

PROTOTIPO DE VACUNA DE GLUCOCONJUGADO SINTÉTICO CONTRA STREPTOCOCCUS SUIIS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001]La presente invención se refiere generalmente a la prevención de las enfermedades asociadas a *Streptococcus suis* (*S. suis*). Más específicamente, la invención se refiere a una vacuna contra el serotipo 2 de *S. suis*. La vacuna comprende fragmentos sintetizados químicamente y, por ende, puede hacerse ampliamente disponible en el comercio. La vacuna se usa en la producción de ganado y puede adaptarse para su uso contra otros serotipos de *S. suis* tales como los serotipos 1, 1/2, 3, 9 y 14, así como para su uso en humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002]*Streptococcus suis* (*S. suis*) es un patógeno porcino importante que existe en todo el mundo y causa pérdidas económicas significativas. La bacteria *S. suis* expresa polisacáridos capsulares (CPS), un factor de virulencia bacteriana principal que define los serotipos. *S. suis* puede transmitirse a seres humanos por medio del contacto estrecho con cerdos o productos de cerdo contaminados. *S. suis* causa meningitis, septicemia, endocarditis, artritis y shock séptico tanto en cerdos como en seres humanos. La mortalidad en cerdos es alta. Actualmente, no existe en el mercado una vacuna eficaz para prevenir las enfermedades asociadas a *S. suis* en cerdos. El uso de vacunas autógenas en el cambio ha sido, hasta ahora, decepcionante.

[0003]Las vacunas autógenas consisten en bacterias muertas (“bacterinas”) de las cepas predominantes que se recuperan de una granja afectada, se producen en laboratorios licenciados y se otorgan solo a esa misma granja. Consecuentemente, estas vacunas son “específicas de granja”. Muy pocos estudios experimentales mostraron que bacterinas “hechas en laboratorios” pueden ser eficaces cuando se combinan con adyuvantes altamente potentes. Sin embargo, estas combinaciones han mostrado ser altamente reactivas. Los efectos secundarios consecuentes hacen que estas combinaciones sean comercialmente indeseables.

[0004]De acuerdo con la Canadian Swine Health Information Network, las enfermedades asociadas a *S. suis* son el problema infeccioso más común que se informa en las granjas porcinas canadienses. Adicionalmente, luego de consultar a fines de 2018 con personas del oficio porcino, la industria y también con bacteriólogos y diagnosticadores expertos, el Monitoring and Analysis Working Group from the Swine Health Information Center (SHIC) en Estados Unidos revisó y estableció las calificaciones finales para lo que hoy es la Swine Bacteria Disease Matrix. Como se declara en su sitio web, *S. suis* encabeza la lista como el patógeno porcino bacteriano más importante (<https://www.swinehealth.org/swine-bacterial-disease-matrix/>).

[0005]La incidencia de la enfermedad puede ser tan alta como un 20 %, aunque usualmente se mantiene por debajo del 5 % en el campo gracias al extensivo y rutinario uso profiláctico y metafiláctico de antimicrobianos.

[0006]Es altamente deseable reducir el uso de antimicrobianos en la producción

de ganado. La prevención de enfermedades de *S. suis* debe enfocarse en cambio en el manejo de factores predisponentes como la vacunación.

[0007]El trabajo previo sobre vacunas contra *S. suis* se ha enfocado en la evaluación de bacterinas, vacunas de subunidad (en su mayoría, a base de proteínas) o cultivos bacterianos vivos atenuados. Por ejemplo, WO 2017/062558A1 [1] evalúa una vacuna de conjugado CPS bacteriano producido por un método tradicional. El método usa una porción despolimerizada del CPS nativo (purificado del cultivo bacteriano) y conjugado a toxoide tetánico como portador por medio del uso de la técnica de aminación reductora. Este método es complejo. Además, este método presenta una alta variabilidad entre lotes, dificultades en la caracterización del producto y requiere un manejo de patógenos (nivel II) para producir el CPS.

[0008]Los inventores son también conscientes del documento Zhang et al. [2], el cual divulga antígenos oligosacáridos que se asemejan al CPS de los serotipos 2, 3, 9 y 14 de *S. suis*.

[0009]Existe una necesidad para vacunas eficaces contra las infecciones de *S. suis*. Existe una necesidad para que dichas vacunas estén disponibles en el comercio para su uso por los veterinarios y productores porcinos. También existe una necesidad para que dichas vacunas puedan adaptarse para su uso en humanos.

[0010]SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

[0011]Los inventores han diseñado y preparado una vacuna de glucoconjugado sintético que comprende un fragmento del polisacárido capsular (CPS) del serotipo 2. El fragmento se selecciona entre fragmentos de acuerdo con la invención, los cuales tienen tamaños diferentes y representan epítomos antigénicos diferentes del CPS del serotipo 2. La elaboración de estos fragmentos (compuestos) comprende enfoques químicos y quimoenzimáticos.

[0012]Se sabe que el CPS consiste en un núcleo lineal (cadena principal), funcionalizado con dos motivos de cadena lateral diferentes. En formas de realización de la invención, los fragmentos comprenden solo el núcleo lineal. En otras formas de realización, los fragmentos comprenden solo uno de los dos motivos de cadena lateral. En formas de realización adicionales, los fragmentos comprenden una combinación del núcleo y uno de los dos motivos de cadena lateral. En formas de realización adicionales, los fragmentos comprenden una combinación del núcleo y los dos motivos de cadena lateral. En formas de realización adicionales, los fragmentos de acuerdo con la invención que contienen el núcleo lineal pueden comprender 1-3 o más unidades de repetición de este.

[0013]En formas de realización de la invención, cada fragmento se conjuga con una proteína portadora. Por ejemplo, se preparan conjugados de CRM197 y BSA. Como será entendido por una persona del oficio de nivel medio, pueden usarse otras proteínas portadoras adecuadas. Dichas proteínas incluyen, por ejemplo, proteínas de *S. suis*.

[0014]En formas de realización adicionales de la invención, se usa un adyuvante para preparar una formulación de vacuna. Por ejemplo, se usan TiterMax Gold® y Montanide ISA 61 VG como adyuvantes. Como será entendido por una persona

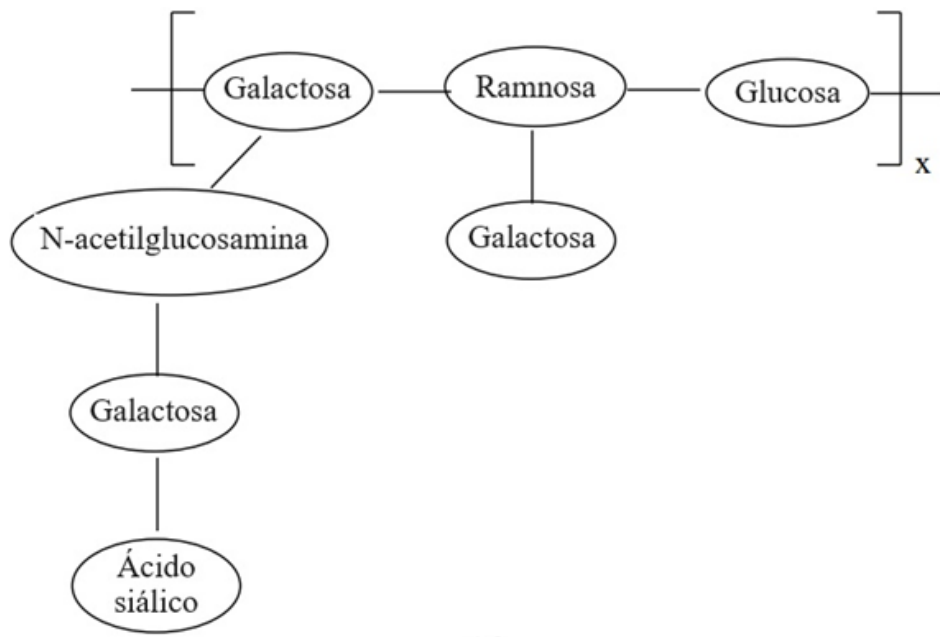
del oficio de nivel medio, pueden usarse otros adyuvantes adecuados.

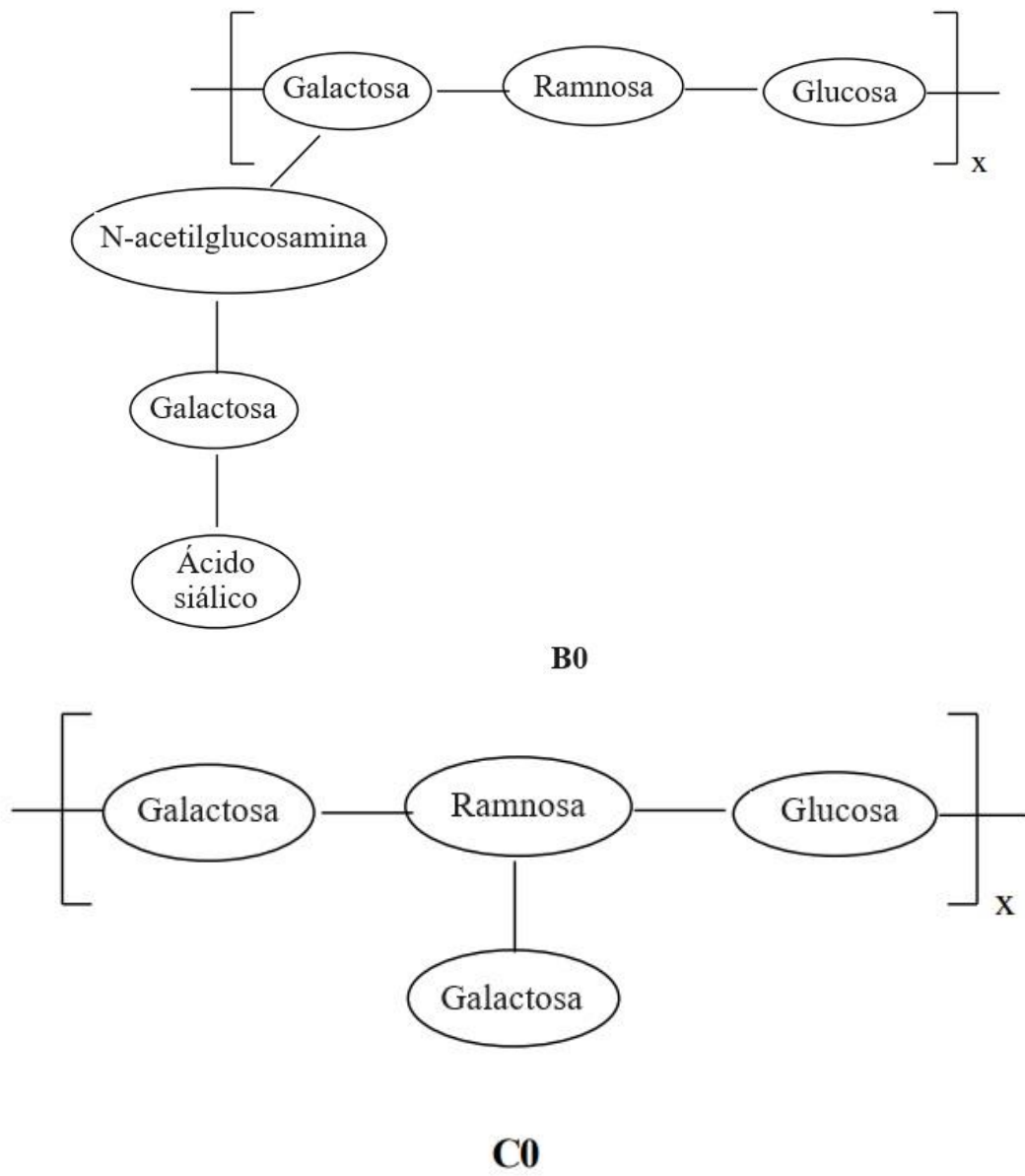
[0015] En formas de realización adicionales, la vacuna puede adaptarse para su uso contra otros serotipos de *S. suis*, que incluyen los serotipos 1, 1/2, 3, 9 y 14. Además, la vacuna puede adaptarse para su uso en humanos.

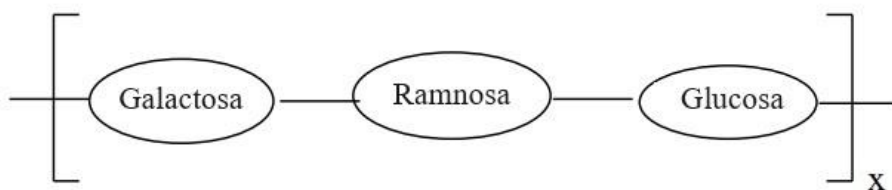
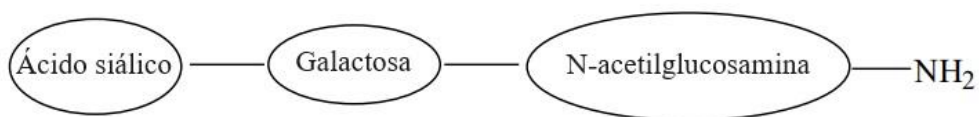
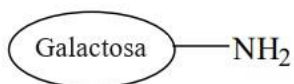
[0016] En formas de realización adicionales, se elabora una vacuna con un fragmento adicional como se describe en el documento de Zhang et al. [2].

[0017] Por lo tanto, la invención proporciona lo siguiente de acuerdo con los aspectos de esta:

(1) Un compuesto de fórmula general seleccionado del grupo que consiste en: **A0**, **B0**, **C0**, **D0**, **E0** y **F0** a continuación





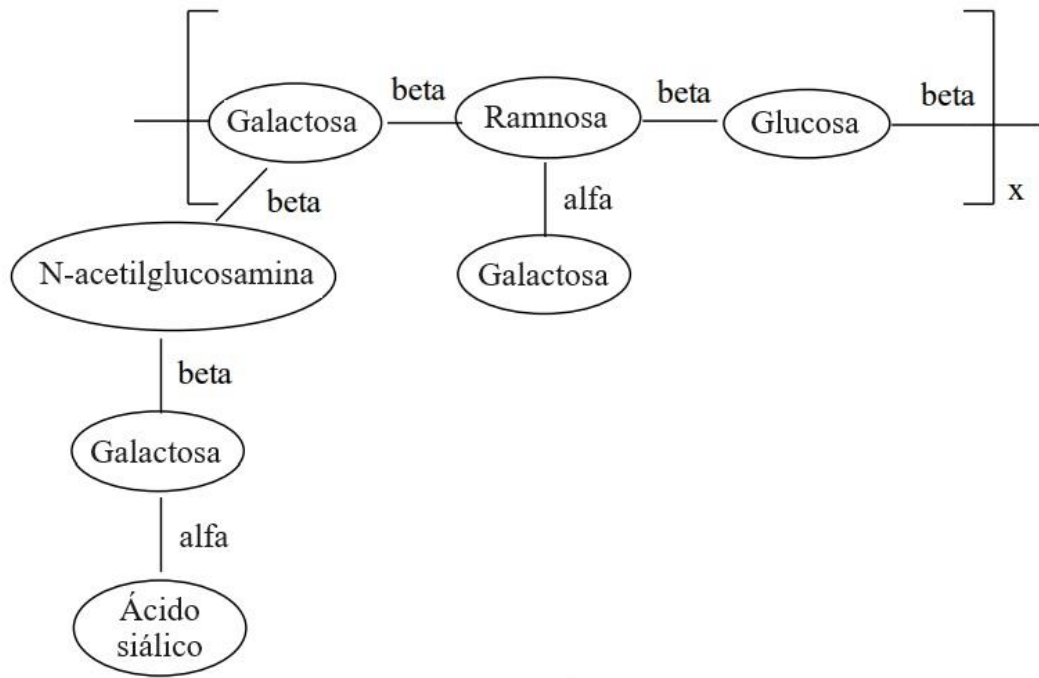
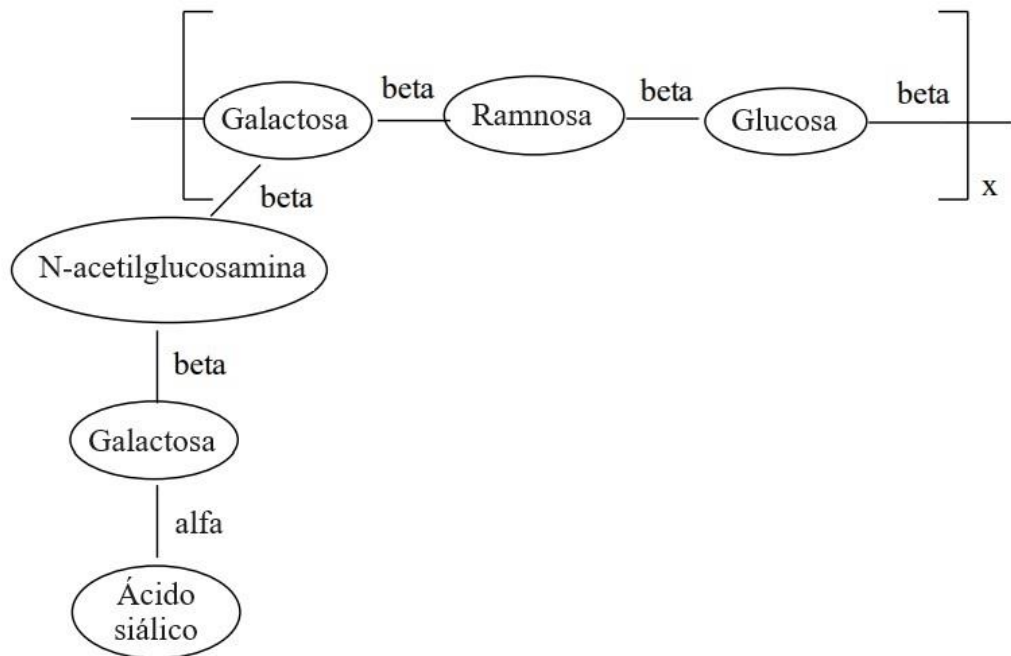
**D0****E0****F0**

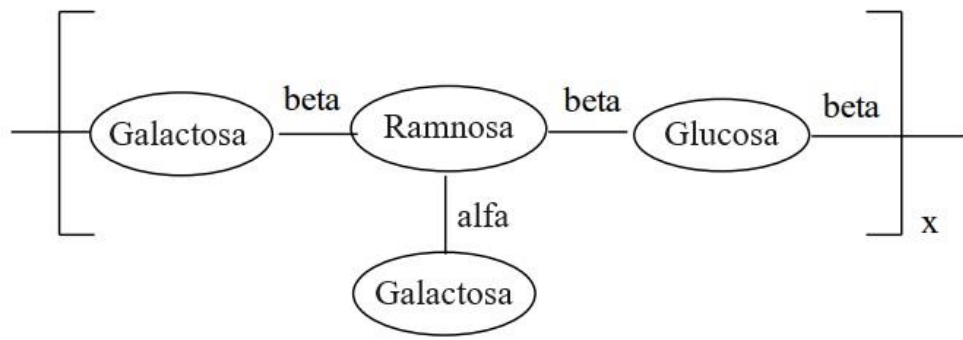
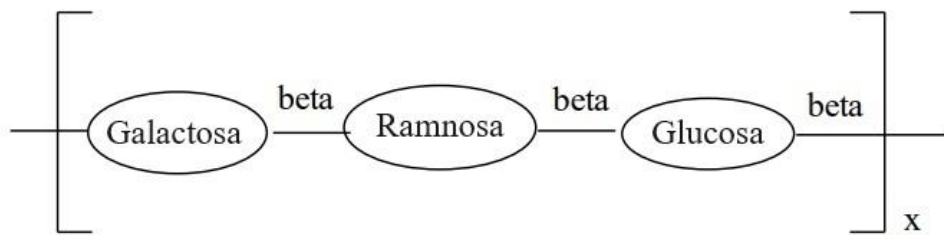
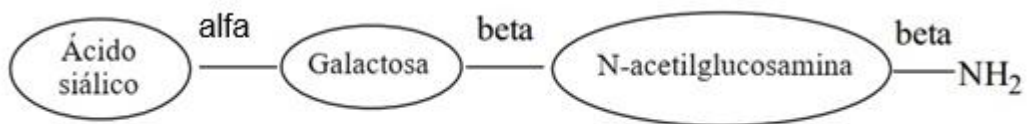
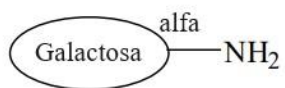
en donde:

x en **A0-D0** es un número entero seleccionado de 1 a 6; preferentemente x es un número entero seleccionado de 1 a 3; y

una unión entre porciones de azúcar consecutivas en el compuesto es α o β .

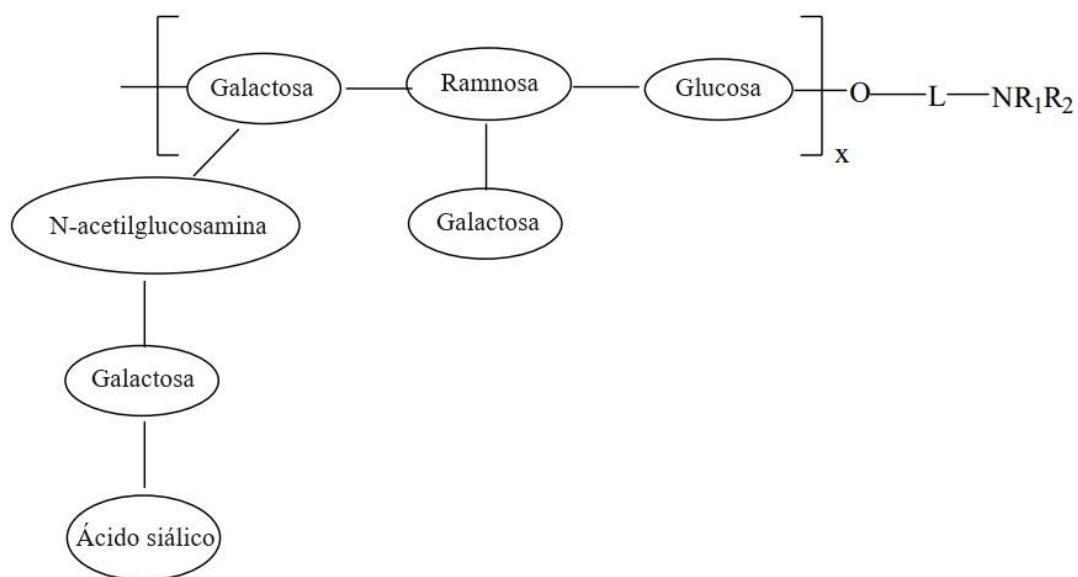
(2) Un compuesto de fórmula general seleccionado del grupo que consiste en: **A**, **B**, **C**, **D**, **E** y **F** a continuación

**A****B**

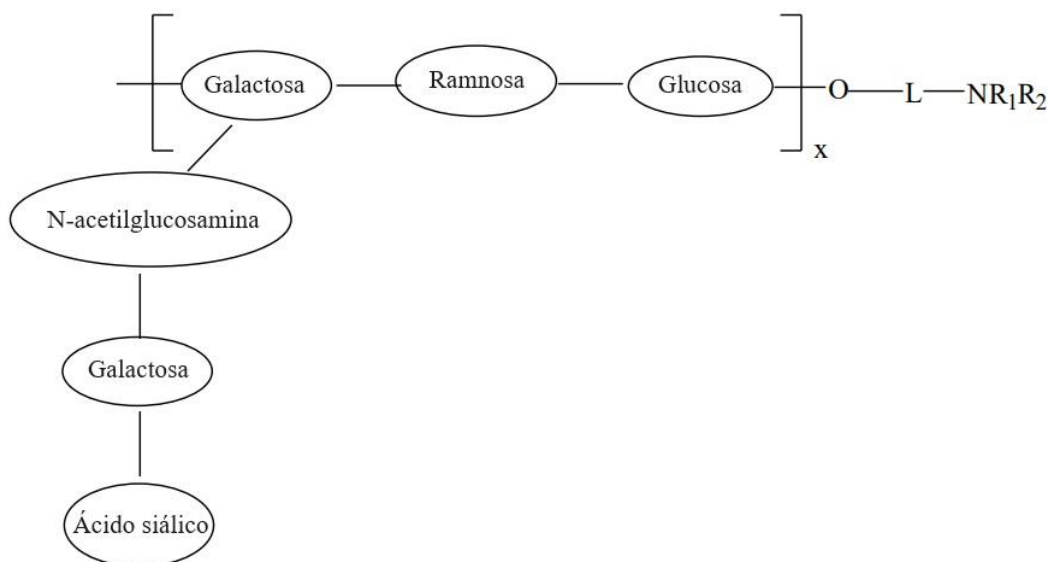
**C****D****E****F**

en donde x en **A-D** es un número entero seleccionado de 1 a 6; preferentemente x es un número entero seleccionado de 1 a 3.

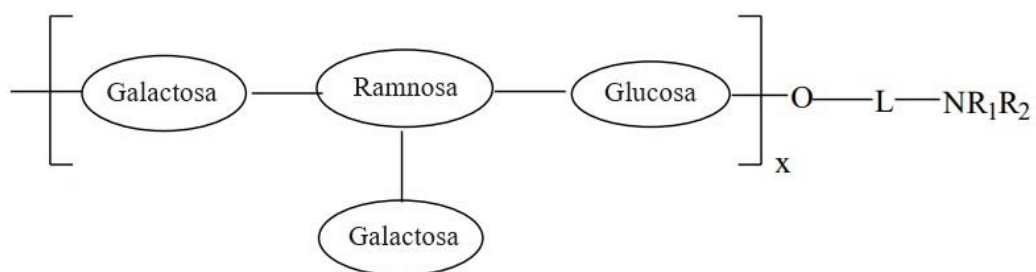
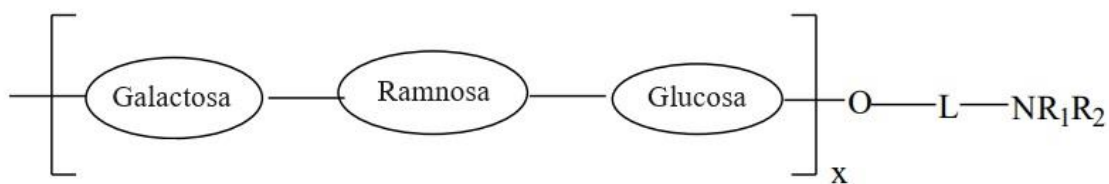
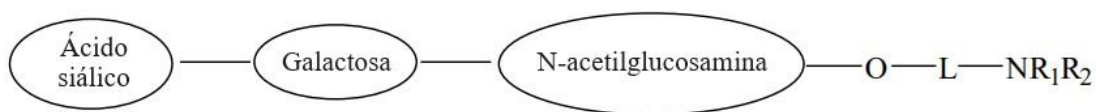
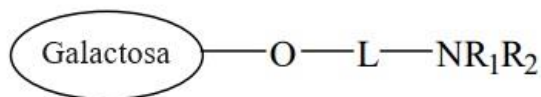
(3) Un compuesto de fórmula general seleccionado del grupo que consiste en: **A01**, **B01**, **C01**, **D01**, **E01** y **F01** a continuación



A01



B01

**C01****D01****E01****F01**

en donde:

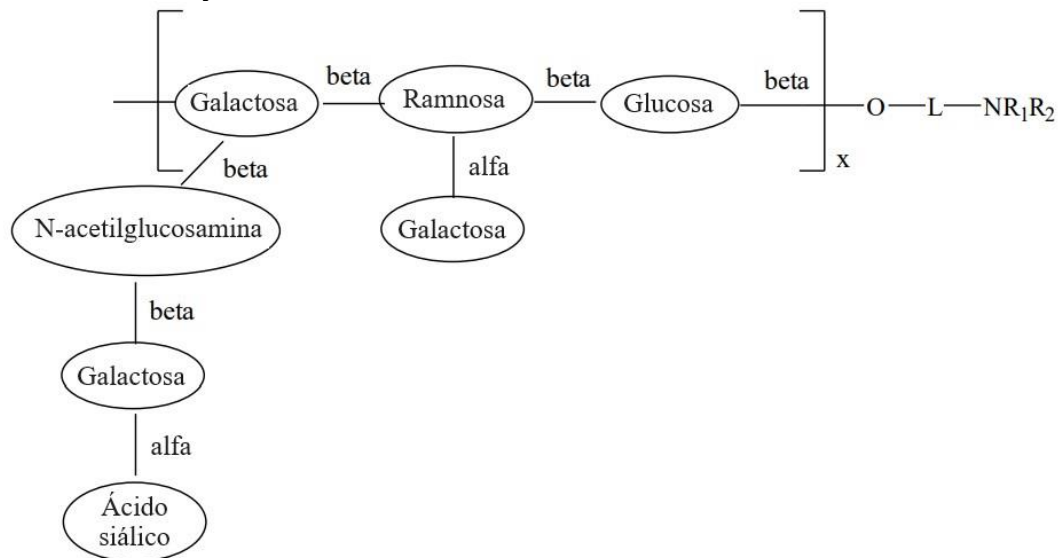
x en **A01-D01** es un número entero seleccionado de 1 a 6; preferentemente x es un número entero seleccionado de 1 a 3;

una unión entre porciones de azúcar consecutivas en el compuesto es α o β ;

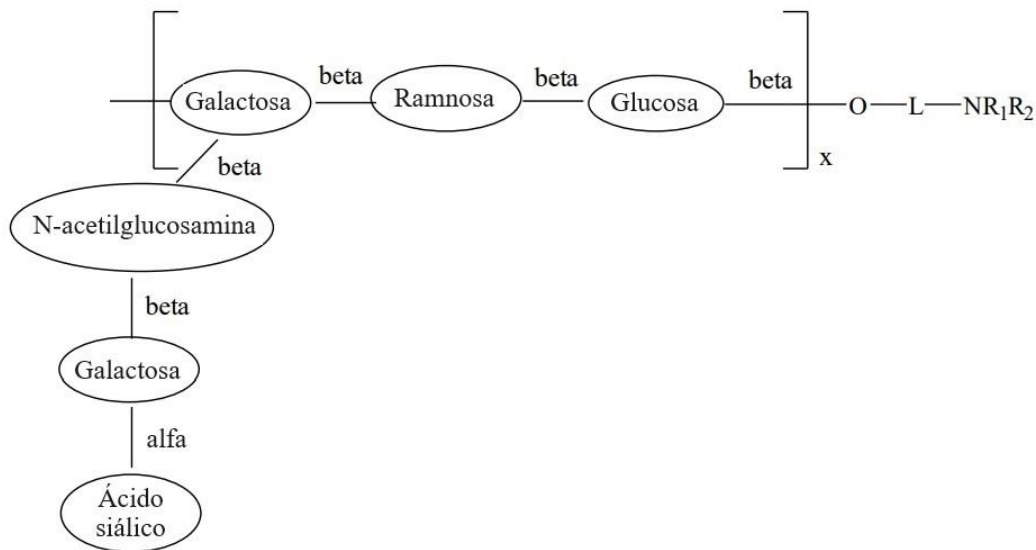
L es un alquilo C1 a C12 lineal, ramificado o cíclico; preferentemente L es un alquilo lineal; y

R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o un alquilo C1 a C6 lineal, ramificado o cíclico; o R₁ y R₂ juntos con N forman un anillo de 3 a 6 miembros.

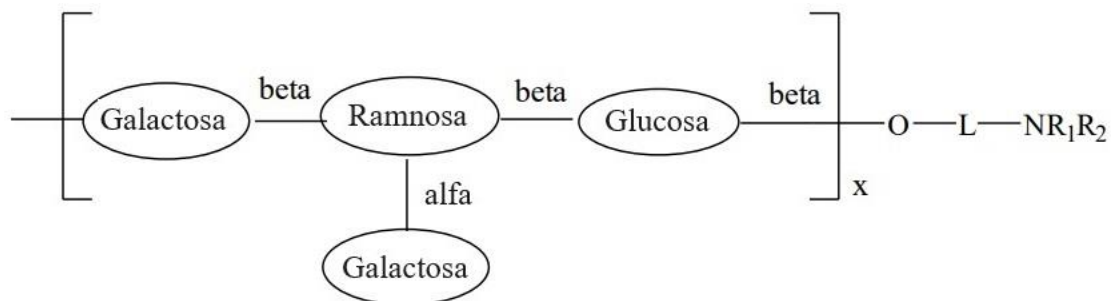
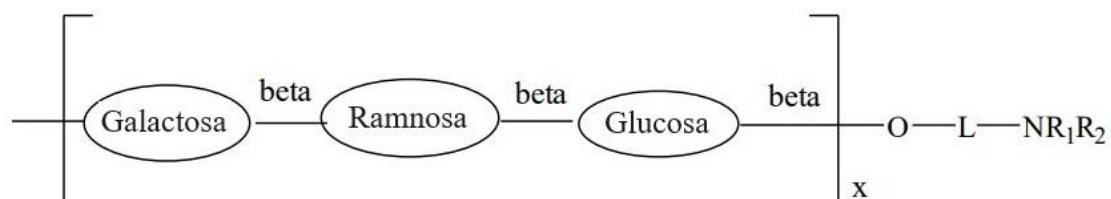
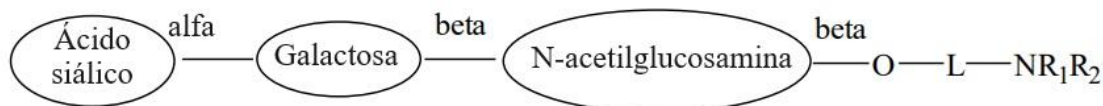
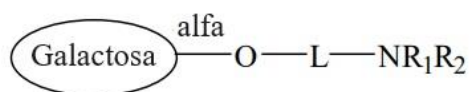
(4) Un compuesto de fórmula general seleccionado del grupo que consiste en: **A1**, **B1**, **C1**, **D1**, **E1** y **F1** a continuación



A1



B1

**C1****D1****E1****F1**

en donde:

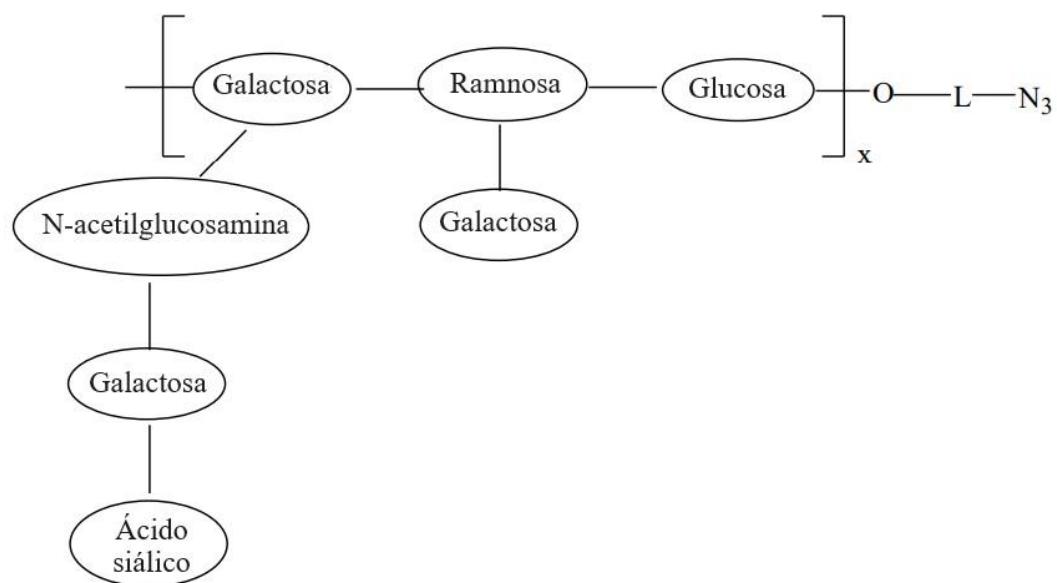
x en **A1-D1** es un número entero seleccionado de 1 a 6; preferentemente x es un número entero seleccionado de 1 a 3;

L es un alquilo C1 a C12 lineal, ramificado o cíclico; preferentemente L es un alquilo lineal; y

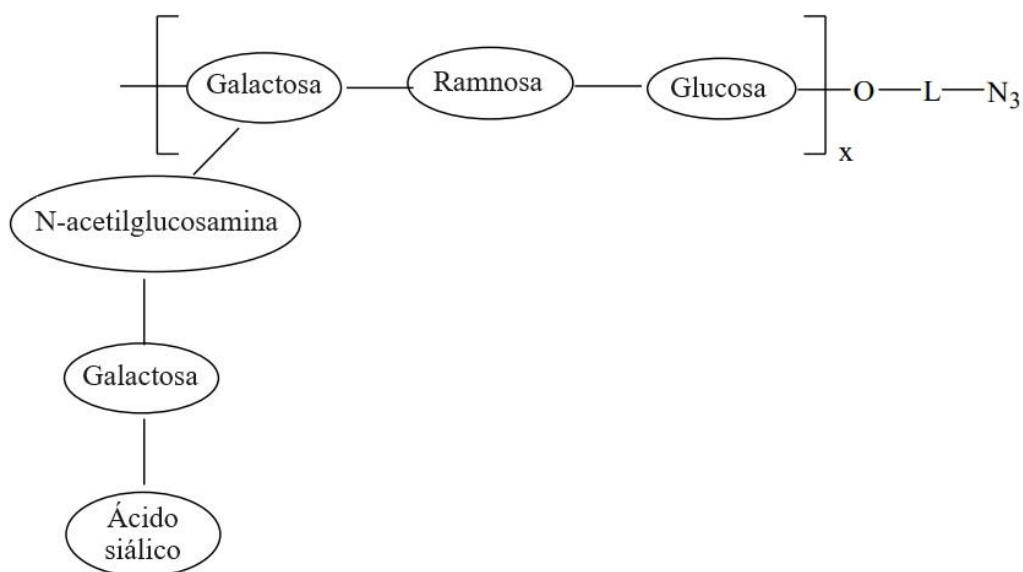
R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o un alquilo C1 a C6 lineal,

ramificado o cíclico; o R₁ y R₂ juntos con N forman un anillo de 3 a 6 miembros.

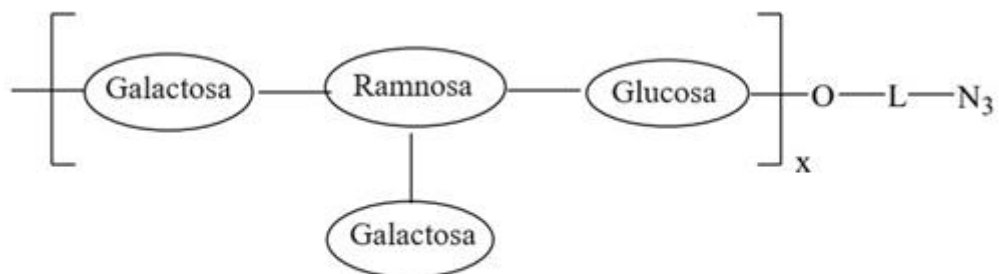
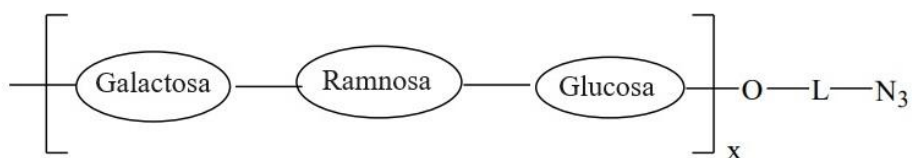
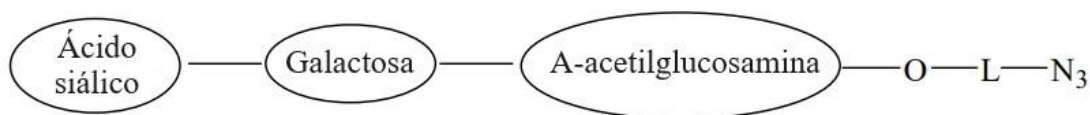
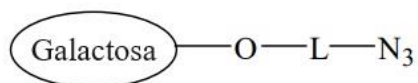
(5) Un compuesto de fórmula general seleccionado del grupo que consiste en: **A02**, **B02**, **C02**, **D02**, **E02** y **F02** a continuación



A02



B02

**C02****D02****E02****F02**

en donde:

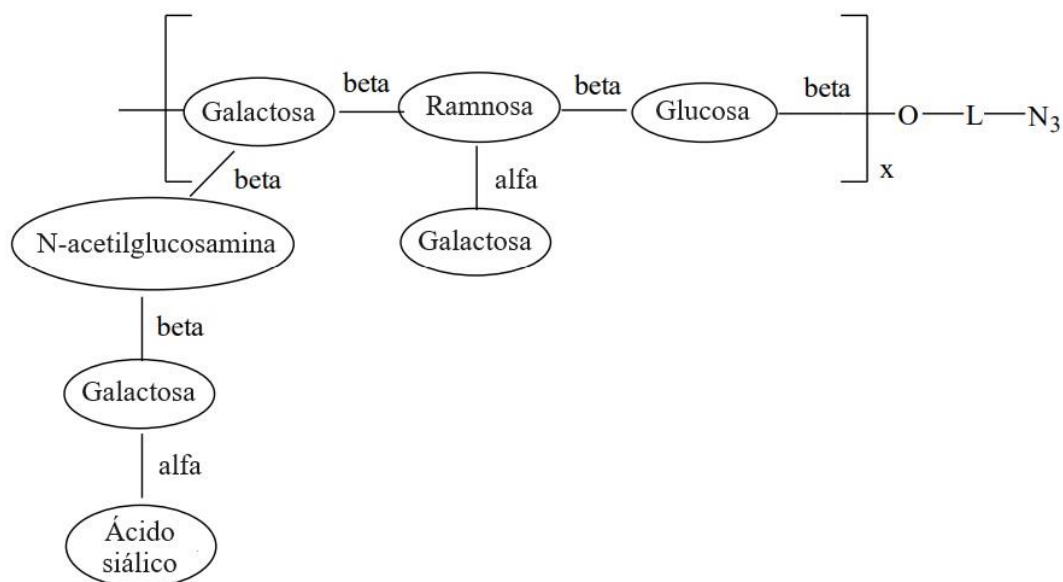
x en **A02-D02** es un número entero seleccionado de 1 a 6; preferentemente x es un número entero seleccionado de 1 a 3;

una unión entre porciones de azúcar consecutivas en el compuesto es α o β ;

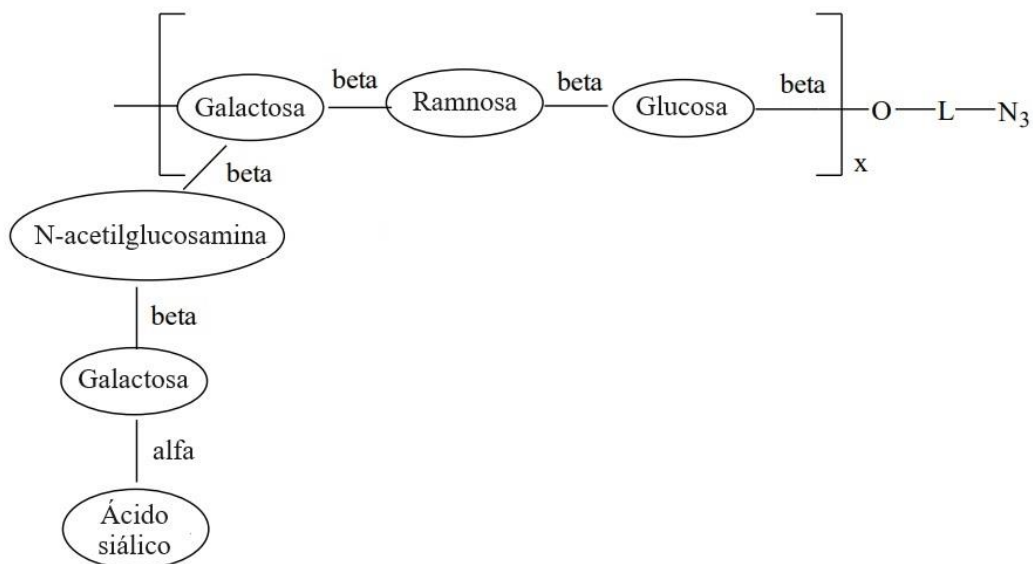
L es un alquilo C1 a C12 lineal, ramificado o cíclico; preferentemente L es un alquilo lineal; y

R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o un alquilo C1 a C6 lineal, ramificado o cíclico; o R₁ y R₂ juntos con N forman un anillo de 3 a 6 miembros.

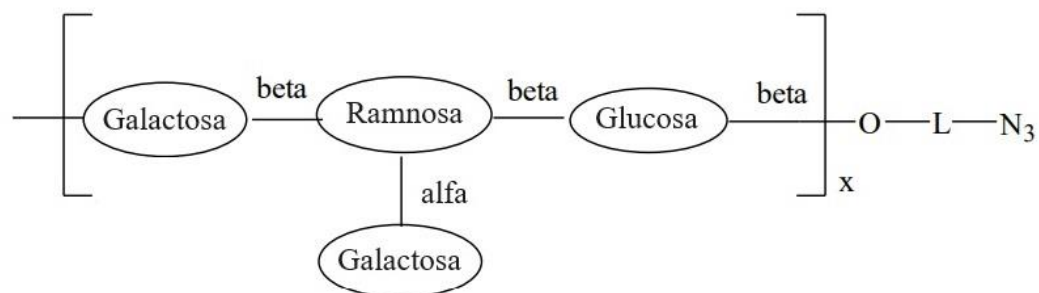
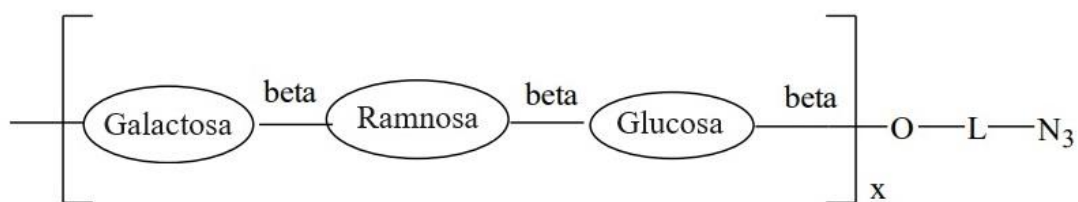
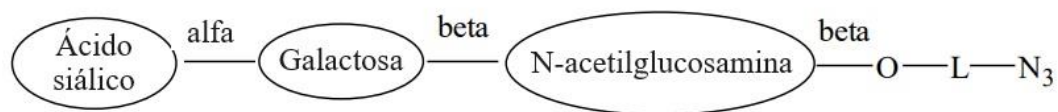
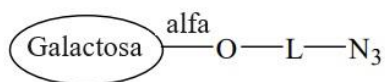
(6) Un compuesto de fórmula general seleccionado del grupo que consiste en: **A2**, **B2**, **C2**, **D2**, **E2** y **F2** a continuación



A2



B2

**C2****D2****E2****F2**

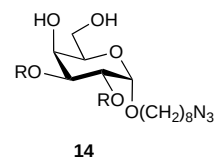
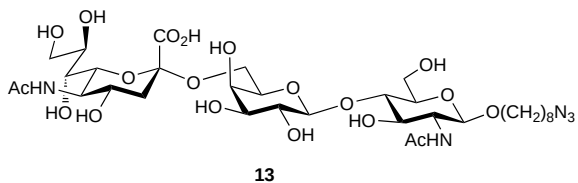
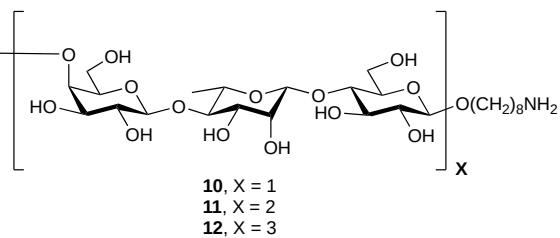
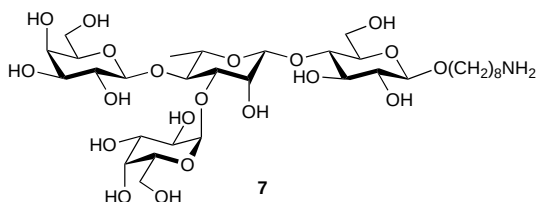
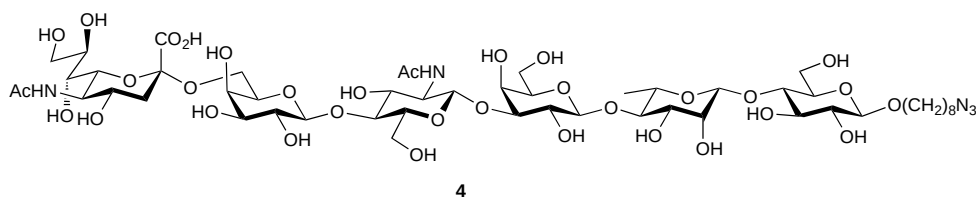
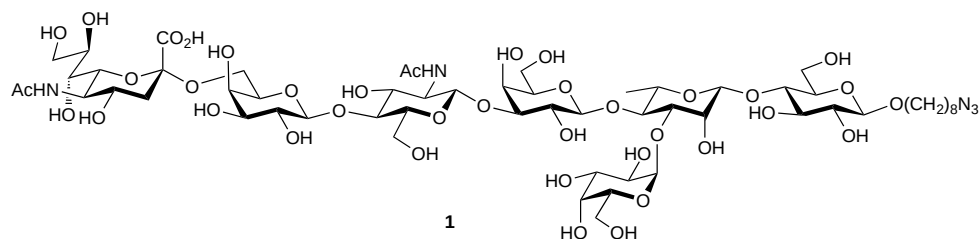
en donde:

x en **A2-D2** es un número entero seleccionado de 1 a 6; preferentemente x es un número entero seleccionado de 1 a 3; y

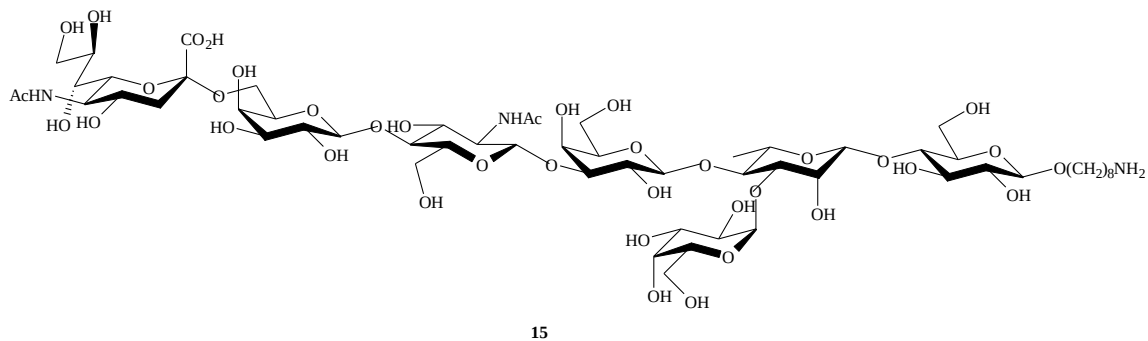
L es un alquilo C1 a C12 lineal, ramificado o cíclico; preferentemente L es un

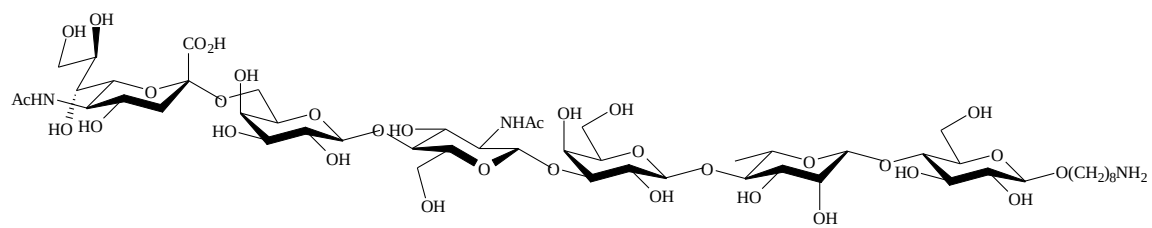
alquilo lineal.

(7) Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: **1**, **4**, **7** y **10-14** a continuación

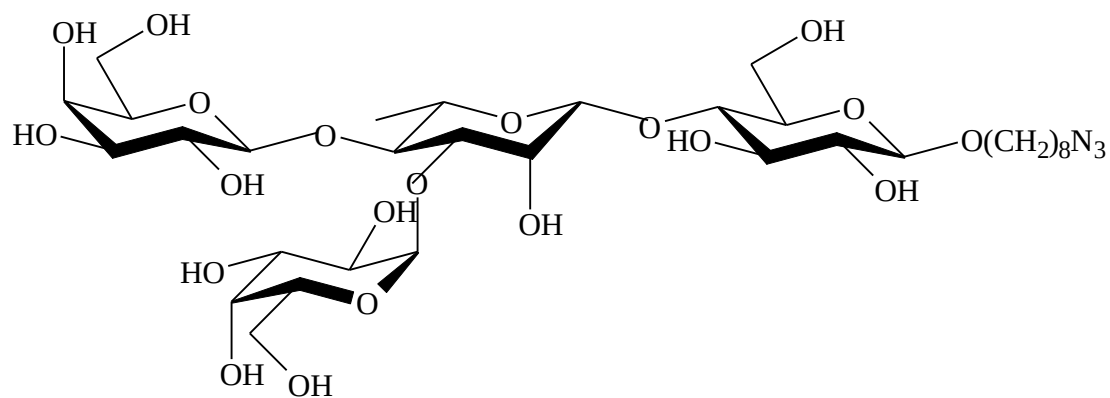


8. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: **15**, **16**, **17** y **18-22** a continuación

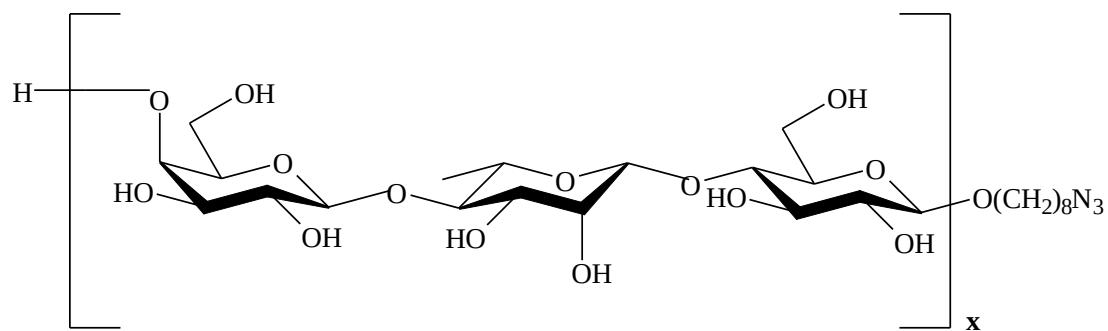




16



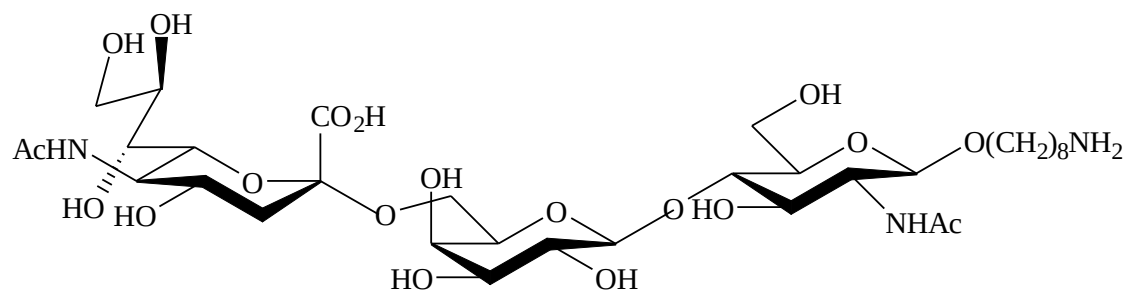
17



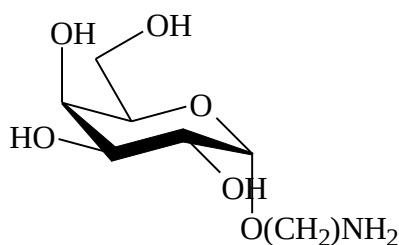
18, x = 1

19, x = 2

20, x = 3



21



22

(9) Un compuesto de acuerdo con cualquiera de (1) a (8) anteriores, el cual se prepara por un proceso que comprende: una síntesis química, una síntesis quimioenzimática, o una combinación de ambas síntesis química y síntesis quimioenzimática.

(10) Una vacuna de glucoconjugado que comprende un compuesto como se define en cualquiera de (1) a (8) anteriores, en donde el compuesto se conjuga con una proteína portadora; preferentemente la proteína portadora es CRM-197, BSA, una proteína de *Streptococcus suis* (*S. suis*) u otra proteína portadora adecuada.

(11) Una formulación de vacuna que comprende un compuesto como se define en cualquiera de (1) a (8) anteriores y un adyuvante; preferentemente el adyuvante es TiterMax Gold®, Montanide™ ISA 61 VG u otro adyuvante adecuado.

(12) Una formulación de vacuna que comprende una vacuna de glucoconjugado como se define en (10) anterior y un adyuvante; preferentemente el adyuvante es TiterMax Gold®, Montanide™ ISA 61 VG u otro adyuvante adecuado.

(13) Una formulación de vacuna de acuerdo con (11) o (12) anteriores, la cual está disponible comercialmente.

(14) Una formulación de vacuna de acuerdo con (11) a (13) anteriores, la cual se usa en la producción de ganado.

(15) Un proceso para preparar una vacuna de glucoconjugado como se define en (10) anterior o una formulación de vacuna como se define en cualquiera de (11) a (13) anteriores, el cual comprende: una síntesis química, una síntesis quimioenzimática, o una combinación tanto de síntesis química como de síntesis quimioenzimática.

(16) Un método para prevenir una enfermedad asociada a *Streptococcus suis* (*S. suis*) en un mamífero, en donde el método comprende administrar al mamífero un compuesto como se define en cualquiera de (1) a (8) anteriores, una vacuna de glucoconjugado como se define en (10) anterior, o una formulación de vacuna como se define en cualquiera de (11) a (13) anteriores; preferentemente la enfermedad está asociada a un serotipo de *S. suis* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 1/2, 2, 3, 9 y 14; con mayor preferencia la enfermedad está asociada al serotipo 2 de *S. suis*.

(17) El uso de un compuesto como se define en cualquiera de (1) a (8) anteriores, una vacuna de glucoconjugado como se define en (10) anterior, o una formulación de vacuna como se define en cualquiera de (11) a (13) anteriores, para prevenir una enfermedad asociada a *Streptococcus suis* (*S. suis*) en un mamífero;

preferentemente la enfermedad está asociada a un serotipo de *S. suis* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 1/2, 2, 3, 9 y 14; con mayor preferencia la enfermedad está asociada al serotipo 2 de *S. suis*.

(18) El uso de un compuesto como se define en cualquiera de (1) a (8) anteriores en la elaboración de una vacuna para prevenir una enfermedad asociada a *Streptococcus suis* (*S. suis*) en un mamífero; preferentemente la enfermedad está asociada a un serotipo de *S. suis* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 1/2, 2, 3, 9 y 14; con mayor preferencia la enfermedad está asociada al serotipo 2 de *S. suis*.

(19) El uso de un compuesto como se define en cualquiera de (1) a (8) anteriores, una vacuna de glucoconjugado como se define en (10) anterior, o una formulación de vacuna como se define en cualquiera de (11) a (13) anteriores, para su uso en la prevención de una enfermedad asociada a *Streptococcus suis* (*S. suis*) en un mamífero; preferentemente la enfermedad está asociada a un serotipo de *S. suis* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 1/2, 2, 3, 9 y 14; con mayor preferencia la enfermedad está asociada al serotipo 2 de *S. suis*.

(20) Un método o uso o compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de (16) a (19) anteriores, en donde el mamífero es humano o no humano.

[0018] Otros objetos, ventajas y características de la presente invención se volverán más evidentes tras la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de formas de realización específicas de aquella, dadas solo a modo de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019] El archivo de la solicitud o la patente contiene al menos un dibujo a color. La Oficina proporcionará copias de la presente patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color a solicitud y tras el pago de la tasa necesaria.

[0020] En los dibujos adjuntos:

[0021] Figura 1: Representación esquemática de dianas de fragmentos (antígenos) de polisacárido capsular (CPS) de acuerdo con la invención. Definiciones de monosacáridos: Círculo azul = glucosa; triángulo verde = ramnosa; círculos amarillos = galactosa; cuadrado azul = N-Acetilglucosamina; diamante violeta = ácido siálico.

[0022] Figura 2: Fragmentos CPS **1, 4, 7 y 10–14** de serotipo 2 de *Streptococcus suis*.

[0023] Figura 3: Respuesta de anticuerpos contra el correspondiente epítipo CPS sintetizado de ratones inmunizados con 25 µg de prototipo de conjugado **13** y prototipo de conjugado **14**, formulado con TiterMax Gold (1/1 vol.). Los ratones (n = 10 para cada grupo, puntos verdes) fueron inmunizados en el día 0 y recibieron un refuerzo en el día 14. Un grupo placebo de ratones (n = 5, puntos negros) recibió salina amortiguada por fosfatos (PBS) formulada con el mismo adyuvante. Se recubrieron placas de ensayo inmune ligado a enzimas (ELISA) con el correspondiente prototipo sintetizado conjugado con una proteína portadora de albúmina de suero bobino (BSA) y se incubaron con muestras de suero para medir los anticuerpos contra el epítipo CPS sintetizado. Los niveles de anticuerpos totales (IgG más IgM) contra el correspondiente epítipo CPS sintetizado se

muestran para cada ratón (un punto) con barras horizontales que representan el medio ($\pm$ SEM) de los valores de título. La significancia estadística es: *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$.

[0024]Figura 4: Respuesta de anticuerpos contra el correspondiente epítipo CPS sintetizado de ratones inmunizados con 25 μ g de prototipo de conjugado **7** y prototipo de conjugado **10**, formulado con TiterMax Gold (1/1 vol.). Los ratones ($n = 10$ para cada grupo, puntos verdes) fueron inmunizados en el día 0 y recibieron un refuerzo en el día 14. Un grupo placebo de ratones ($n = 5$, puntos negros) recibió PBS formulada con el mismo adyuvante. También se incluyeron ratones sin tratamiento ($n = 5$, puntos blancos). Se recubrieron placas ELISA con el correspondiente prototipo sintetizado conjugado con una proteína portadora BSA y se incubaron con muestras de suero para medir los anticuerpos contra el epítipo CPS sintetizado. Los niveles de anticuerpos totales (IgG más IgM) contra el correspondiente epítipo CPS sintetizado se muestran para cada ratón (un punto) con barras horizontales que representan el medio ($\pm$ SEM) de los valores de título. La significancia estadística es: *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$.

[0025]Figura 5: Respuesta de anticuerpos contra el correspondiente epítipo CPS sintetizado de ratones inmunizados con 25 μ g de prototipo de conjugado **1** y prototipo de conjugado **4**, formulado con TiterMax Gold (1/1 vol.). Los ratones ($n = 10$ para cada grupo, puntos verdes) fueron inmunizados en el día 0 y recibieron un refuerzo en el día 14. Un grupo placebo de ratones ($n = 5$, puntos negros) recibió PBS formulada con el mismo adyuvante. También se incluyeron ratones sin tratamiento ($n = 5$, puntos blancos). Se recubrieron placas ELISA con el correspondiente prototipo sintetizado conjugado con una proteína portadora BSA y se incubaron con muestras de suero para medir los anticuerpos contra el epítipo CPS sintetizado. Los niveles de anticuerpos totales (IgG más IgM) contra el correspondiente epítipo CPS sintetizado se muestran para cada ratón (un punto) con barras horizontales que representan el medio ($\pm$ SEM) de los valores de título. La significancia estadística es: **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$. D: significa "día".

[0026]Figura 6: Respuesta de anticuerpos contra el CPS purificado nativo (serotipo 2 de *S. suis*) de ratones inmunizados con 25 μ g de prototipo de conjugado **13** y prototipo de conjugado **14**, formulado con TiterMax Gold (1/1 vol.). Los ratones ($n = 10$ para cada grupo, puntos verdes) fueron inmunizados en el día 0 y recibieron un refuerzo en el día 14. Un grupo placebo de ratones ($n = 5$, puntos negros) recibió PBS formulada con el mismo adyuvante. Se recubrieron placas ELISA con CPS nativo (serotipo 2) y se incubaron con muestras de suero para medir los anticuerpos contra CPS. Los niveles de anticuerpos totales (IgG más IgM) contra CPS nativo purificado se muestran para cada ratón (un punto) con barras horizontales que representan el medio ($\pm$ SEM) de los valores de título. La significancia estadística es: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$. D: significa "día".

[0027]Figura 7: Respuesta de anticuerpos contra el CPS purificado nativo (serotipo 2 de *S. suis*) de ratones inmunizados con 25 μ g de prototipo de conjugado **7** y prototipo de conjugado **10**, formulado con TiterMax Gold (1/1 vol.). Los ratones ($n = 10$ para cada grupo) fueron inmunizados en el día 0 y recibieron un refuerzo en el día 14. Un grupo placebo de ratones ($n = 5$) recibió PBS

formulada con el mismo adyuvante. También se incluyeron ratones sin tratamiento ($n = 5$). Se recubrieron placas ELISA con CPS nativo (serotipo 2) y se incubaron con muestras de suero para medir los anticuerpos contra CPS. Los niveles de anticuerpos totales (IgG más IgM) contra CPS nativo purificado se muestran para cada ratón (un punto) con barras horizontales que representan el medio ($\pm$ SEM) de los valores de título. La significancia estadística es: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$. D: significa “día”.

[0028]Figura 8: Respuesta de anticuerpos contra el CPS purificado nativo (serotipo 2 de *S. suis*) de ratones inmunizados con 25 μ g de prototipo de conjugado **1** y prototipo de conjugado **4**, formulado con TiterMax Gold (1/1 vol.). Los ratones ($n = 10$ para cada grupo) fueron inmunizados en el día 0 y recibieron un refuerzo en el día 14. Un grupo placebo de ratones ($n = 5$) recibió PBS formulada con el mismo adyuvante. También se incluyeron ratones sin tratamiento ($n = 5$). Se recubrieron placas ELISA con CPS nativo (serotipo 2) y se incubaron con muestras de suero para medir los anticuerpos contra CPS. Los niveles de anticuerpos totales (IgG más IgM) contra CPS nativo purificado se muestran para cada ratón (un punto) con barras horizontales que representan el medio ($\pm$ SEM) de los valores de título. La significancia estadística es: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$. D: significa “día”.

[0029]Figura 9: Respuesta de anticuerpos contra el correspondiente epítipo CPS sintetizado de cerdos inmunizados con el prototipo de conjugado **1**, **4**, **7**, **10**, **11** o **12**, formulado con Montanide ISA 61 VG. La inmunización se llevó a cabo con dos dosis en un intervalo de 14 días. Se asignaron cerdos de tres semanas de edad a un grupo placebo ($n = 10$) o a un grupo de vacuna ($n = 10$). La primera dosis de la vacuna y su correspondiente adyuvante placebo se administraron intramuscularmente a las tres semanas de edad, y la segunda dosis, dos semanas después. Se recubrieron placas ELISA con el correspondiente prototipo sintetizado conjugado con una proteína portadora BSA y se incubaron con muestras de suero (Día 25) para medir los anticuerpos contra el CPS sintetizado. Los niveles de anticuerpos totales Ig (IgG + IgM), IgM, IgG1, e IgG2 se muestran para cada cerdo (un punto) con barras horizontales que representan el medio ($\pm$ SEM) de los valores de título. La significancia estadística vs. placebo es: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

[0030]Figura 10: Puntuación clínica de los cerdos vacunados con el conjugado **1**, **4**, **7**, **10**, **11**, o **12**, formulado con Montanide ISA 61 VG. La inmunización se llevó a cabo con dos dosis en un intervalo de 14 días. Se asignaron cerdos de tres semanas de edad a un grupo placebo ($n = 10$) o a un grupo de vacuna ($n = 10$). La primera dosis de la vacuna y su correspondiente adyuvante placebo se administraron intramuscularmente a las tres semanas de edad, y la segunda dosis, dos semanas después. La exposición con 6 ml de $1,6 \times 10^9$ CFU/ml de serotipo 2 de *S. suis*, cepa P1/7, se realizó de manera intraperitoneal a los 11 días después de la segunda dosis de vacuna. Los signos clínicos se monitorearon dos a tres veces por día por hasta diez días. La significancia estadística vs. placebo: *, $P < 0,05$. CNS: sistema nervioso central.

[0031]Figura 11: Índice de supervivencia de los cerdos vacunados con el

conjugado **1, 4, 7, 10, 11, o 12**, formulado con Montanide ISA 61 VG. La inmunización se llevó a cabo con dos dosis en un intervalo de 14 días. Se asignaron cerdos de tres semanas de edad a un grupo placebo (n = 10) o a un grupo de vacuna (n = 10). La primera dosis de la vacuna y su correspondiente adyuvante placebo se administraron intramuscularmente a las tres semanas de edad, y la segunda dosis, dos semanas después. La exposición con 6 ml de $1,6 \times 10^9$ CFU/ml de serotipo 2 de *S. suis*, cepa P1/7, se realizó de manera intraperitoneal a los 11 días después de la segunda dosis de vacuna. Los signos clínicos se monitorearon dos a tres veces por día por hasta diez días. La significancia estadística vs. placebo: *, $P < 0,05$.

[0032]Figura 12: Inmunización de cerdos con un “fragmento adicional” como propone Zhang et al. [2] y conjugado con CRM197. La inmunización se llevó a cabo con dos dosis (formuladas con Montanide ISA 61 VG) en un intervalo de 14 días. Se asignaron cerdos de tres semanas de edad a un grupo placebo (n = 15) o a un grupo de vacuna (n = 15). La primera dosis de la vacuna y su correspondiente adyuvante placebo se administraron intramuscularmente a las tres semanas de edad, y la segunda dosis, dos semanas después. La exposición con 6 ml de $1,6 \times 10^9$ CFU/ml de serotipo 2 de *S. suis*, cepa P1/7, se realizó de manera intraperitoneal a los 11 días después de la segunda dosis de vacuna. Los signos clínicos se monitorearon dos a tres veces por día por hasta diez días. **A)** Esquema del “fragmento adicional”. **B)** Respuesta de anticuerpos contra el correspondiente epítipo CPS sintetizado de cerdos inmunizados con el “fragmento adicional” conjugado. Se recubrieron placas ELISA con el correspondiente fragmento sintetizado conjugado con una proteína portadora BSA y se incubaron con muestras de suero para medir los anticuerpos contra el CPS sintetizado. Los niveles de anticuerpos totales Ig (IgG + IgM) se muestran para cada cerdo (un punto) con barras horizontales que representan el medio ($\pm$ SEM) de los valores de título. La significancia estadística vs. placebo es: *, $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$. D: significa “día”. **C)** Índice de supervivencia de cerdos vacunados con el “fragmento adicional” conjugado, formulado con Montanide ISA 61 VG.

DESCRIPCIÓN DE FORMAS DE REALIZACIÓN ILUSTRATIVAS

[0033] Antes de seguir describiendo la presente invención, se debe entender que la invención no se limita a las formas de realización descritas más adelante, ya que pueden realizarse variaciones de estas formas de realización y aun así estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Asimismo, debe entenderse que la terminología que se usa tiene como finalidad describir formas de realización particulares y no pretende ser limitativa. En su lugar, el alcance de la presente invención será establecido por las reivindicaciones adjuntas.

[0034] Para proporcionar una comprensión clara y consistente de los términos que se usan en la presente memoria descriptiva, se proporciona una cantidad de definiciones a continuación. Adicionalmente, a menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona del oficio de nivel medio al que pertenece esta divulgación.

[0035] El uso de la palabra “un” o “una” cuando se utiliza junto con el término “que

comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero es consistente además con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". Similarmente, la palabra "otro" y "otra" pueden significar al menos una segunda instancia o más.

[0036] Tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprende" y "comprenden"), "que tiene" (y cualquier forma de tener tal como "tiene" y "tienen"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir tal como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos o etapas de procesos adicionales y no mencionados.

[0037] Los términos "compuesto", "fragmento", "prototipo de conjugado" y "prototipo" se usan de manera intercambiable para referirse a los compuestos de acuerdo con la invención.

[0038] Los términos "cerdo" y "porcino" se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva.

[0039] Los inventores han diseñado y preparado una vacuna de glucoconjugado sintético que comprende un fragmento del polisacárido capsular (CPS) del serotipo 2. El fragmento se selecciona entre fragmentos de acuerdo con la invención, los cuales tienen tamaños diferentes y representan epítomos antigénicos diferentes del CPS del serotipo 2. La elaboración de los fragmentos (compuestos) comprende enfoques químicos y quimoenzimáticos.

[0040] Se sabe que el CPS consiste en un núcleo lineal (cadena principal), funcionalizado con dos motivos de cadena lateral diferentes. En formas de realización de la invención, los fragmentos comprenden solo el núcleo lineal. En otras formas de realización, los fragmentos comprenden solo uno de los dos motivos de cadena lateral. En formas de realización adicionales, los fragmentos comprenden una combinación del núcleo y uno de los dos motivos de cadena lateral. En formas de realización adicionales, los fragmentos comprenden una combinación del núcleo y los dos motivos de cadena lateral. En formas de realización adicionales, los fragmentos de acuerdo con la invención que contienen el núcleo lineal pueden comprender 1-3 o más unidades de repetición de este. En formas de realización adicionales, se sintetiza un fragmento adicional en función del documento de Zhang et al. [2], en particular, el fragmento número 4 de este.

[0041] En formas de realización de la invención, cada fragmento se conjuga con una proteína portadora. Por ejemplo, se preparan conjugados de CRM197 y BSA. Como será entendido por una persona del oficio de nivel medio, pueden usarse otras proteínas portadoras adecuadas. Dichas proteínas incluyen, por ejemplo, proteínas de *S. suis*.

[0042] En formas de realización adicionales de la invención, se usa un adyuvante para preparar una formulación de vacuna. Por ejemplo, se usan TiterMax Gold® y Montanide ISA 61 VG como adyuvantes. Como será entendido por una persona del oficio de nivel medio, pueden usarse otros adyuvantes adecuados.

[0043] En formas de realización adicionales, la vacuna puede adaptarse para su uso contra otros serotipos de *S. suis*, que incluyen los serotipos 1, 1/2, 3, 9 y 14.

Además, la vacuna puede adaptarse para su uso en humanos.

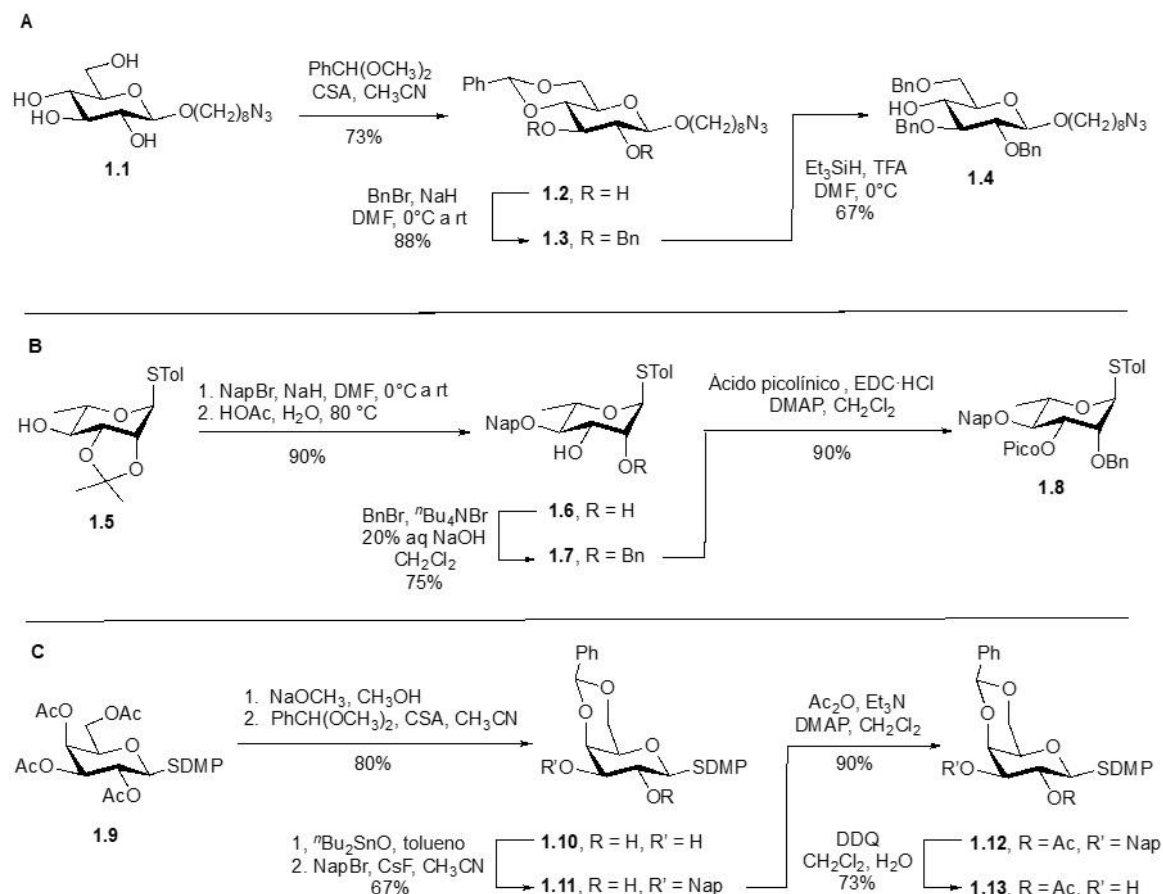
[0044]La siguiente es una descripción de las formas de realización preferidas de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de fragmentos definidos estructuralmente del polisacárido capsular (CPS) de *S. suis* por medio de química sintética.

[0045]Una representación esquemática de las dianas de fragmentos (antígenos) CPS se ilustra en la **Figura 1**. Se seleccionaron para síntesis ocho fragmentos del CPS de serotipo 2 de *S. suis*, que varían en tamaño desde un monosacárido a un heptasacárido (**1**, **4**, **7** y **10-14**, **Figura 2**). Estos ocho compuestos se prepararon con un ligador 8-azidooctilo (o 8-aminooctilo) para facilitar su conjugación con proteínas como se requiere para provocar una respuesta inmune robusta.

[0046]**Síntesis de 1.** La síntesis de **1** se proporciona en los **Esquemas 1-3** más adelante. Primero fue necesario preparar tres monosacáridos (**1.4**; **1.8** y **1.13**; **Esquema 1**). La síntesis de **1.4** (**Esquema 1A**) comenzó con el monosacárido **1.1** conocido [3], el cual se convirtió en diol **1.2** en un 73 % de rendimiento al tratarse con acetal de dimetilo de benzaldehído y ácido camforsulfónico. Los dos grupos hidroxilo en **1.2** luego fueron bencilados con bromuro de bencilo e hidruro de sodio, lo que proporcionó **1.3** en un 88 % de rendimiento. La abertura de anillo reductiva regioselectiva del anillo de acetal de bencilideno en **1.3** al reaccionarse con trietilsilano y ácido trifluoracético produjo un 67 % de rendimiento de alcohol **1.4**.



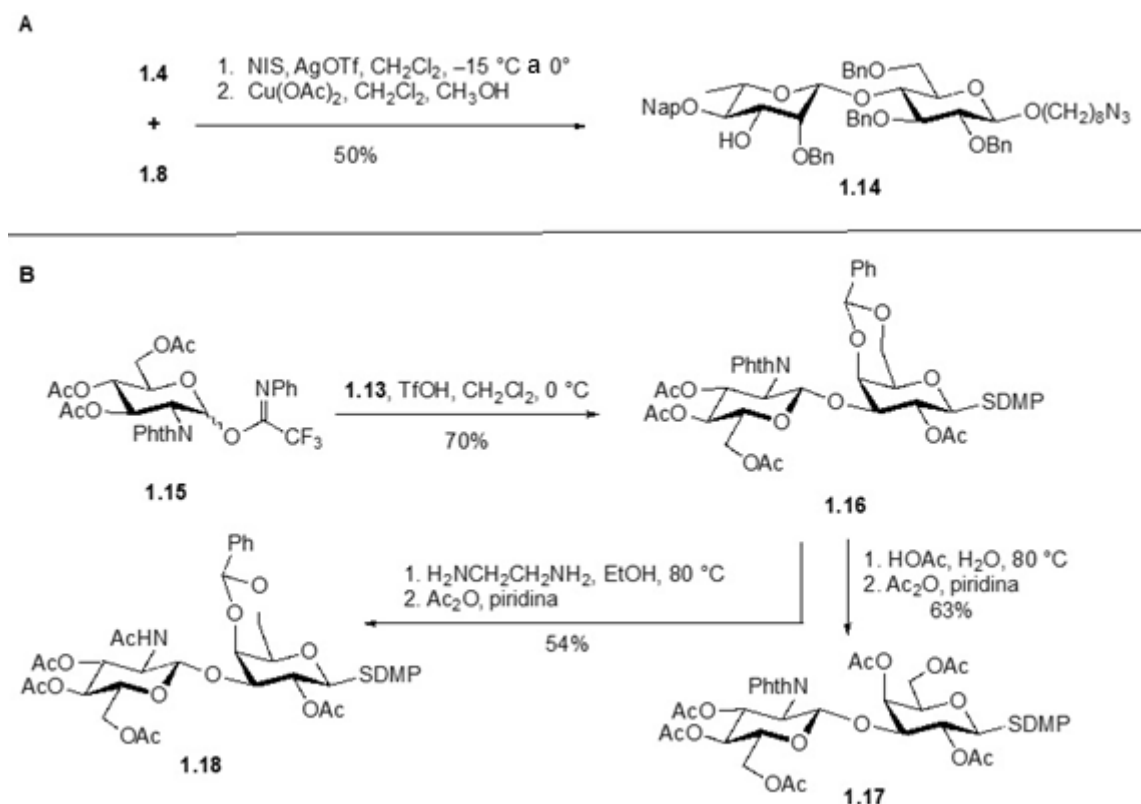
Esquema 1. Síntesis de **1.4**, **1.8** y **1.13**. Abreviaturas: Ac = acetilo; AcOH = ácido acético; Bn = bencilo; ^nBu = *n*-butilo; CSA = ácido camforsulfónico; DDQ = 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona; DMAP = 4-dimetilaminopiridina; DMF = dimetilformamida; DMP = 2,6-dimetilfenilo; EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; Et = etilo; Nap = 2-naftilmetilo; Pico = picolilo; Ph = fenilo; TFA = ácido trifluoroacético; Tol = 4-tolulilo (4-metilfenilo).

[0047] La síntesis de **1.8** (**Esquema 1B**) comenzó con el tioglicósido **1.5** conocido [4], el cual, al reaccionarse con bromuro de 2-naftilmetilo e hidruro de sodio, y la subsecuente hidrólisis del cetal de isopropilideno, produjo un 90 % de diol **1.6**. El grupo hidroxil C-2 se bencilató selectivamente en condiciones de transición de fase [5], lo que proporcionó un 75 % de rendimiento total de **1.7**. Se logró la instalación de un grupo picolilo, en 90 % de rendimiento, por esterificación de Steglich, con el uso de ácido picolínico y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.

[0048] El tioglicósido de 2,6-dimetilfenil **1.9** [6] que se informó previamente sirvió como material de partida para la preparación de **1.13** (**Esquema 1C**). La eliminación de los grupos acetilo por medio del uso de metóxido de sodio y el tratamiento del producto resultante con acetal de dimetilo de benzaldehído y ácido camforsulfónico proporcionó acetal **1.10** en 80 % de rendimiento. El grupo hidroxilo C-3 en **1.10** se protegió selectivamente como un éter de naftilmetilo por

medio de la formación de un acetal de estannilideno intermediario que se trató con bromuro de 2-naftilmetilo. El producto, **1.11**, se formó en 67 % de rendimiento a lo largo de las dos etapas. La acetilación del grupo hidroxilo restante con anhídrido acético y piridina procedió en un 90 % de rendimiento a producir **1.12**. La escisión del éter de naftilmetilo al tratarse con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona en una mezcla de agua y diclorometano proporcionó **1.13** en 73 % de rendimiento.

[0049] Con estos monosacáridos a mano, se usaron para ensamblar tres bloques de construcción de disacárido, **1.14**, **1.17** y **1.18**, como se ilustran en el **Esquema 2**. El disacárido **1.14** se preparó como se muestra en el **Esquema 2A**. La glicosilación de **1.4** con **1.8** se llevó a cabo bajo la promoción de *N*-yodosuccinimida y triflato de plata, en donde se comenzó la reacción a -15 °C y se calentó hasta 0 °C. Luego de la reacción, la separación de los isómeros α/β del disacárido fue problemática; por ende, se llevó la mezcla a la siguiente etapa. Por lo tanto, el intermediario se trató con acetato de cobre en diclorometano y metanol para escindir el éster de picolilo. El producto esperado, **1.14**, se obtuvo en 50 % de rendimiento a lo largo de las dos etapas. El $^1J_{C1,H1}$ del residuo de ramnosa fue de 159,4 Hz, lo que confirmó la β -estereoquímica [7].

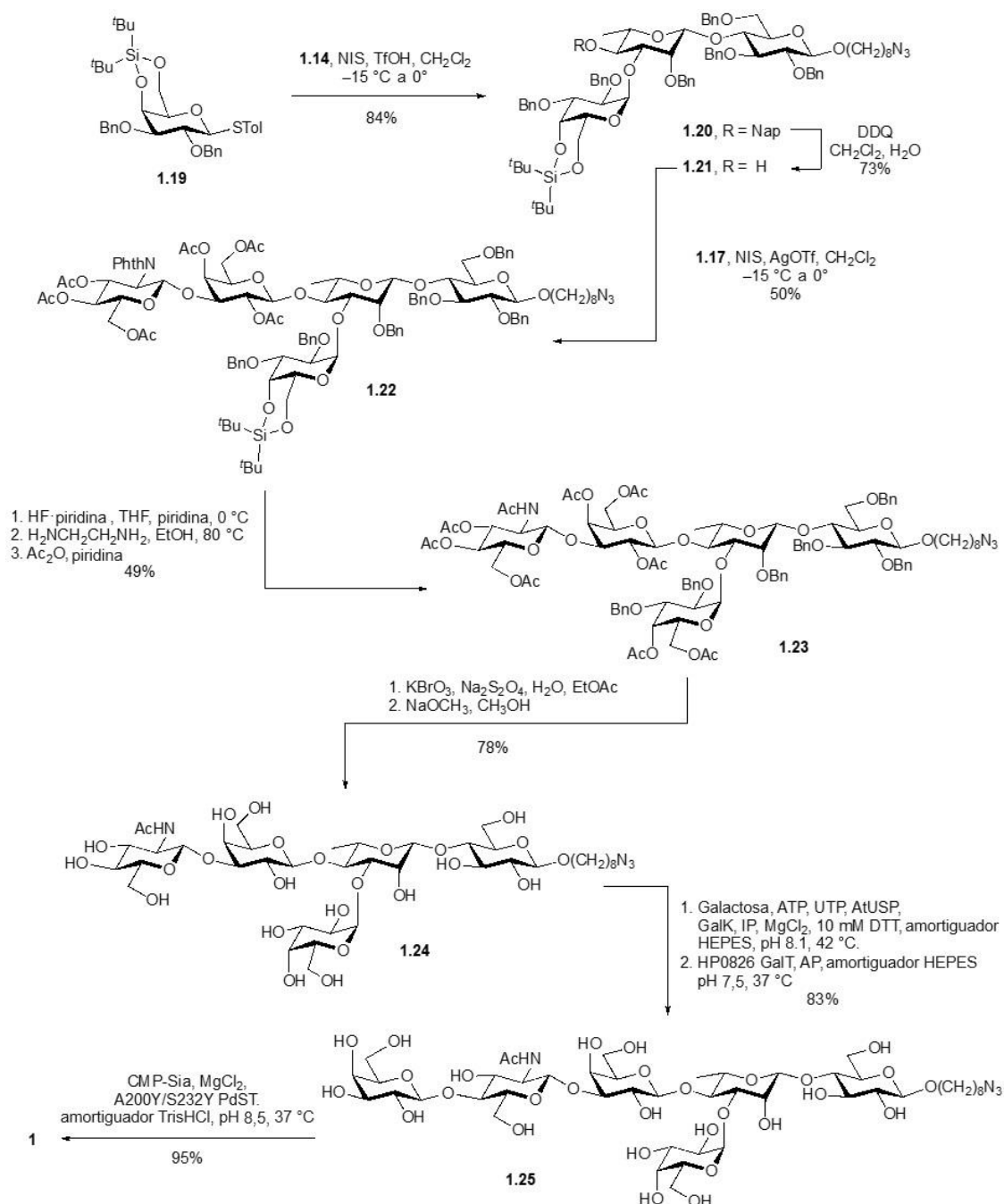


Esquema 2. Síntesis de **1.14**, **1.17** y **1.18**. Abreviaturas: Ac = acetilo; AcOH = ácido acético; Bn = bencilo; DMP = 2,6-dimetilfenilo; Et = etilo; Nap = 2-naftilmetilo; NIS = *N*-yodosuccinimida; NPhth = ftalimida; Ph = fenilo; Tf = trifluorometanosulfonilo (trifilil); TfOH = ácido triflico.

[0050]El **Esquema 2B** ilustra la síntesis del disacárido **1.17**. La glicosilación del alcohol **1.13** con el *N*-feniltrifluoroacetimidato **1.15** conocido [8] a 0°C mediado por ácido triflico proporcionó el producto deseado **1.16** en 70 % de rendimiento total. El acetal de bencilideno se escindió por hidrólisis ácida (calentamiento en agua/ácido acético) y el diol producido se acetilazó para producir, a lo largo de dos etapas, un 63 % en rendimiento de **1.17**. Adicionalmente, **1.16** se convirtió, en 54 % de rendimiento, en el disacárido **1.18**, el cual se usó en la síntesis del antígeno **4** (ver más adelante). Esto se logró al convertir el grupo ftalimida en derivados de *N*-acetato en dos etapas: calentar **1.16** en etanol con etilendiamina a reflujo y acetilar el producto.

[0051]Luego de la sintetización de estos disacáridos, se convirtieron en heptasacárido **1** como se muestra en el **Esquema 3**. Se usó tioglicósido **1.19** [9] para glicosilar **1.14** tras el tratamiento con *N*-yodosuccinimida y ácido triflico. El trisacárido **1.19** producido se obtuvo en 84 % de rendimiento. La escisión oxidativa del éter de naftilmetilo en **1.20** se llevó a cabo por medio de la reacción con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona en diclorometano y agua, lo que produjo **1.21** en 73 % de rendimiento. Luego se glicosiló este alcohol con tioglicósido **1.17** al tratarlos con *N*-yodosuccinimida y triflato de plata, lo que produjo el pentasacárido **1.22** en 50 % de rendimiento. El acetal de sililo se eliminó por medio de tratamiento con ácido fluorhídrico en tetrahidrofurano y piridina, y luego se convirtió al grupo ftalimida en el derivado de *N*-acetato correspondiente, en dos etapas: calentar **1.16** en etanol con etilendiamina a reflujo y luego acetilar el producto. El compuesto, **1.23**, se obtuvo en 49 % a lo largo de tres etapas a partir de **2.1**. En este momento, los grupos protectores se eliminaron en dos etapas. Primero, se escindieron oxidativamente los éteres de bencilo por medio de tratamiento con bromato de potasio con la presencia de ditionato de sodio en agua y acetato de etilo [10]. Luego, los grupos acilo se escindieron por medio de metanólisis a través de reacción con metóxido de sodio en metanol. El pentasacárido desprotegido, **1.24**, se obtuvo en un 78 % de rendimiento.

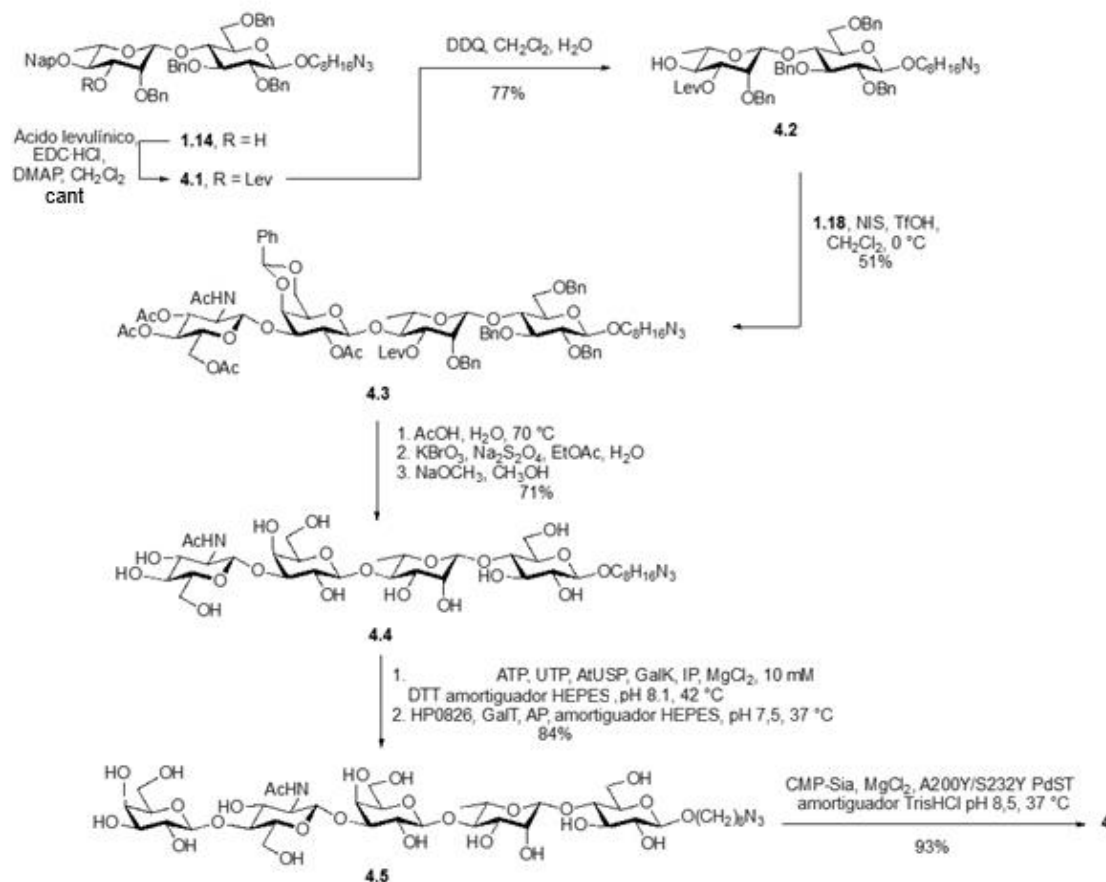
[0052]El compuesto **1.24** se usó luego en reacciones secuenciales catalizadas por glicosiltransferasa para instalar los dos residuos de carbohidrato finales. En la primera de estas reacciones, se agregó un residuo de galactosa al usar la galactosiltransferasa HP0826 [11], lo cual produjo el hexasacárido **1.25** en 83 % de rendimiento. El donante UDP-Gal requerido por la galactosiltransferasa se preparó a partir de galactosa a través del uso de dos enzimas: AtUSP y GalK [11]. La adición de residuo de monosacárido final a través del uso de sialiltransferasa mutante (A200Y/S232Y Pd2,6ST) [12] y CMP-ácido siálico. Se requirió la enzima mutante debido a que el uso de la enzima Pd2,6ST de tipo silvestre ocasionó una sialilación significativa del residuo de galactosa interno, así como del terminal. El heptasacárido **1** final se obtuvo en un 95 % de rendimiento.



Esquema 3. Síntesis de **1**. Abreviaturas: Ac = acetilo; AcOH = ácido acético; AP = fosfatasa alcalina; ATP = trifosfato de adenosina; Bn = bencilo; ^tBu = ter-butilo; CMP = monofosfato de citidina; DDQ = 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona; DTT = ditioneitol; Et = etilo; IP = pirofosfatasa inorgánica; Nap = 2-naftilmetilo; NIS = *N*-yodosuccinimida; Sia = ácido siálico; THF = tetrahidrofurano; Tf = trifluorometanosulfonilo (trifil); TfOH = ácido triflico; Tol = 4-tolulilo (4-metilfenilo); UTP = trifosfato de uridina.

[0053] Síntesis de 4. La síntesis de **4** siguió un procedimiento similar a **1** y se

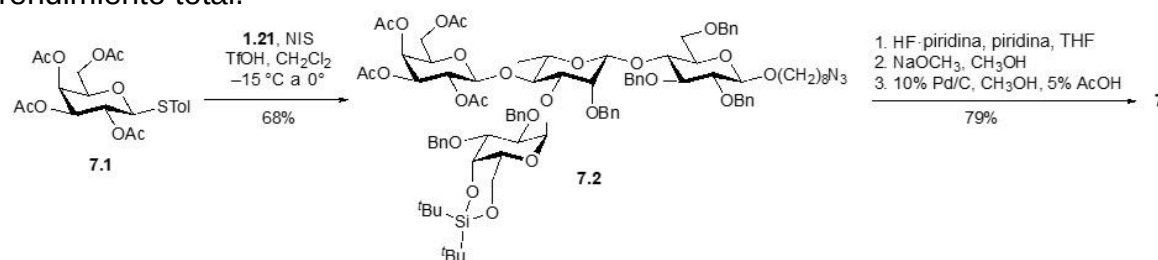
ilustra en el **Esquema 4** más adelante. Se comienza con el disacárido **1.14**, y el alcohol se convierte en éster de levulinato en un rendimiento cuantitativo al tratarse con ácido levulínico y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida. El producto, **4.1**, luego se convierte en el alcohol **4.2** por medio de escisión mediada por 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona del éter de naftilmetilo, lo que produjo un 77 % de rendimiento del compuesto deseado. La glicosilación de **4.2** a 0 °C por medio del uso del disacárido **1.18** promocionado por *N*-yodosuccinimida y ácido trifílico proporcionó un 51 % de rendimiento del tetrasacárido **4.3**. La desprotección se logró en tres etapas: hidrólisis ácida del acetal de bencilideno, oxidación promovida por bromato de los éteres de bencilo, y deacilación final. El producto **4.5** se obtuvo en un 71 % de rendimiento a lo largo de estas tres etapas. De **4.5**, las mismas reacciones enzimáticas usadas en la síntesis de **1** se emplearon. Por lo tanto, el tetrasacárido **4.5** pudo convertirse en el hexasacárido **4** dos etapas y en un 78 % de rendimiento total.



Esquema 4. Síntesis de **4**. Abreviaturas: Ac = acetilo; AcOH = ácido acético; AP = fosfatasa alcalina; ATP = trifosfato de adenosina; Bn = bencilo; CMP = monofosfato de citidina; DDQ = 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona; DMAP = 4-dimetilaminopiridina; EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; Et = etilo; DTT = ditiotreitól; IP = pirofosfatasa inorgánica; Lev = levulinilo; Nap = 2-naftilmetilo; NIS = *N*-yodosuccinimida; Ph = fenilo; Sia = ácido siálico; Tf =

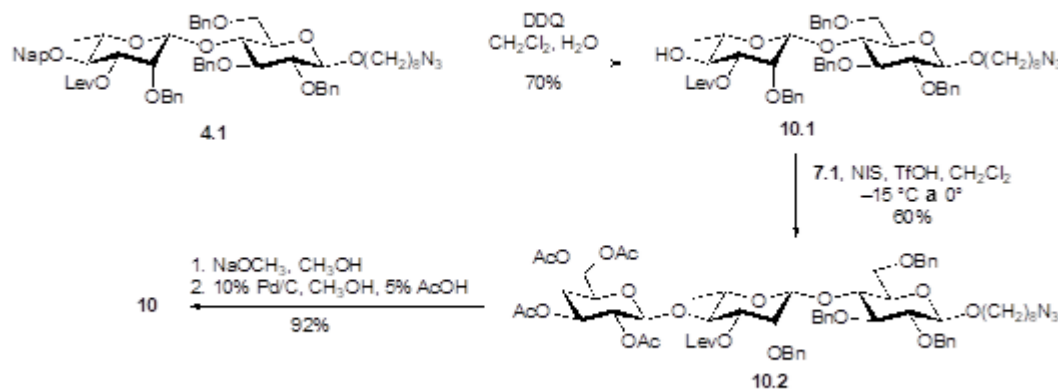
trifluorometanosulfonilo (trifilil); TfOH = ácido trifílico; UTP = trifosfato de uridina.

[0054] Síntesis de 7. Para sintetizar **7** (**Esquema 5** más adelante), se usó tioglicósido **7.1** [13] para glicosilar el alcohol trisacárido **1.21** con el uso de *N*-yodosuccinimida y ácido trifílico, en donde se comenzó a -15°C y se calentó hasta 0°C . El tetrasacárido esperado **7.2** se obtuvo en un 68 % de rendimiento. La eliminación de los grupos protectores se hizo en tres etapas. El acetal de sililo primero se escindió mediante el uso del complejo de piridina y ácido fluorhídrico, y luego se eliminaron los acetatos por medio de metanólisis en condiciones básicas, y finalmente se eliminaron los grupos bencilo por medio de hidrogenólisis en paladio sobre carbón en metanol que contiene ácido acético. La última etapa también redujo el azido a la amina. El producto, **7**, se obtuvo en un 79 % de rendimiento total.



Esquema 5. Síntesis de **7**. Abreviaturas: Ac = acetilo; AcOH = ácido acético; Bn = bencilo; $t\text{Bu}$ = ter-butilo; NIS = *N*-yodosuccinimida; TfOH = ácido trifílico; THF = tetrahidrofurano; Tol = 4-tolulilo (4-metilfenilo).

[0055] Síntesis de 10. El disacárido **4.1** sirvió como el punto de partida para la síntesis de **10** (**Esquema 6** más adelante). La escisión oxidativa del éter de naftilmetilo, realizada de la misma forma que para los otros compuestos, proporcionó **10.1** en un 70 % de rendimiento. La glicosilación de **10.1** con **7.1** [13] mediante el uso de *N*-yodosuccinimida y ácido trifílico produjo un 60 % de rendimiento de trisacárido **10.2**. La desprotección de **10.2**, y la reducción del azido a la amina, se llevó a cabo de la misma forma que en la síntesis de **7** para producir el trisacárido **10** en un 92 % de rendimiento.

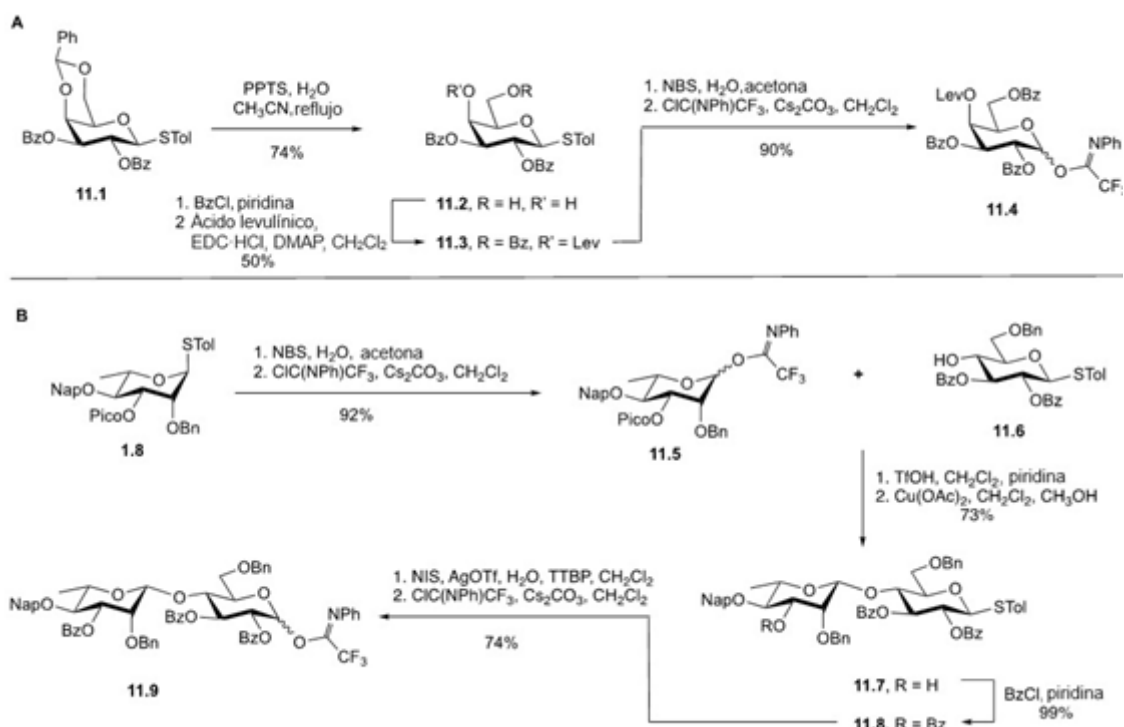


Esquema 6. Síntesis de **10**. Abreviaturas: Ac = acetilo; AcOH = ácido acético; Bn

= bencilo; DDQ = 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona; Lev = levulinoilo; Nap = 2-naftilmetilo; TfOH = ácido triflico.

[0056] Síntesis de 11. El hexasacárido **11** es un dímero de **10** y su síntesis requirió la preparación de dos bloques de construcción adicionales: el monosacárido **11.4** y el disacárido **11.9** (**Esquema 7** más adelante). La síntesis de **11.4** (**Esquema 7A**) partió desde el tioglicósido **11.1** informado anteriormente [14]. El acetal de bencilideno en **11.1** se hidrolizó a través de calentamiento con *p*-toluenosulfonato de piridinio y agua en acetonitrilo a reflujo, lo cual proporciona el diol **11.2** en un 74 % de rendimiento. El grupo hidroxilo primario se benzoilató con una cantidad limitada de cloruro de benzoilo en piridina, y luego se realizó la esterificación de Steglich del producto con ácido levulínico y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, lo que produjo un 50 % de rendimiento de **11.3**. La hidrólisis del tioglicósido con *N*-bromosuccinimida y agua produjo un hemiacetal que se convirtió en el *N*-feniltrifluoroacetimidato correspondiente tras la reacción con cloruro de *N*-feniltrifluoroacetimidoil y carbonato de cesio. El producto, **11.4**, se obtuvo en un 90 % de rendimiento a lo largo de las dos etapas.

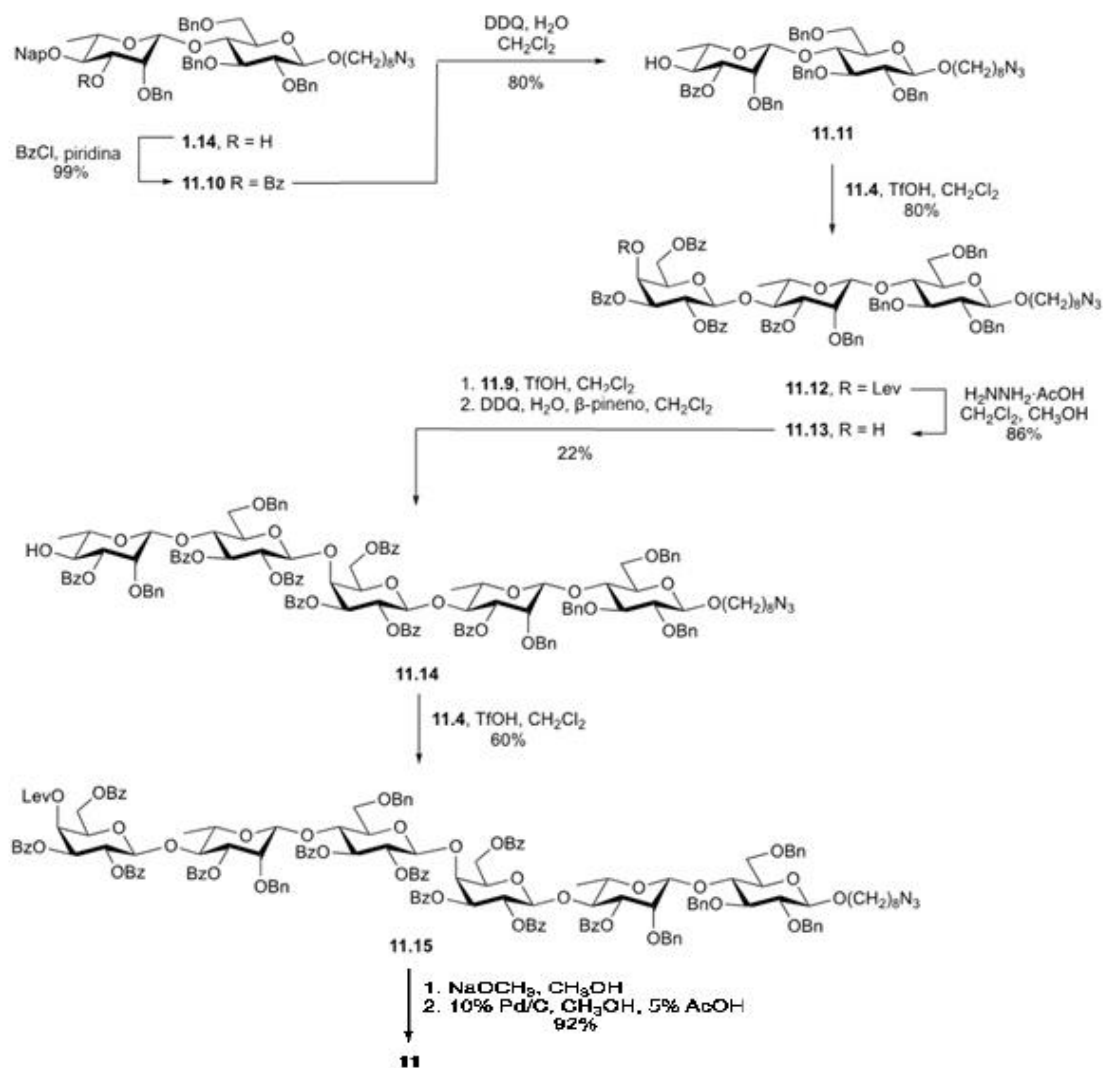
[0057] La sintetización de **11.9** (**Esquema 7B**) comenzó con tioglicósido **1.8**, que se hidrolizó y convirtió, en dos etapas y en un 92 % de rendimiento general, en *N*-feniltrifluoroacetimidato **11.5**, como se realizó para la preparación de **11.4**. El donante activable luego se utilizó para glicosilar el alcohol conocido **11.6**. [15] La glicosilación se llevó a cabo mediante el uso de la activación con ácido triflico y el producto disacárido se trató inmediatamente con acetato de cobre y agua para eliminar el éster de picolilo. La transformación en dos etapas proporcionó alcohol de disacárido **11.7** en un 73 % de rendimiento ($^1J_{C1,H1}$ de residuo de ramnosa = 158,8 Hz, lo que confirmó la β -estereoquímica). La benzoilación del alcohol con cloruro de benzoílo y piridina produjo un rendimiento casi cuantitativo de **11.8**. La conversión de este tioglicósido a *N*-feniltrifluoroacetimidato **11.9** se realizó en un 74 % de rendimiento mediante el tratamiento con *N*-yodosuccinimida y agua, y luego la reacción del producto resultante con cloruro de *N*-feniltrifluoroacetimidoil y carbonato de cesio.



Esquema 7. Síntesis de **11.4** y **11.9**. Abreviaturas: Ac = acetilo; Bn = bencilo; Bz = benzoílo; DMAP = 4-dimetilaminopiridina; EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; Et = etilo; Lev = levulinoilo; Nap = 2-naftilmetilo; NBS = *N*-bromosuccinimida; NIS = *N*-yodosuccinimida; Pico = picolilo; PPTS = *p*-toluensulfonato de piridinio; Tf = trifluorometanosulfonylo (trifilil); TfOH = ácido tríflico; Tol = 4-tolulilo (4-metilfenilo); TTBP = 2,4,6-tri-*t*-butilpirimidina.

[0058] La síntesis de **11** se muestra en el **Esquema 8** más adelante. El disacárido **1.14** se benzolizó con cloruro de benzoílo y piridina para obtener **11.10** en un 99 % de rendimiento. El éter de naftilmetilo se escindió mediante tratamiento con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona y agua en diclorometano, lo que llevó a la formación, en un 80 % de rendimiento, del alcohol **11.11**. La glicosilación de **11.11** con *N*-feniltrifluoroacetimidato **11.4** mediante el uso de ácido tríflico como promotor proporcionó un 80 % de rendimiento de trisacárido **11.12**, que luego se sometió a la reacción con hidrato de hidrazina para escindir el éster de levulinato. El producto de alcohol **11.13** se obtuvo en un 86 % de rendimiento. La glicosilación de **11.13** con disacárido de *N*-feniltrifluoroacetimidato **11.9** y luego la escisión del éter de naftilmetilo con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona y agua en la presencia de β -pineno proporcionaron el pentasacárido **11.14** en un 22 % de rendimiento a lo largo de las dos etapas. La etapa deficiente en esta transformación fue la glicosilación y todos los intentos para mejorarla fallaron. Además, el producto no se pudo purificar luego de la glicosilación, pero sí luego de la eliminación del grupo naftilmetilo. El β -pineno se agregó a la reacción de escisión del naftilmetilo como un barrador ácido para reducir el grado de desbencilación no deseada [16]. La glicosilación de **11.14** con **11.4** promocionada

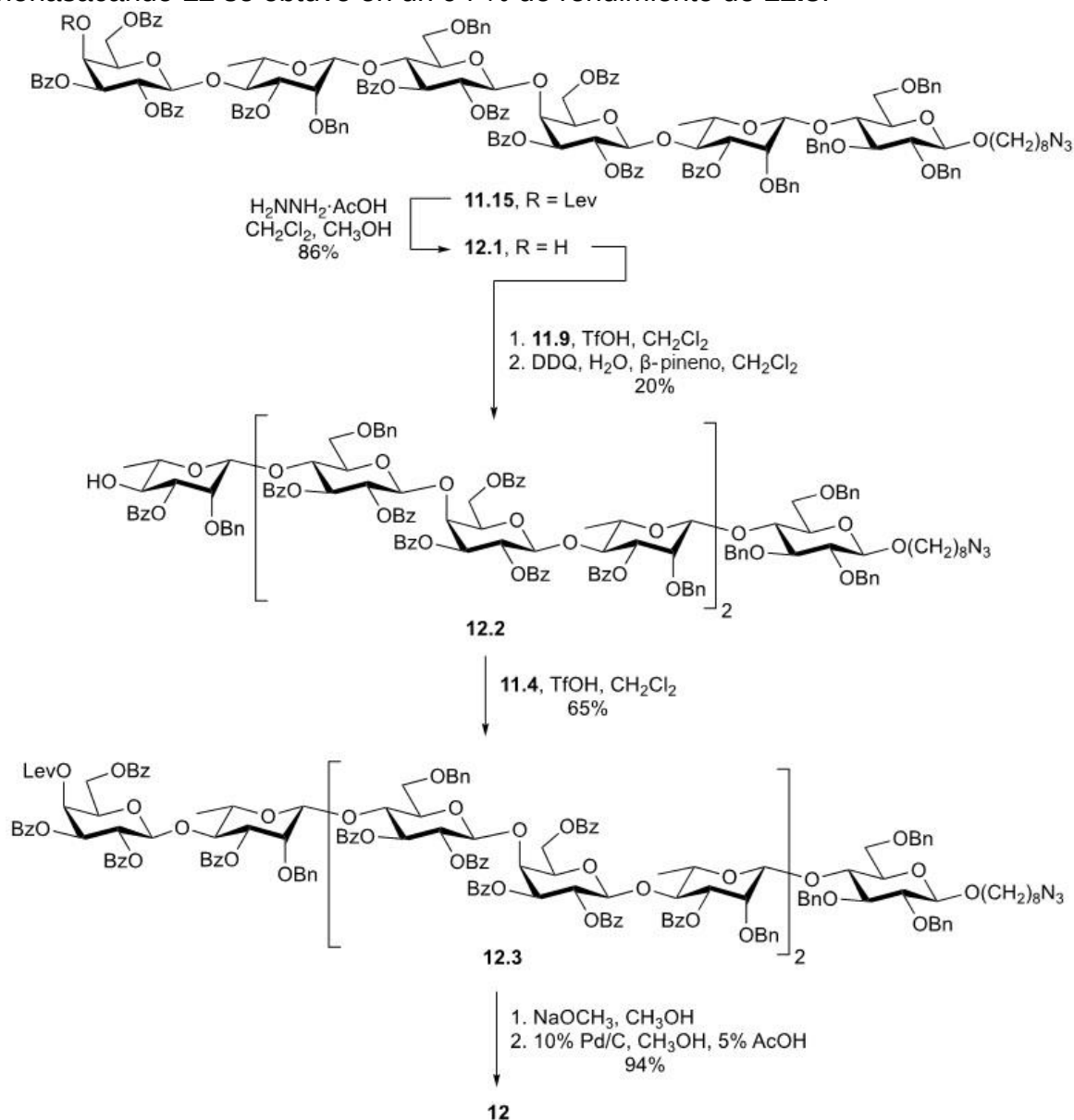
por ácido trifílico proporcionó el hexasacárido **11.15** en un 60 % de rendimiento. Finalmente, el compuesto se desprotegió y el azido se redujo como se describió para la síntesis de **7**. La conversión de **11.15** en **11** procedió en un 92 % de rendimiento general a lo largo de dos etapas.



Esquema 8. Síntesis de **11**. Abreviaturas: Ac = acetilo; AcOH = ácido acético; Bn = bencilo; Bz = benzoílo; DDQ = 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona; Lev = levulinilo; Nap = 2-naftilmetilo; TfOH = ácido trifílico.

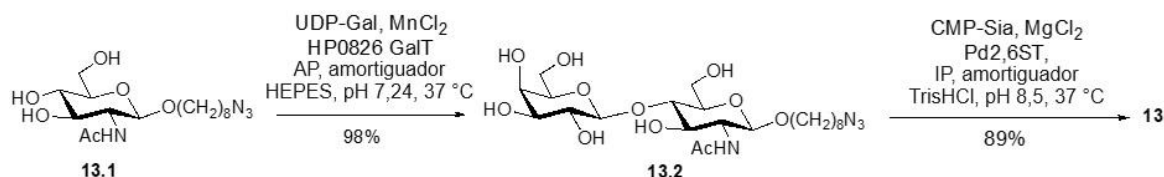
[0059] Síntesis de 12. La síntesis de **12** (**Esquema 9** más adelante) se logró al partir de **11.15**, un intermediario usado en la síntesis de **11**. La escisión del éster de levulinato en **11.15** con acetato de hidrazina proporcionó alcohol de hexasacárido **12.1** en un 86 % de rendimiento. La glicosilación promovida por ácido trifílico de **12.1** con disacárido de *N*-feniltrifluoroacetimidato **11.9** fue, como en la síntesis de **11.14**, una reacción deficiente, y la purificación solo se pudo realizar luego de la eliminación del grupo naftilmetilo. El producto, **12.2**, se obtuvo en un 20 % de rendimiento a lo largo de las dos etapas. La glicosilación de **12.2**

con **11.4** proporcionó **12.3** (65 % de rendimiento), que luego se desprotegió y se convirtió en la amina en dos etapas como se describen para la síntesis de **7**. El nonasacárido **12** se obtuvo en un 94 % de rendimiento de **12.3**.



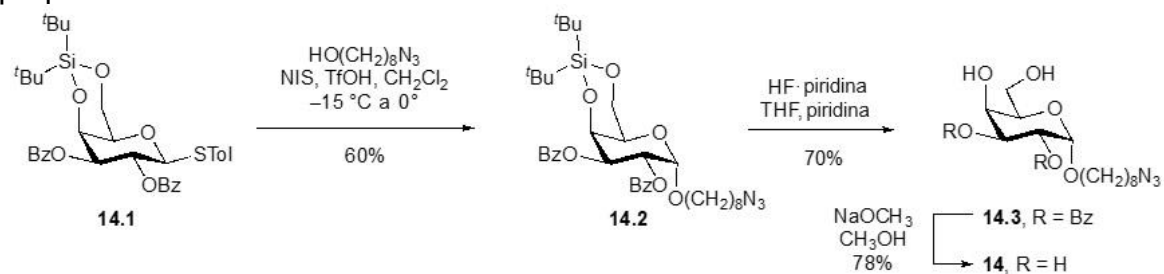
Esquema 9. Síntesis de **12**. Abreviaturas: AcOH = ácido acético; Bn = bencilo; Bz = benzoílo; DDQ = 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona; Lev = levulinoilo; Nap = 2-naftilmetilo; TfOH = ácido trifílico.

[0060] Síntesis de 13. La preparación de **13** se logró en dos etapas enzimáticas a partir del glicósido de 8-azidooctilo conocido **13.1** [17] (**Esquema 10** más adelante) como se realizó para los otros antígenos. La galactosilación se midió mediante la galactosiltransferasa HP0826 y la sialilación usó la sialiltransferasa Pd2,6ST nativa. El producto, **13**, se obtuvo en un 87 % de rendimiento a lo largo de las dos etapas.



Esquema 10. Síntesis de **13**. Abreviaturas: AP = fosfatasa alcalina; ATP = trifosfato de adenosina; CMP = monofosfato de citidina; IP = pirofosfatasa inorgánica; Sia = ácido siálico; UTP = trifosfato de uridina.

[0061] Síntesis de 14. La preparación **14** (**Esquema 11** más adelante) comenzó a partir de tioglicósido **14.1** [18], que se utilizó para glicosilar 8-azido-octanol promovido por *N*-yodosuccinimida y ácido triflico. El producto, **14.2**, se obtuvo en un 60 % de rendimiento. La desprotección se logró en dos etapas. Primero, el acetal de sililo se escindió tras el tratamiento con complejo de fluoruro de hidrógeno-piridina en una mezcla de tetrahidrofurano y piridina; esta reacción produjo **14.3** en un 70 % de rendimiento. Los ésteres de benzoato en **14.3** luego se escindieron en un 78 % de rendimiento mediante metanólisis, lo que proporcionó **14**.



Esquema 11. Síntesis de **14**. Abreviaturas: ^tBu = ter-butilo; Bz = benzoílo; NIS = *N*-yodosuccinimida; TfOH = ácido triflico; THF = tetrahidrofurano; Tol = 4-tolulilo (4-metilfenilo).

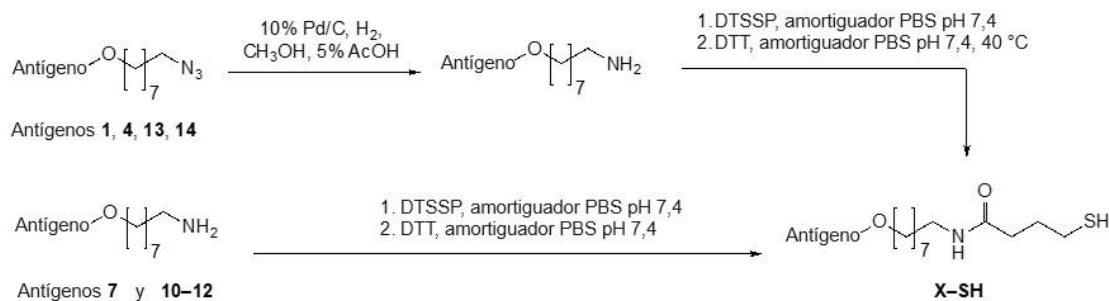
Ejemplo 2

Conjugación de proteína (mediante el uso de CRM197, un mutante no tóxico de la toxina diftérica)

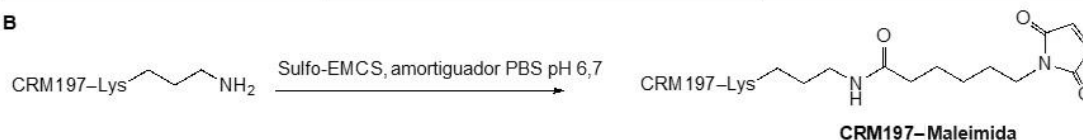
[0062] Preparación de los conjugados de CRM197. Para preparar los conjugados de los antígenos y CRM197 para su uso en las inmunizaciones, se utilizó una reacción de acoplamiento de maleimida-tiol (**Esquema 12** más adelante) [19]. Cada antígeno se convirtió en la amina correspondiente mediante hidrogenación (**Esquema 12A**) y luego se acopló con 3,3'-ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) y luego ditiotretol para generar el derivado de 3'-tio-propilamida correspondiente (**X-SH**, por ejemplo, **1-SH**). Los antígenos **7** y **10-12** se generaron como aminas durante la etapa final de desprotección y, para estos compuestos, la etapa de hidrogenación no fue necesaria. De forma separada, CRM197 se hizo reaccionar con éster de *N*-ε-maleimidocaproil-oxisulfosuccinimida para producir la proteína funcionalizada de maleimida (**Esquema 12B**). Luego, el CRM197 que contiene maleimida se trató con un exceso del antígeno funcionalizado con tiol (**Esquema 12C**). Luego de la reacción, los residuos de maleimida sin reaccionar en la proteína se taparon con mercaptoetanol. La **Tabla 1** más adelante muestra

los rendimientos de la formación de **X-SH** y la **Tabla 2** más adelante muestra las cargas en el CRM-197 como se determinó mediante espectrometría de masas MALDI.

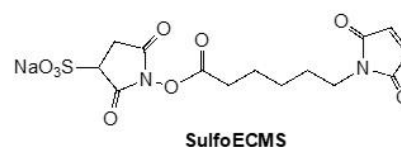
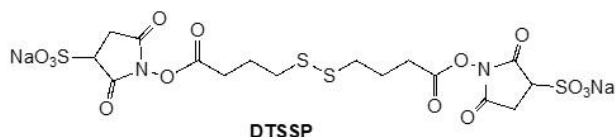
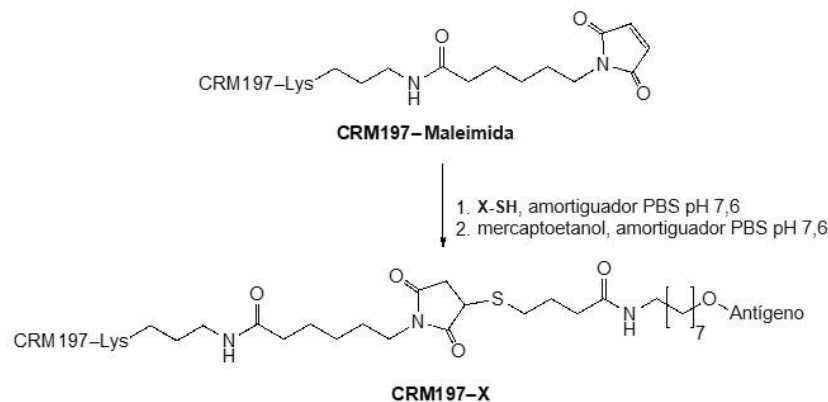
A



B



C



Esquema 12. Conjugación de antígenos con CRM197. Abreviaturas: AcOH = ácido acético; DTSSP = 3,3'-ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo); DTT = ditioreitol; sulfoECMS = éster de *N*-ε-maleimidocaproil-oxisulfosuccinimida PBS = solución salina amortiguada con fosfato.

Tabla 1. Preparación de antígenos funcionalizados con ligador para la síntesis del conjugado de CRM197 y BSA.

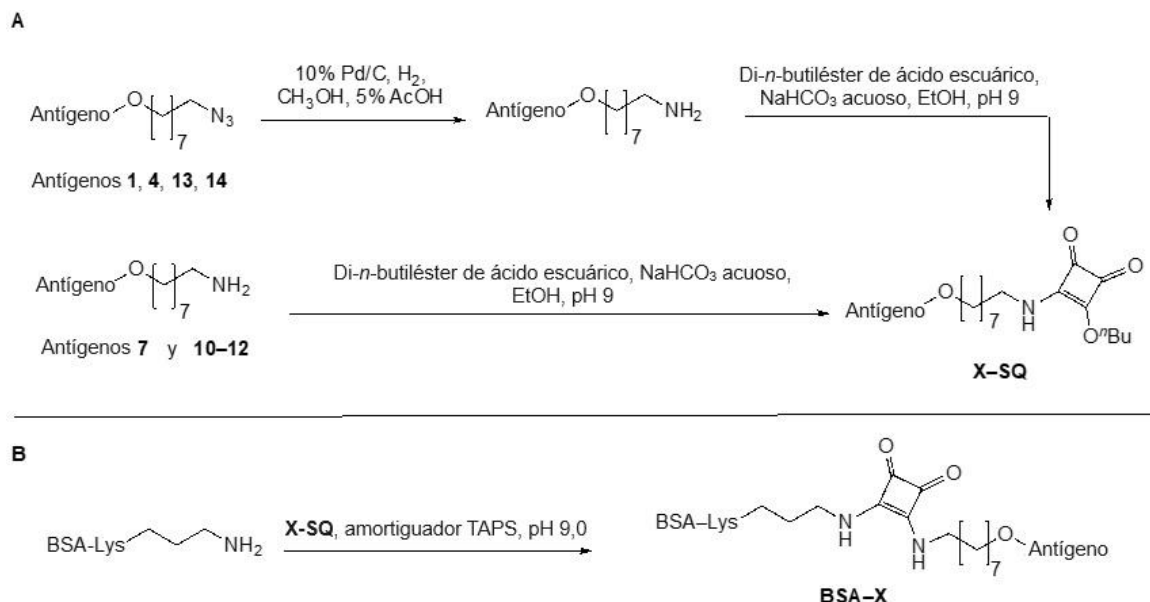
Compuesto	Conjugados de CRM197		Conjugados de BSA	
	Derivado de	Rendimiento	Derivado de	Rendimiento

	tiol		escuaramida	
1	1-SH	77 %	1-SQ	79 %
4	4-SH	64 %	4-SQ	75 %
7	7-SH	60 %	7-SQ	63 %
10	10-SH	72 %	10-SQ	71 %
11	11-SH	88 %	11-SQ	75 %
12	12-SH	95 %	12-SQ	77 %
13	13-SH	90 %	13-SQ	97 %
14	14-SH	56 %	14-SQ	82 %

Tabla 2. Preparación de conjugados de CRM197 y BSA y carga de antígenos (a partir de MALDI-MS).

Compuesto	Conjugados de CRM197			Conjugados de BSA	
	Carga de maleimida en CRM197	Derivado de tiol equivalente usado	Carga de antígeno en CRM197	Derivado de escuaramida equivalente usado	Carga de antígeno en BSA
1	27	75	5	75	6
4	25	75	6	75	6
7	24	100	15	100	9
10	19	100	9	100	13
11	29	35	10	50	7
12	21	50	6	50	5
13	24	200	9	100	11
14	19	200	9	100	15

[0063]Preparación de conjugados de BSA. Los conjugados de BSA de los antígenos también se prepararon para los experimentos ELISA. Para controlar cualquier anticuerpo específico de ligador generado durante las inmunizaciones, se usó un ligador diferente para preparar los conjugados de BSA. Para este propósito, se eligió una escuaramida [20] (**Esquema 13** a continuación). Cada antígeno se convirtió en la amina correspondiente mediante hidrogenación (**Esquema 13A**) y luego se acopló con éster de dibutilo de ácido escuárico para generar el derivado de monoescuaramida (**X-SQ**, por ejemplo, **1-SQ**). Como fue el caso de los conjugados de CRM197, los antígenos **7** y **10-12** se generaron como aminas durante la etapa de desprotección final, por lo tanto, la etapa de hidrogenación no fue necesaria. El acoplamiento de cada derivado de escuaramida con BSA produjo los conjugados. La **Tabla 1** anterior muestra los rendimientos de la formación de **X-SQ** y la **Tabla 2** anterior muestra las cargas en el BSA como se determinó mediante espectrometría de masas MALDI.



Esquema 13. Conjugación de antígenos a BSA Abreviaturas: AcOH = ácido acético; ^nBu = *n*-butilo; EtOH = etanol; TAPS = (ácido [tris(hidroximetil)metilamino]propanosulfónico).

Ejemplo 3

Inmunización de ratón

[0064] Para las inmunizaciones de ratón, se usaron los prototipos **1, 4, 7, 10, 13, y 14**.

[0065] Formulación de vacuna. El adyuvante seleccionado para la inmunización de ratón fue TiterMax Gold® (un adyuvante optimizado para ratones; CytRx cooperation, Norcross, GA). La emulsión se preparó al mezclar la fase acuosa (PBS que contiene el antígeno o prototipo de vacuna) con la fase de aceite (TiterMax Gold) en una relación v/v de 1:1. Para una dosis de vacuna de 25 μg administrada en 0,1 ml, la concentración final del antígeno en la emulsión final fue de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Por lo tanto, la concentración inicial de antígeno fue igual o mayor a 0,5 mg/ml para que la emulsión funcione. Cuando estuvo más concentrada, se agregó PBS para diluir la fase acuosa adecuadamente. Luego de la primera dosis de inmunización, la emulsión se almacenó a 4 °C hasta la segunda dosis (refuerzo).

[0066] Inmunización de ratón y extracción de suero. Se usaron ratones hembra C57BL/6 de 5 semanas de edad (Charles River, Wilmington, MA). Los ratones se inmunizaron con dos dosis de 25 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de volumen por vía subcutánea en un intervalo de 14 días. La primera extracción de sangre se llevó a cabo desde la vena submandibular antes de la segunda inmunización (Día 14), y la última extracción de sangre se llevó a cabo mediante punción cardíaca 14 días después de la última dosis de inmunización (Día 28). También se extrajo una muestra de sangre en el Día 0 de los ratones sin tratamiento (para controlar los niveles basales de anticuerpos). Los grupos de ratones fueron los siguientes: Sin tratamiento (n = 5); Placebo (solo adyuvante; n = 5); y Conjugado (n = 10).

[0067] Titulación de anticuerpos. Las placas ELISA (Polysorp, Nunc-Immuno; Thermo Scientific, Mississauga, ON, Canadá) se recubrieron con 100 µl de **CPS de tipo 2 *S. suis* purificado nativo** (diluido a 2 µg/ml en 0,1 M de NaCO₃; pH 9,6), o con 100 µl de **epítipo de CPS sintetizado correspondiente conjugado con BSA** (diluido a 2 µg/ml en PBS; pH 7,4). Las placas recubiertas se dejaron reposar durante la noche a 4 °C. Para la titulación de anticuerpos de ratón, las placas recubiertas se lavaron con PBS que contenía 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBS-T) y se bloquearon mediante el tratamiento con 300 µl de PBS que contiene 1 % (p/v) de albúmina de suero bovino (HyClone, Logan, UT) durante 1 h a temperatura ambiente (RT). Luego del lavado, 100 µl de muestras de suero de ratón diluidas en serie en PBS-T se agregaron a las cavidades y se dejaron por 1 h a RT. Luego del lavado, se detectaron anticuerpos mediante el uso de Ig total [IgG + IgM] antirratón de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch), anti-IgG de cabra (Fycγ de fragmento específico; Jackson ImmunoResearch), anti-IgM de cabra, anti-IgG1 de cabra, anti-IgG2b de cabra o anti-IgG2c de cabra diluido a 1:1000, o anti-IgG3 de cabra diluido a 1:500 (Jackson ImmunoResearch) durante 1 h a RT. Las placas se desarrollaron con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB; InvitroGen, Burlington, ON, Canadá) y la reacción de enzima se detuvo por la adición de 0,5 M de H₂SO₄. La absorbancia se leyó a 450 nm con un lector de placa ELISA.

[0068] Para la titulación de suero de ratón, el recíproco de la última dilución de suero que resultó en un OD₄₅₀ de ≤ 0,15 (corte) se consideró como el título de ese suero. Para controlar las variaciones entre placas, se agregó un control positivo de referencia a cada placa. Para la titulación de los anticuerpos de Ig total [IgG + IgM] de ratón, este control fue una agrupación de sueros hiperinmunizados. La reacción en TMB se detuvo cuando se obtuvo un OD₄₅₀ = 1,0 para el control interno positivo. Para la detección de isotipos, las placas se detuvieron a 30 min.

[0069] Se llevaron a cabo experimentos, los cuales mostraron títulos de Ig totales (IgG+IgM) contra el epítipo de CPS sintetizado correspondiente; ver las **Figuras 3-5**. Se llevaron a cabo experimentos adicionales, los cuales mostraron títulos de Ig totales (IgG+IgM) contra el CPS purificado nativo del serotipo 2 de *S. suis*; ver las **Figuras 6-8**. En función de respuestas de anticuerpo, los prototipos **1, 4, 7 y 10** se seleccionaron para estudios adicionales en cerdos.

Ejemplo 4

Inmunización de cerdo

[0070] Para las inmunizaciones de cerdo, los prototipos seleccionados fueron: Se usaron **1, 4, 7, 10, 11 y 12**. El "fragmento adicional" del documento de Zhang et al. [2] también se usó en cerdos.

[0071] Formulación de vacuna. El adyuvante seleccionado para la inmunización de cerdo fue Montanide™ ISA 61 VG (SEPPIC, Fairfield, NJ), una emulsión de agua en aceite (W/O). La relación en peso de la fase acuosa y el adyuvante es de 60 g a 40 g para 100 g de una vacuna. La densidad de Montanide™ ISA 61 VG es de 0,83. La dosis de vacuna fue de 170-200 µg/cerdo administrada en 1 ml. La formulación de vacuna con Montanide™ ISA 61 VG se realizó de acuerdo con los

protocolos del fabricante.

[0072]Inmunización de cerdo y extracción de suero. Se adquirieron cerdos de raza mixta criolla/blanca de tres semanas de edad recientemente destetados de una granja comercial en Quebec, sin historial de problemas clínicos causados por *S. suis*, sin programa de vacunación contra este patógeno y libres del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. Tras su llegada, los cerdos se pesaron, etiquetaron individualmente, asignaron a dos grupos (placebo o vacunados; n = 10 o 15 por grupo) con un peso promedio igual (alrededor de 5-6 kg) y se colocaron en el animalario experimental de nivel II de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Montreal. Se alimentó a los cerdos con alimento comercial en grano no medicado, con una adición de suplementos vegetales secos. Dos días tras su llegada, los cerdos se inmunizaron intramuscularmente (IM) en el músculo del cuello, con 1 ml de los prototipos de vacuna seleccionados (grupo de vacuna) o adyuvante solo en PBS (grupo de control de placebo). La segunda dosis de vacuna y placebo se administraron IM dos semanas luego de la primera dosis. Luego de la inmunización de primera dosis, la emulsión de vacuna se almacenó a 4 °C hasta la segunda dosis. Se extrajeron muestras de sangre de la vena yugular antes de cada inmunización y antes de la exposición para determinar las respuestas de anticuerpo (ver más adelante).

[0073]Estudio de exposición de cerdo y puntuaciones clínicas. Once días después de la segunda dosis de vacuna, los animales de control y los inmunizados se pesaron, sedados mediante el uso de una dosis de 0,5 mg/kg de Atravet (Boehringer Ingelheim, Burlington, ON, Canadá) y se expusieron con una inyección intraperitoneal (IP) de 6 ml ($9,6 \times 10^9$ CFU) de cultivo de fase exponencial de la cepa de serotipo 2 de *S. suis* P1/7. El peso promedio de los cerdos en el día de la exposición fue de 14 kg. Luego de la exposición, los cerdos se monitorearon tres veces por día durante un período de nueve días para determinar la presencia de señales clínicas y mortalidad. Los individuos que observaron a los animales estaban cegados con respecto a los tratamientos. Se calculó una puntuación clínica diaria en función de una ficha de observación clínica. Se evaluó el comportamiento general, la locomoción (alteraciones musculoesqueléticas) y la alteración funcional del sistema nervioso central (CNS). Las puntuaciones clínicas del comportamiento se proporcionaron de la siguiente manera: 0 = actitud normal y respuesta a estímulos; 1 = leve depresión con retraso marginal en la respuesta a estímulos, pero conserva el apetito; 2 = depresión moderada, el animal solo responde a estímulos repetidos, es reacio a moverse y tiene menos apetito; 3 = depresión grave, no responde, está recostado, tiene falta de coordinación y pérdida de apetito. Las puntuaciones clínicas de la locomoción se proporcionaron de la siguiente manera: 0 = marcha y postura normal; 1 = una articulación afectada, cojera leve, pero se levanta y se mueve sin asistencia; 2 = cojera moderada, 2-3 articulaciones afectadas con hinchazón, pero se levanta sin asistencia; 3 = cojera grave, ataxia, 3-4 articulaciones afectadas, está recostado y no se puede parar ni mover. Finalmente, las puntuaciones clínicas de CNS se proporcionaron de la siguiente manera: 0 = comportamiento fisiológico y respuesta

a estímulos normal; 1 = leve falta de coordinación, estrabismo; 2 = falta de coordinación moderada, temblores; 3 = inclinación de cabeza lateral o dorsal grave, ataxia, opistótonos, nistagmo, convulsiones. Los cerdos que tuvieron una puntuación clínica = 3 en cualquier categoría y una temperatura corporal de más de 40 °C por dos días consecutivos se sometieron a eutanasia. Se administró Ketamina (20 mg/kg; Narketan®, Vetoquinol, Lavaltrie, QC, Canadá) y xilazina (2 mg/kg; Rompun®, Bayer, Mississauga ON, Canadá) IM para lograr una anestesia completa seguida de una administración intracardíaca de pentobarbital sódico (100 mg/kg; Euthanyl®, Vetoquinol). Se extrajo sangre de cerdos seleccionados aleatoriamente antes de someterlos a eutanasia para análisis bacteriológicos (para confirmar la presencia de la sepa de exposición). También se llevó a cabo un procedimiento de autopsia en animales seleccionados. Se recolectaron hisopados de las meninges y líquido sinovial de las cavidades de articulaciones afectadas y se sembraron en agar sanguíneo para la recuperación bacteriana. Se recolectaron muestras de hígado y bazo y se cultivaron para la recuperación bacteriana. Los individuos que llevaron a cabo las necropsias y la recuperación bacteriana estaban cegados con respecto a los tratamientos.

[0074] Titulación de anticuerpos. Las placas ELISA (Polysorp, Nunc-Immuno; Thermo Scientific, Mississauga, ON, Canadá) se recubrieron con 100 µl de CPS de tipo 2 *S. suis* purificado nativo (diluido a 2 µg/ml en 0,1 M de NaCO₃; pH 9,6), o con 100 µl de epítipo de CPS sintetizado correspondiente conjugado con BSA (diluido a 2 µg/ml en PBS; pH 7,4). Las placas recubiertas se dejaron reposar durante la noche a 4 °C. Para la titulación de anticuerpos porcinos, las placas recubiertas se lavaron con PBS-T y se bloquearon con 2 % de leche descremada durante 1 h a RT. Para establecer los títulos de anticuerpos, los sueros porcinos se diluyeron en serie (2 veces) en PBS-T (comenzando con una dilución de 1/200) y se incubaron durante 1 h a RT. Para la titulación del Ig [IgM + IgG] o IgM total de los cerdos, las placas se incubaron con Ig [IgM + IgG] total anticerdo de cabra conjugado con peroxidasa diluido a 1:4000 (BioRad, Mississauga, Ontario) o IgM anticerdo diluido a 1:2000 (BioRad) durante 1 h a RT. Para la detección IgG1 o IgG2 porcino, el IgG1 antiporcino de ratón (diluido a 1:2000) o IgG2 (diluido a 1:2000) (BioRad) se agregó por 1 h a RT. Luego del lavado, el Ig [IgM + IgG] antiratón de cabra conjugado con peroxidasa diluido a 1:4000 (Jackson ImmunoResearch) se agregó durante 1 h a RT. Las placas se desarrollaron con sustrato de TMB, y la reacción de enzima se detuvo por la adición de 0,5 M de H₂SO₄. La absorbancia se leyó a 450 nm con un lector de placa ELISA. El recíproco de la última dilución de suero que resultó en una densidad óptica a 450 nm (OD₄₅₀) de ≤ 0,2 (corte) se consideró como el título de ese suero. Para controlar las variaciones entre placas, se agregó un control positivo de referencia a cada placa. Este control fue un suero convaleciente de un cerdo infectado experimentalmente con *S. suis*. La reacción en TMB se detuvo cuando se obtuvo un OD₄₅₀ = 1,0 para el control interno positivo.

[0075] Se llevaron a cabo experimentos, en donde los resultados ELISA mostraron títulos de anticuerpos inducidos con vacuna contra el epítipo de CPS sintetizado correspondiente; ver el resumen de los datos clínicos luego de la exposición a *S.*

suis de los cerdos inmunizados en la **Figura 9**, **Figura 10** y **Figura 11**. Los niveles de anticuerpos inducidos por diferentes fragmentos varían, pero el patrón de isotipo de anticuerpo es similar. El fragmento **4** parece ser reconocido por los anticuerpos no específicos que están presentes en los cerdos (esto se evidencia por una fuerte reacción ELISA en el grupo de placebo contra este fragmento). Por lo tanto, este fragmento no es adecuado como vacuna candidata. Este descubrimiento no solo demuestra la importancia de diseñar químicamente el epítipo correcto, sino también que la evaluación clínica en los cerdos debe predecir el valor real de un fragmento como una vacuna candidata. De hecho, no todos los fragmentos de CPS conjugados son eficientes en la inducción de la protección (es decir, la reducción de las señales clínicas relacionadas con la enfermedad de *S. suis* y/o la reducción de los niveles de mortalidad). Efectivamente, el "fragmento adicional" indujo niveles significativos de anticuerpos, pero falló en proteger a los cerdos contra la enfermedad clínica (**Figura 12**). Por lo tanto, afirmar que un compuesto es una potencial vacuna candidata no se debería hacerse solamente en función de pruebas *in vitro*. En función de estudios de animales (cerdos), los conjugados **1**, **10** y **11** mostraron una protección fuerte a parcial y, por lo tanto, son dianas prometedoras para una formulación de vacuna.

[0076] En formas de realización de la invención, se proporcionan compuestos de las siguientes fórmulas generales: **A0, B0, C0, D0, E0, F0, A, B, C, D, E, F, A01, B01, C01, D01, E01, F01, A1, B1, C1, D1, E1, F1, A02, B02, C02, D02, E02 y F02**. Cada una de estas fórmulas generales es como se describe en detalle en la presente. Además, en formas de realización de la invención, se proporcionan compuestos de las siguientes fórmulas químicas: **A2, B2, C2, D2, E2 y F2**. Cada una de estas fórmulas es como se describe en detalle en la presente.

[0077] En formas de realización de la invención, los compuestos se preparan mediante un proceso que comprende una síntesis química y/o síntesis quimioenzimática.

[0078] En formas de realización de la invención, se proporciona una vacuna de glucoconjugado que comprende un compuesto de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente. En otras formas de realización, el compuesto se conjuga con una proteína portadora. En otras formas de realización, la proteína portadora es CRM 197, BSA, o una proteína de *Streptococcus suis* (*S. suis*). La proteína portadora también puede ser cualquier otra proteína portadora adecuada como se desee.

[0079] En formas de realización de la invención, se proporciona una formulación de vacuna que comprende un compuesto de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente, y un adyuvante. En otras formas de realización, el adyuvante es TiterMax Gold® o Montanide™ ISA 61 VG. El adyuvante también puede ser cualquier otro adyuvante adecuado como se desee.

[0080] En formas de realización de la invención, se proporciona una formulación de vacuna que comprende una vacuna de glucoconjugado de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente, y un adyuvante. En otras formas de realización, el adyuvante es TiterMax Gold® o Montanide™ ISA 61 VG. El adyuvante también puede ser cualquier otro adyuvante adecuado como

se desee.

[0081] En formas de realización de la invención, la formulación de vacuna está disponible comercialmente.

[0082] En formas de realización de la invención, la formulación de vacuna se usa en la producción de ganado. En otras formas de realización, la formulación de vacuna se usa en la producción de cerdos. En otras formas de realización, la formulación de vacuna se usa en la producción porcina.

[0083] En formas de realización de la invención, se proporciona un proceso para preparar una vacuna de glucoconjugado como se describió anteriormente en la presente. En otras formas de realización, el proceso comprende una síntesis química y/o síntesis quimoenzimática.

[0084] En formas de realización de la invención, se proporciona un método para prevenir una enfermedad asociada con *Streptococcus suis* (*S. suis*) en un mamífero. El método comprende administrar al mamífero un compuesto de acuerdo con la invención como se describió anteriormente en la presente, una vacuna de glucoconjugado de acuerdo con la invención como se describió anteriormente en la presente, o una formulación de vacuna de acuerdo con la invención como se describió anteriormente en la presente. En otras formas de realización, la enfermedad está asociada a un serotipo de *S. suis* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 1/2, 2, 3, 9 y 14. En otras formas de realización, la enfermedad está asociada al serotipo 2 de *S. suis*.

[0085] En formas de realización de la invención, se proporciona un uso de un compuesto de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente, una vacuna de glucoconjugado de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente, y una formulación de vacuna de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente, cada una para prevenir una enfermedad asociada con el *Streptococcus suis* (*S. suis*) en un mamífero. En otras formas de realización, la enfermedad está asociada a un serotipo de *S. suis* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 1/2, 2, 3, 9 y 14. En otras formas de realización, la enfermedad está asociada al serotipo 2 de *S. suis*.

[0086] En formas de realización de la invención, se proporciona un uso de un compuesto de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente, en la fabricación de una vacuna para prevenir una enfermedad asociada con el *Streptococcus suis* (*S. suis*) en un mamífero. En otras formas de realización, la enfermedad está asociada a un serotipo de *S. suis* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 1/2, 2, 3, 9 y 14. En otras formas de realización, la enfermedad está asociada al serotipo 2 de *S. suis*.

[0087] En formas de realización de la invención, se proporciona un compuesto de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente, una vacuna de glucoconjugado de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente, y una formulación de vacuna de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente, cada una para su uso en la prevención de una enfermedad asociada con el *Streptococcus suis* (*S. suis*) en un mamífero. En otras formas de realización, la enfermedad está asociada a un

serotipo de *S. suis* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 1/2, 2, 3, 9 y 14. En otras formas de realización, la enfermedad está asociada al serotipo 2 de *S. suis*.

[0088] En formas de realización de la invención, el mamífero es humano o no humano.

[0089] Como entenderá una persona del oficio de nivel medio, se pueden realizar otras variaciones y combinaciones a las diversas formas de realización de la invención como se describió anteriormente en la presente.

[0090] Además, como entenderá una persona del oficio de nivel medio, en las formas de realización de la invención, un grupo OH de cualquier compuesto se puede reemplazar por un grupo SH. En otras formas de realización de la invención, H en un grupo OH se puede reemplazar por un grupo alquilo inferior, tal como un grupo alquilo C1 a C3.

[0091] El alcance de las reivindicaciones no debe estar limitado por las formas de realización preferidas establecidas en los ejemplos, sino que se les debe dar la interpretación más amplia coherente con la descripción en su totalidad.

[0092] La presente descripción se refiere a una serie de documentos, cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

REFERENCIAS

1. WO 2017/062558A1.
2. Zhang S, Sella M, Sianturi J, Priegue P, Shen D, Seeberger PH. Discovery of Oligosaccharide Antigens for Semi-Synthetic Glycoconjugate vaccine leads against *Streptococcus suis* serotypes 2, 3, 9 and 14. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2021; 60(26):14679-14692. doi: 10.1002/anie.202103990. Epub, 19 de mayo de 2021. PMID: 33852172; PMCID: PMC8252040.
3. Susaki, H.; Suzuki, K.; Ikeda, M.; Yamada, H.; Watanabe, H. K., Synthesis of Artificial Glycoconjugates of Arginine-Vasopressin and Their Antidiuretic Activities, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 2090–2096.
4. Elsaidi, H. R. H.; Lowary, T. L., Effect of phenolic glycolipids from *Mycobacterium kansasii* on proinflammatory cytokine release. A structure–activity relationship study, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 3161–3172.
5. Deng, K.; Adams, M. M.; Gin, D. Y., Synthesis and Structure Verification of the Vaccine Adjuvant QS-7-Api. Synthetic Access to Homogeneous *Quillaja saponaria* Immunostimulants, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5860–5861.
6. Li, Z.; Gildersleeve, J. C., Mechanistic Studies and Methods To Prevent Aglycon Transfer of Thioglycosides, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11612–11619.
7. Bock, K.; Pedersen, C., A study of ^{13}C ,H coupling constants in hexopyranoses, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1974**, 293–297.
8. Sun, J.; Han, X.; Yu, B., Synthesis of a typical N-acetylglucosamine-containing saponin, oleanolic acid 3-yl α -L-arabinopyranosyl-(1,2)- α -L-arabinopyranosyl-(1,6)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside, *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 827–833.
9. Lu, X.; Kovac, P., Chemical Synthesis of the Galacturonic Acid Containing Pentasaccharide Antigen of the O-Specific Polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 and Its Five Fragments, *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 6374–6394.
10. Han, Z.; Chen, C.; Meng, C.; Gao, T.; Peng, P.; Chen, X.; Wang, F.; Cao, H., Chemoenzymatic synthesis of tumor-associated antigen N3 minor octasaccharide, *J. Carbohydr. Chem.* **2016**, 35, 412–422.
11. Fang, J.-L.; Tsai, T.-W.; Liang, C.-Y.; Li, J.-Y.; Yu, C.-C., Enzymatic Synthesis of Human Milk Fucosides α 1,2-Fucosyl para-Lacto-N-Hexaose and its Isomeric Derivatives, *Adv. Synth. Catal.* **2018**, 360, 3213–3219.
12. Xu, Y.; Fan, Y.; Ye, J.; Wang, F.; Nie, Q.; Wang, L.; Wang, P. G.; Cao, H.; Cheng, J., Successfully Engineering a Bacterial Sialyltransferase for Regioselective α 2,6-sialylation, *ACS Catal.* **2018**, 8, 7222–7227.
13. Kondo, H.; Aoki, S.; Ichikawa, Y.; Halcomb, R. L.; Ritzen, H.; Wong, C.-H., Glycosyl Phosphites as Glycosylation Reagents: Scope and Mechanism, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 864–877.
14. Zhang, Z.; Ollmann, I.; Ye, X.-S.; Wischnat, R.; Baasov, T.; Wong, C.-H., Programmable one-pot oligosaccharide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 734–753.
15. Xiong, C.; Feng, S.; Qiao, Y.; Guo, Z.; Gu, G., Synthesis and Immunological Studies of Oligosaccharides that Consist of the Repeating Unit of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 3 Capsular Polysaccharide, *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 8205–8216.

16. Lloyd, D.; Bylsma, M.; Bright, D. K.; Chen, X.; Bennett, C. S., Mild Method for 2-Naphthylmethyl Ether Protecting Group Removal Using a Combination of 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) and β -Pinene, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 3926–3934.
17. Liu, C.; Skogman, F.; Cai, Y.; Lowary, T., Synthesis of the 'primer-adaptor' trisaccharide moiety of Escherichia coli O8, O9, and O9a lipopolysaccharide, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 2818–2825.
18. Kelly, S. D.; Clarke, B. R.; Ovchinnikova, O. G.; Sweeney, R. P.; Williamson, M. L.; Lowary, T. L.; Whitfield, C., Klebsiella pneumoniae O1 and O2ac antigens provide prototypes for an unusual strategy for polysaccharide antigen diversification, *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 10863–10876.
19. Huang, Y.-L.; Hung, J.-T.; Cheung, S. K.; Lee, H.-Y.; Chu, K.-C.; Li, S.-T.; Lin, Y.-C.; Ren, C.-T.; Cheng, T.-J.; Hsu, T.-L.; Yu, A. L.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H., Carbohydrate-based vaccines with a glycolipid adjuvant for breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 2013, *110*, 2517–2522., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* **2013**, *110*, 2517–2522.
20. Kamath, V. P.; Diedrich, P.; Hindsgaul, O., Use of diethyl squarate for the coupling of oligosaccharide amines to carrier proteins and characterization of the resulting neoglycoproteins by MALDI-TOF mass spectrometry, *Glycoconj. J.* **1996**, *13*, 315–319.