprende una sustancia detectable o

que es capaz de reaccionar o de fijarse a una sustancia detectable, o dicha molécula marcadora es una primera molécula que lleva un mencionado segundo grupo reactivo, en donde dicha primera molécula es capaz de reaccionar o de fijarse a una segunda molécula y/o a un sustrato sólido, preferiblemente en donde dicha segunda molécula comprende una sustancia detectable y/o dicha segunda molécula se fija o es capaz de fijarse a dicho sustrato sólido.

- 5 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 para detectar específicamente las bacterias vivas de una categoría dada de bacterias en una muestra que comprende bacterias, en donde dicha molécula marcadora es una molécula detectable que comprende una sustancia detectable, en donde el método comprende la etapa c) de detección de bacterias vivas al detectar si dichas bacterias comprenden dicha molécula detectable fijada a los glucanos de su membrana externa.
- 10 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde dicha molécula marcadora es un primer ligando o una primera proteína fijadora que lleva un mencionado segundo grupo reactivo y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando o primera proteína de fijación se detecta y/o inmoviliza al poner en contacto dicho primer ligando o primera proteína de fijación con un segundo ligando o segunda proteína de fijación o al fijarse específicamente a dicho primer ligando o primera proteína de fijación.
- 15 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 a 8, en donde dicha molécula marcadora es un primer ligando, preferiblemente biotina, que lleva un mencionado segundo grupo reactivo, y en la etapa c) dichas bacterias vivas acopladas a dicho primer ligando se detectan mediante la reacción de dichas bacterias con un anticuerpo específico contra dicho primer ligando, en donde dicho anticuerpo lleva una sustancia detectable, preferiblemente un fluorocromo o una molécula luminiscente o una enzima.
- 20 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el primer grupo reactivo se selecciona entre los grupos que consisten en o que llevan el grupo azido y los grupos que consisten en o que llevan el grupo alquino, en donde el mencionado primer grupo reactivo es preferiblemente el grupo azido y el mencionado segundo grupo reactivo se selecciona entre los grupos que consisten en o que llevan, respectivamente, los grupos alquino y azido, en donde el mencionado segundo grupo reactivo es preferiblemente el grupo alquino, en donde la
- 25 reacción de dicho grupo reactivo azido con el mencionado grupo reactivo alquino se lleva a cabo al realizar una cicloadición de azida-alquino.
11. Un uso de un kit para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho kit comprende:
 - 30 - un mencionado compuesto de tipo monosacárido modificado de las fórmulas (Ix-1) a (Ix-4) o (Iy-1) sustituido con un mencionado primer grupo reactivo, en donde dicho compuesto es un precursor modificado capaz de convertirse en un resto de ácido ulosónico endógeno modificado incorporado en un polisacárido de la membrana externa de una bacteria, sobre todo en el LPS o el CPS de la membrana externa de tal bacteria, y
 - una mencionada molécula marcadora que comprende un mencionado segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con dicho primer grupo reactivo, y
 - 35 - optativamente, los reactantes para generar la reacción de dicho primer grupo reactivo de dicho resto análogo incorporado dentro de dichos polisacáridos de la membrana externa de dichas bacterias con dicho segundo grupo reactivo de dicha molécula marcadora.
- 40 12. El uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 11, que además comprende un medio de cultivo o de incubación que permite el crecimiento de dicha categoría dada de bacterias, preferiblemente específico para el crecimiento de dicha categoría dada de bacterias.

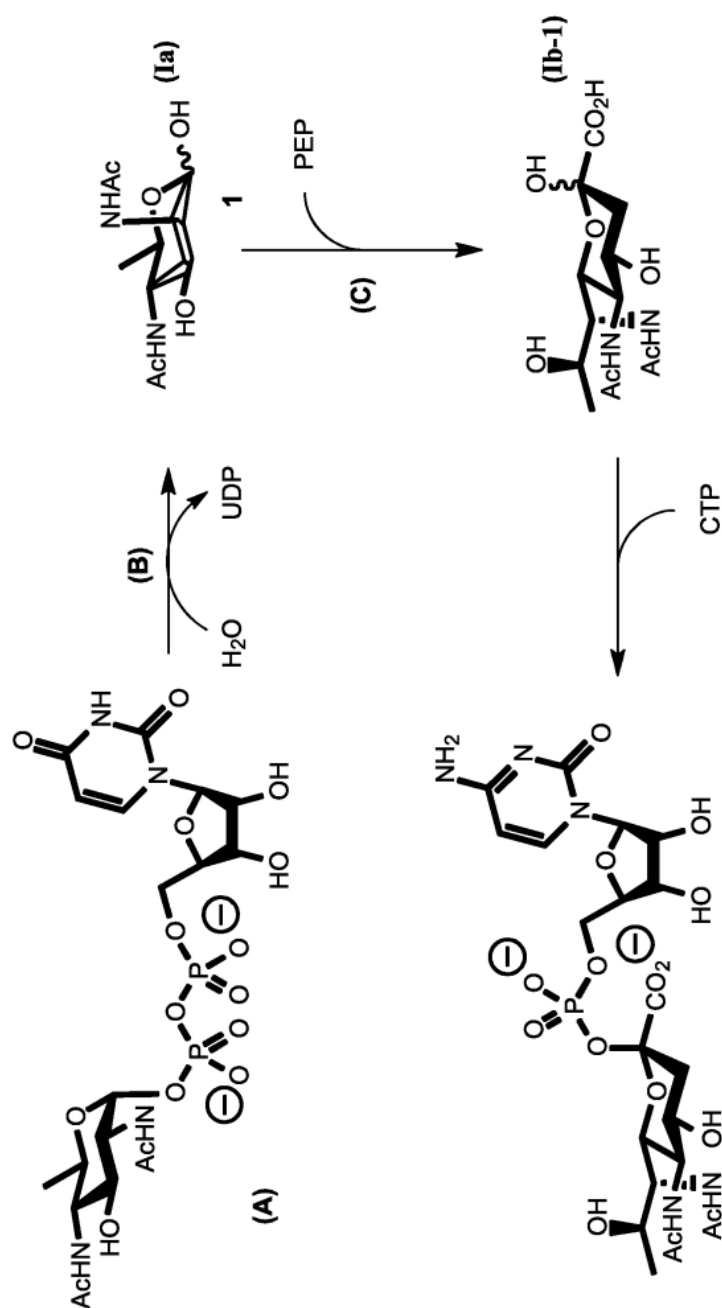


FIG.1

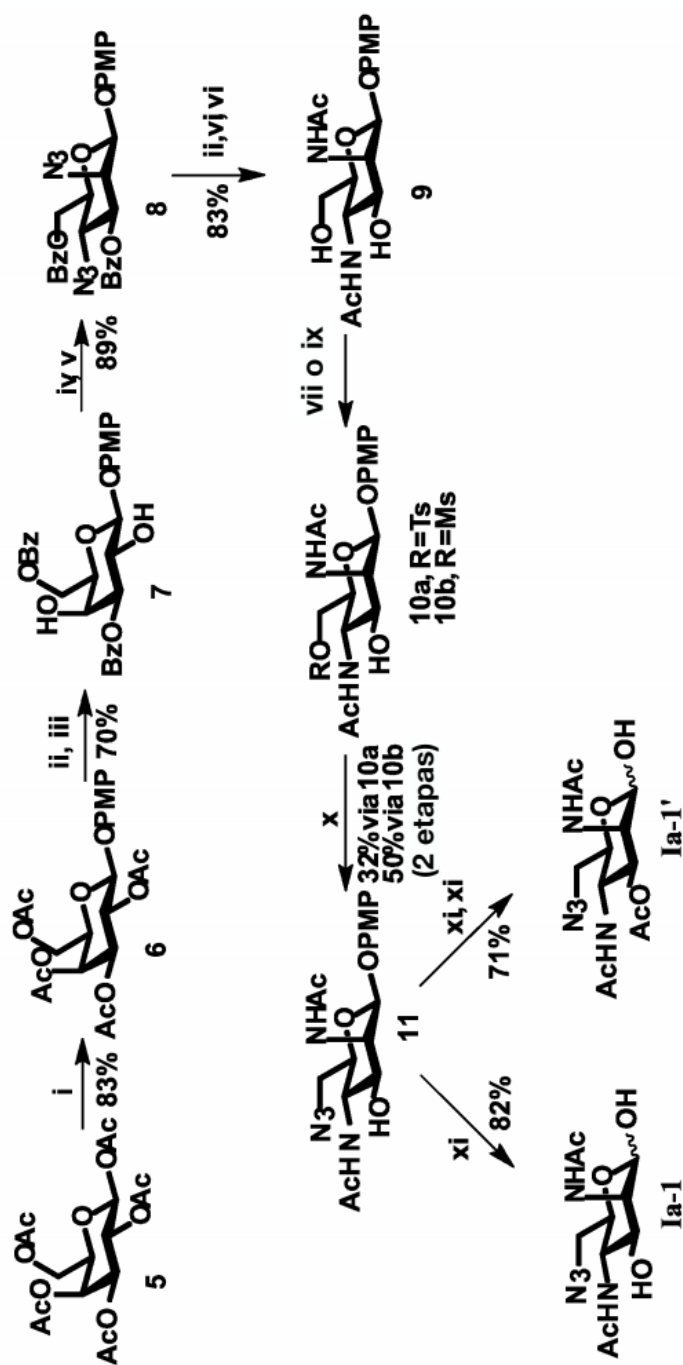


FIG.2

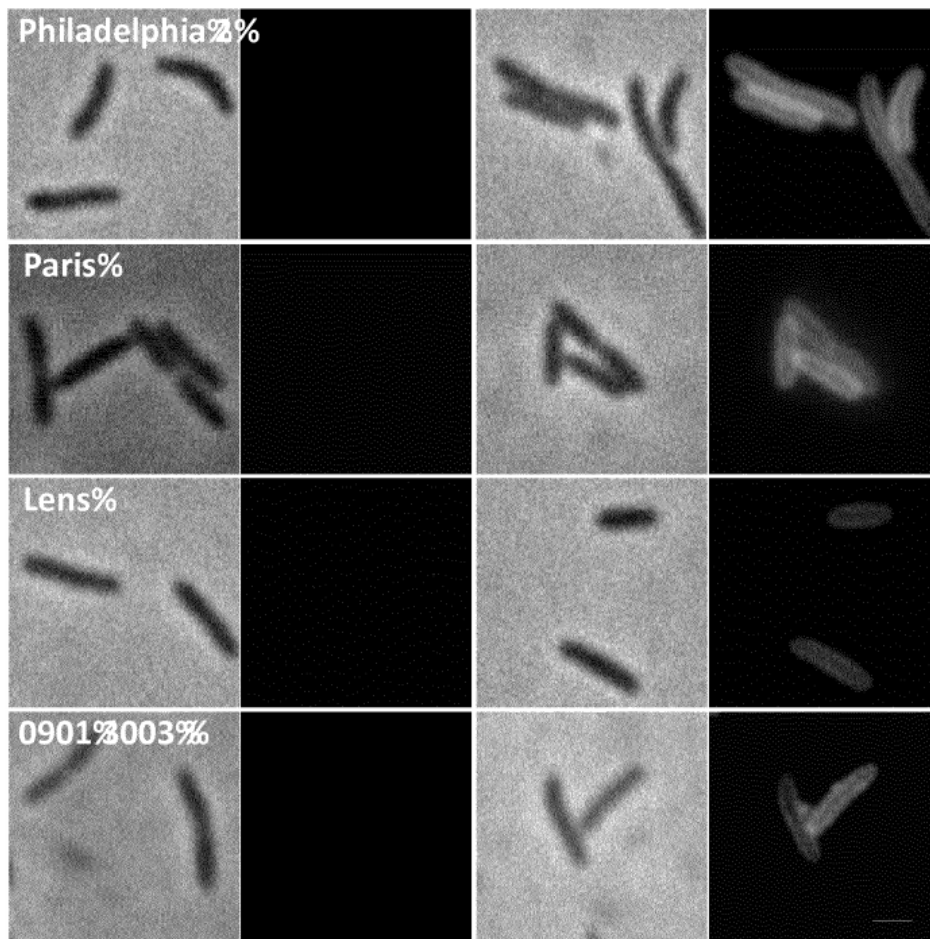


FIG.3

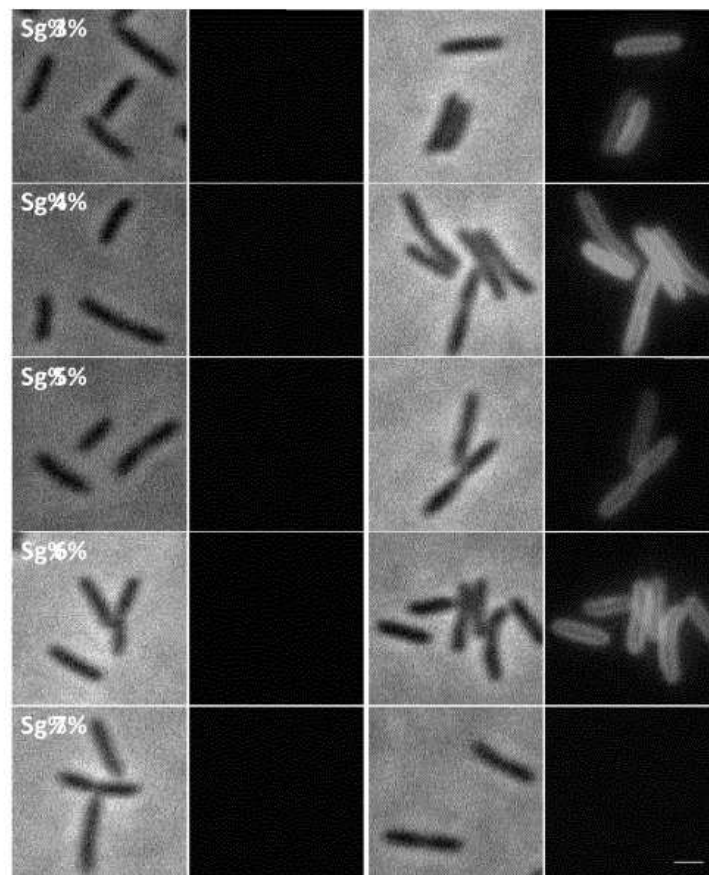


FIG.4

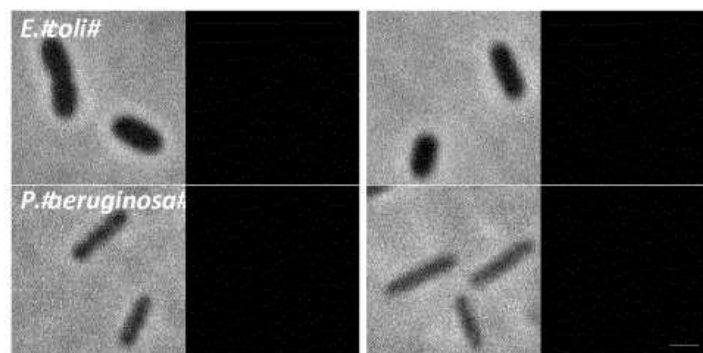


FIG.5

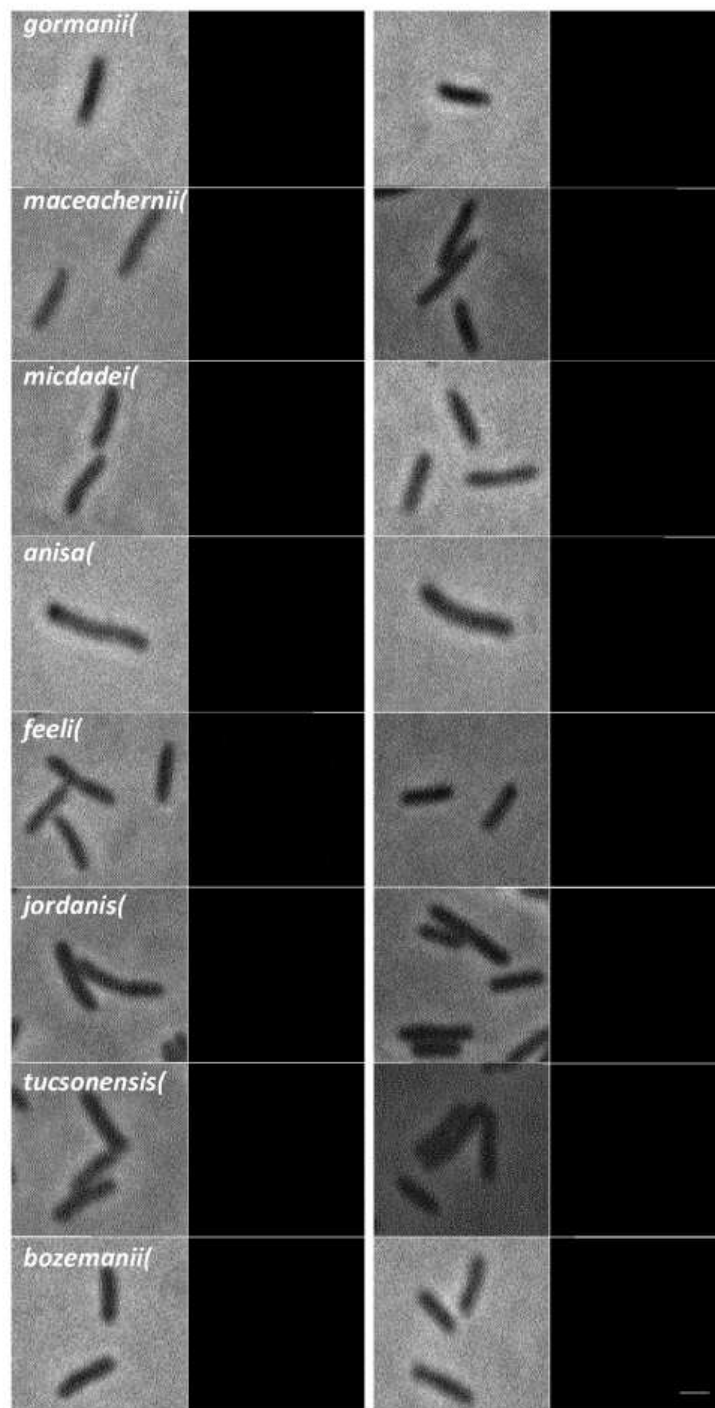


FIG.6

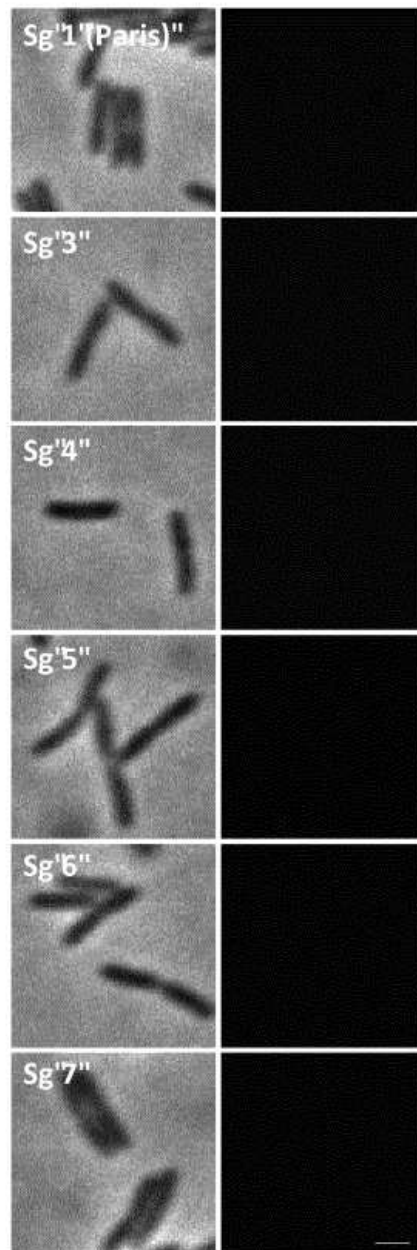


FIG.7