

**(12) BREVET D'INVENTION BELGE**

(47) Date de publication : 14/05/2018

(21) Numéro de demande : BE2017/5163

(22) Date de dépôt : 16/03/2017

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : A61K 47/64

(30) Données de priorité :

05/04/2016 EP 16020113.3

(73) Titulaire(s) :

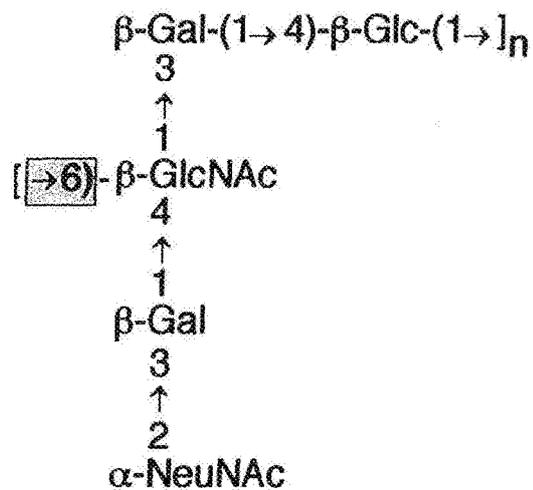
GSK Vaccines S.R.L.  
53100, SIENA  
Italie

(72) Inventeur(s) :

ADAMO Roberto  
53100 SIENA  
ItalieBERTI Francesco  
53100 SIENA  
ItalieCARBONI Filippo  
53100 SIENA  
ItalieMARGARIT Y ROS Immaculada  
53100 SIENA  
Italie**(54) COMPOSITIONS IMMUNOGENES**

(57) La présente invention concerne des conjugués comprenant des fragments du polysaccharide capsulaire du streptocoque du groupe B (SGB) de type III. Les fragments appropriés peuvent être produits par synthèse ou par dépolymérisation du polysaccharide natif.

FIG. 1



## BREVET D'INVENTION BELGE

SPF Economie, PME, Classes  
Moyennes & Energie

Numéro de publication : 1024634  
Numéro de dépôt : BE2017/5163

Office de la Propriété intellectuelle

Classification Internationale : A61K 47/64  
Date de délivrance : 14/05/2018

Le Ministre de l'Economie,

Vu la Convention de Paris du 20 mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle ;

Vu la loi du 28 mars 1984 sur les brevets d'invention, l'article 22, pour les demandes de brevet introduites avant le 22 septembre 2014 ;

Vu le Titre Ier "Brevets d'invention" du Livre XI du Code de droit économique, l'article XI.24, pour les demandes de brevet introduites à partir du 22 septembre 2014 ;

Vu l'arrêté royal du 2 décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, l'article 28 ;

Vu la demande de brevet d'invention reçue par l'Office de la Propriété intellectuelle en date du 16/03/2017.

Considérant que pour les demandes de brevet tombant dans le champ d'application du Titre Ier, du Livre XI du Code de Droit économique (ci-après CDE), conformément à l'article XI. 19, §4, alinéa 2, du CDE, si la demande de brevet a fait l'objet d'un rapport de recherche mentionnant un défaut d'unité d'invention au sens du §1er de l'article XI.19 précité et dans le cas où le demandeur n'effectue ni une limitation de sa demande ni un dépôt d'une demande divisionnaire conformément aux résultats du rapport de recherche, le brevet délivré sera limité aux revendications pour lesquelles le rapport de recherche a été établi.

### Arrête :

Article premier. - Il est délivré à

GSK Vaccines S.R.L., Via Fiorentina 1, 53100 SIENA Italie;

représenté par

PRONOVEM - Office Van Malderen, Avenue Josse Goffin 158, 1082, BRUXELLES;

un brevet d'invention belge d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles visées à l'article XI.48, §1 du Code de droit économique, pour : COMPOSITIONS IMMUNOGENES.

INVENTEUR(S) :

ADAMO Roberto, c/o GSK Vaccines S.R.L., Via Fiorentina 1, 53100, SIENA;

BERTI Francesco, c/o GSK Vaccines S.R.L., Via Fiorentina 1, 53100, SIENA;

CARBONI Filippo, c/o GSK Vaccines S.R.L., Via Fiorentina 1, 53100, SIENA;

MARGARIT Y ROS Immaculada, c/o GSK Vaccines S.R.L., Via Fiorentina 1, 53100, SIENA;

PRIORITE(S) :

05/04/2016 EP 16020113.3;

DIVISION :

divisé de la demande de base :

date de dépôt de la demande de base :

Article 2. – Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du (des) demandeur(s).

Bruxelles, le 14/05/2018,

Par délégation spéciale :

## COMPOSITIONS IMMUNOGÈNES

### Domaine technique

La présente invention concerne des conjugués comprenant des fragments du polysaccharide capsulaire du streptocoque du groupe B (SGB) du sérotype III. Les conjugués comprenant les fragments confèrent des taux  
5 d'immunoprotection supérieurs à ceux déclenchés par des conjugués comprenant le polysaccharide natif. Des fragments appropriés peuvent être produits par synthèse ou par dépolymérisation du polysaccharide natif.

### 10 Contexte

*Streptococcus agalactiae* (également connu sous le nom de « streptocoque du groupe B » ou « SGB ») est un micro-organisme  $\beta$ -hémolytique, Gram positif encapsulé qui colonise le système anogénital de 25 à 30 % des  
15 femmes en bonne santé. Il représente la cause principale de la septicémie et de la méningite néonatale, particulièrement chez les nourrissons nés de mères porteuses de la bactérie. Le pathogène peut également affecter des adultes souffrant d'une maladie sous-

jacente, particulièrement les personnes âgées. Chez les individus sensibles, tels que les personnes âgées, les enfants et les individus immunodéprimés, la bactérie peut devenir pathogène et provoquer une maladie telle que la méningite ou la septicémie.

La capsule du SGB est un facteur de virulence majeur permettant à la bactérie d'échapper aux défenses immunitaires innées de l'être humain. Elle est constituée de polymères de masse moléculaire élevée constitués de multiples unités répétitives (UR) identiques de quatre à sept monosaccharides. Le SGB peut être classé en dix sérotypes (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, et IX) différant dans la composition chimique et le profil des liaisons glycosidiques de leurs unités répétitives du polysaccharide capsulaire.

Les saccharides capsulaires du SGB sont en cours d'études pour une utilisation dans des vaccins. Toutefois, les saccharides sont des antigènes T-indépendants et ils sont généralement faiblement immunogènes. La conjugaison à un support peut convertir les antigènes T-indépendants en antigènes T-dépendants, amplifiant de cette façon les réponses de mémoire et permettant le développement d'une immunité protectrice. Par conséquent, les vaccins saccharidiques les plus efficaces sont à base de glycoconjugués. Un grand nombre de travaux sur les vaccins à base de polysaccharides capsulaires du SGB ont été effectués par Dennis Kasper et ses collègues (voir, par exemple, les références Paoletti *et al.* (1990), *J. Biol. Chem* 265: 18278-83 ; Wessels *et al.* (1990) *J Clin Invest* 86: 1428-33 ; Paoletti *et al.* (1992) *Infect Immun* 60: 400914 ; Paoletti

*et al.*, (1992) *J Clin Invest* 89: 203-9 ; Wessels *et al.* (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9170-4 ; Wang *et al.* (2003) *Vaccine* 21: 1112-7 ; Wessels *et al.* (1993) *Infect Immun* 61: 4760-6 ; Wessels *et al.* (1995) *J Infect Dis* 5 171: 879-84.

Il a été montré que les vaccins conjugués pour chacun des sérotypes Ia, Ib, II, III, et V du SGB sont sans risque et immunogènes chez les êtres humains. Toutefois, il demeure un besoin de développer d'autres 10 vaccins améliorés contre le SGB.

#### Résumé

Les demandeurs ont découvert que des conjugués comprenant certains fragments du polysaccharide 15 capsulaire du streptocoque du groupe B du sérotype III peuvent déclencher des titres en anticorps supérieurs aux conjugués comprenant le polysaccharide capsulaire natif.

Ainsi, dans un premier aspect de l'invention, il 20 est fourni un conjugué comprenant un fragment d'un polysaccharide capsulaire du SGB du sérotype III est une protéine de support dans lequel le fragment et un oligosaccharide comportant de 2 à 15 unités répétitives. En particulier, le conjugué présente un degré de 25 glycosylation de 2 à 20. Dans un mode de réalisation, l'oligosaccharide est un oligosaccharide synthétique. Dans un autre mode de réalisation, l'oligosaccharide est préparé par dépolymérisation du PSC du SGB. En particulier, l'oligosaccharide comprend de 2 à 11 unités 30 répétitives. De façon encore davantage particulière, l'oligosaccharide comprend de 3 à 9 unités répétitives.

En particulier, la protéine de support est choisie dans le groupe constitué de l'anatoxine diphtérique, CRM197 et l'anatoxine tétanique.

5 Dans un deuxième aspect de l'invention, il est fourni une composition comprenant le conjugué du premier aspect et un support pharmaceutiquement acceptable. En particulier, la composition est une composition immunogène. De façon encore davantage particulière, la composition est une composition vaccinale.

10 Dans un troisième aspect de l'invention, il est fourni un procédé de traitement d'un sujet infecté par le streptocoque du groupe B comprenant l'administration à un sujet d'un conjugué du premier aspect ou de la composition du deuxième aspect.

15 Dans un quatrième aspect de l'invention, il est fourni une composition du deuxième aspect pour une utilisation dans un procédé de traitement ou de prévention d'une maladie.

#### 20 Brève description des figures

Figure 1 - La structure de l'unité répétitive du polysaccharide capsulaire du SGB du sérotype III (Gal = galactose, Glc = glucose, GlcNAc = N-acétylglucosamine, NeuNAc = acide N-acétylneuraminique (acide sialique)).

25 Figure 2 - Chromatogramme de CLHP des oligosaccharides élués (polysaccharides capsulaires du SGB du sérotype III dépolymérisés (DP)) avec une longueur de chaîne différente, où DP2 indique des oligosaccharides comportant deux unités répétitives, DP3  
30 indique des oligosaccharides comportant 3 unités répétitives, etc.

Figure 3 - RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) du matériau de polysaccharide capsulaire du SGB du sérotype III dépolymérisé contre le polysaccharide pleine longueur.

Figure 4A - Fournit la structure de l'unité  
5 répétitive du polysaccharide du SGB du sérotype III.

Figure 4B - Fournit la structure du fragment 1 du pentasaccharide linéaire DP1 (composé 1).

Figure 4C - Fournit la structure du fragment 2 du pentasaccharide ramifié DP1 (composé 2).

10 Figure 4D - Fournit la structure du fragment 3 du pentasaccharide en forme de Y DP1 (composé 3).

Figure 5 - Schéma de la synthèse du fragment synthétique 1 (composé 1).

Figure 6 - Synthèse du fragment synthétique 2  
15 (composé 2).

Figure 7 - Synthèse du fragment synthétique 3 (composé 3).

Figures 8A-B - Spectres MALDI TOF des oligosaccharides conjugués.

20 Figure 9A - Expériences ELISA par compétition montrant une capacité dépendante de la longueur des oligosaccharides à inhiber la liaison d'un Acm anti-PSIII au PSIII natif.

Figure 9B - Compétition par RPS de la liaison du  
25 PSIII natif au Fab par les oligosaccharides.

Figure 10 - Titres ELISA des anti-PSIII mesurés dans des sérums de souris immunisées avec le GBS59-PSIII (5  $\mu\text{g}$ ) en utilisant des conjugués de CRM197 de trois fragments synthétiques en tant que réactifs de  
30 sensibilisation.

Figures 11A-B - Titres des anti-PSIII (11A) et OPKA (11B) dans les sérums de souris immunisées avec des glycoconjugués d'oligosaccharides.

Figure 12A - Effet du rapport saccharide/protéine dans les DP 2 et 3 conjugués mesuré par un test ELISA. Le diagramme montre le calcul de la valeur P (test de Mann-Whitney). Les valeurs entre parenthèses représentent le rapport molaire saccharide/protéine (degré de glycosylation).

Figure 12B - Effet du rapport saccharide/protéine dans les DP 2 et 3 conjugués mesuré par OPKA. Les valeurs entre parenthèses représentent le rapport molaire saccharide/protéine (degré de glycosylation).

#### 15 Description détaillée

Les structures chimiques précises des polysaccharides capsulaires (PSC) des SGB des sérotypes Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII et IX sont bien décrites dans la littérature. Elles sont composées d'unités répétitives de quatre à sept monosaccharides avec un squelette et une ou deux chaînes latérales. Une unité répétitive (UR) est la partie du polysaccharide capsulaire dont la répétition par liaison des unités répétitives ensemble successivement produit le polysaccharide complet.

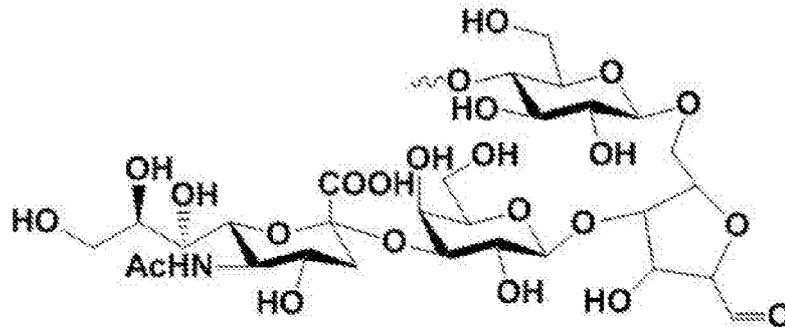
Le PSC du SGB du sérotype III (également appelé ici PSIII) possède un squelette d'unités répétitives du trisaccharide  $[\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-N-acétyl-glucosamine-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-galactose-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-glucose-(1}\rightarrow ]$ . Chaque unité répétitive porte une chaîne latérale disaccharidique d'acide  $\alpha\text{-D-N-acétylneuraminique-(2}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-galactose,$

liée en 1→4 par l'intermédiaire du galactose au squelette de N-acétyl-glucosamine (figure 1).

Alors que certains fragments du polysaccharide du SGB du sérotype III sont connus dans l'art, les inventeurs ont découvert une population spécifique ou un sous-ensemble de fragments présentant une immunogénicité amplifiée comparativement à d'autres fragments ou au polysaccharide capsulaire pleine longueur, par exemple.

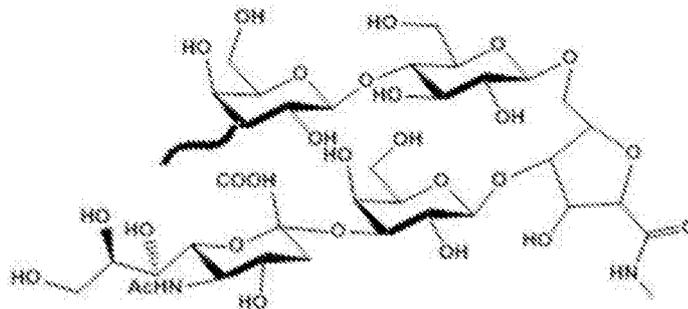
Généralement, le terme « polysaccharide » (PS) se rapporte à un saccharide comportant d'environ 50 à environ 2000 unités répétitives ou plus. Le terme « fragment » se rapporte à une partie du polysaccharide capsulaire, particulièrement un « oligosaccharide » comportant d'environ 2 à environ 20 unités répétitives, particulièrement de 2 à 15 unités répétitives, de façon encore davantage particulière de 2 à 11 unités répétitives, 2 à 9 unités répétitives, 2 à 7 unités répétitives, de 3 à 7 unités répétitives, par exemple, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 unités répétitives. Le terme « dérivé » tel qu'utilisé ici se rapporte de façon générale à toute molécule apparentée structurellement comportant le même échafaudage que l'unité répétitive mais qui est modifiée par l'addition, la délétion ou la substitution d'un ou de plusieurs groupes fonctionnels. Par exemple, un dérivé de l'unité répétitive peut comprendre un remplacement d'un ou de plusieurs des groupes hydroxyle par un groupe fonctionnel différent ou par l'addition d'un substituant tel qu'un groupe lieur. Dans certains modes de réalisation, la réduction du groupe aldéhyde des oligosaccharides du SGB III peut être obtenue par traitement avec du NaBH<sub>4</sub> pour produire

une unité répétitive modifiée ayant la structure suivante :



5

Dans d'autres modes de réalisation, une unité répétitive modifiée a la structure suivante :



10

#### Préparation des oligosaccharides

Les saccharides capsulaires peuvent être purifiés par des techniques connues, telles que décrites, par exemple, dans Wessels *et al.* (1990) *J. Clin. Invest.* 86: 1428-33 et Wessels *et al.* (1989) *Infect Immun* 57: 1089-94. Un procédé type implique une extraction par une base, une centrifugation, une filtration, un traitement à la RNase/DNase, un traitement aux protéases, une concentration, une chromatographie d'exclusion, une ultrafiltration, une chromatographie d'échange d'anions, et une autre ultrafiltration. Le traitement des cellules

de SGB avec l'enzyme mutanolysine, qui clive la paroi de la cellule bactérienne pour libérer les composants de la paroi bactérienne, est également utile. Comme variante, le procédé de purification décrit dans le document  
5 WO 2006/082527 peut être utilisé. Celui-ci implique une extraction par une base, un traitement à l'éthanol/CaCl<sub>2</sub>, une précipitation au CTAB, et une resolubilisation. Une autre variante de procédé est décrite dans le document WO 2009/081276.

10 Les oligosaccharides de l'invention sont plus courts que le polysaccharide capsulaire natif, et ils peuvent être chimiquement modifiés. Les polysaccharides pleine longueur peuvent être dépolymérisés pour donner des fragments plus courts pour une utilisation avec  
15 l'invention, par exemple, par hydrolyse dans un acide doux, par chauffage, par chromatographie d'exclusion, etc. En particulier, le polysaccharide capsulaire du sérotype III utilisé dans l'invention peut être dépolymérisé comme il est décrit dans Michon *et al.* (2006)  
20 Clin. Vaccine Immunol. Août 2006; 13(8): 936-43. Ce document décrit la dépolymérisation partielle des saccharides capsulaires du sérotype III par clivage avec désamination douce en fragments antigéniques comportant des résidus 2,5-anhydro-D-mannose terminaux réducteurs.  
25 En bref, le saccharide capsulaire est dissous dans du NaOH 0,5 N et chauffé à 70 °C pendant une période située entre 1 et 4 h. La longueur de cette incubation contrôle le degré de dépolymérisation, qui peut être déterminé par des procédés classiques (par exemple, par CLHP comme  
30 il est décrit dans le document WO 96/40795). L'échantillon est placé dans un bain de glace-eau avant

l'addition d'acide acétique glacial pour amener le pH à 4. Le produit partiellement N-désacylé est ensuite désaminé par l'addition de NaNO<sub>2</sub> à 5 % (p/v) avec agitation à 4 °C pendant 2 h. Les aldéhydes libres des résidus de 2,5-anhydro-D-mannose nouvellement formés peuvent être utilisés pour la conjugaison à une protéine de support. Il a été rapporté la dépolymérisation du saccharide capsulaire du sérotype III par l'endo-β-galactosidase (Paoletti *et al.* 1990 J. Biol. Chem. 265: 18278-83 ; Paoletti *et al.* (1992) J Clin Invest 99: 203-9 ; Wessels *et al.* (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84: 9170-4 ; Wang *et al.* (2003) Vaccine 21: 1112-7) comprenant l'utilisation du matériau dépolymérisé pour former des conjugués avec un support d'anatoxine tétanique. L'ozonolyse des polysaccharides capsulaires issus des SGB des sérotypes III et VIII a été également utilisée pour la dépolymérisation (US 6 027 733 et US 6 274 144).

Toutefois, l'invention n'est pas limitée à des oligosaccharides purifiés à partir de sources naturelles, et les saccharides peuvent être obtenus par d'autres procédés, tels qu'une synthèse totale ou partielle.

Dans certains modes de réalisation, l'oligosaccharide comprend au moins un lieu pour la conjugaison à une protéine de support. Dans d'autres modes de réalisation, l'oligosaccharide comprend au moins une unité répétitive modifiée pour la conjugaison à une protéine de support.

### Conjugaison des oligosaccharides

En général, une conjugaison covalente des oligosaccharides à des supports amplifie l'immunogénicité des oligosaccharides car elle les convertit d'antigènes T-indépendants en antigènes T-dépendants, permettant ainsi l'amorçage de la mémoire immunologique. Le terme « conjugué » se rapporte à un oligosaccharide lié de façon covalente à une protéine de support. Dans certains modes de réalisation, un oligosaccharide est lié directement à une protéine de support. Dans d'autres modes de réalisation, un oligosaccharide est lié indirectement à une protéine par l'intermédiaire d'un espaceur ou d'un lieur. Tel qu'utilisé ici, le terme « lié directement » signifie que les deux entités sont reliées par une liaison chimique, de préférence une liaison covalente. Tel qu'utilisé ici, le terme « lié indirectement » signifie que les deux entités sont reliées par un radical de liaison (par opposition à une liaison covalente directe). Dans certains modes de réalisation, le lieur est le dihydrazide de l'acide adipique. Dans d'autres modes de réalisation, le lieur est un dérivé d'une unité répétitive. Les conjugués représentatifs conformément à la présente invention comprennent ceux formés en joignant ensemble l'oligosaccharide avec la protéine de support. La liaison covalente des oligosaccharides aux protéines est connue dans l'art et est généralement obtenue par ciblage des amines des lysines, des groupes carboxyliques des acides aspartique/glutamique ou des sulfhydryles des cystéines. Par exemple, les esters cyanates formés de façon aléatoire à partir des

hydroxyles des sucres peuvent être mis à réagir avec les lysines de la protéine ou l'hydrazine d'un espaceur qui sont ensuite condensés en acides carboxyliques de la protéine de support par l'intermédiaire de la chimie des carbodiimides. En variante, les aldéhydes produits par l'oxydation aléatoire de periodate peuvent être soit utilisés directement pour une amination réductrice sur les amines de la protéine de support, soit convertis en amines à la suite de l'insertion d'un espaceur permettant l'étape de conjugaison à la protéine par l'intermédiaire de la formation de liaisons thioester ou amide. Une autre stratégie emploie l'hydrolyse partielle de l'oligosaccharide purifié et un fractionnement subséquent pour sélectionner la population de fragments ayant une taille moyenne définie. Un groupe amino primaire peut être ensuite introduit aux extrémités réductrices de l'oligosaccharide à utiliser finalement pour l'insertion soit d'un diester soit d'un lieu bifonctionnel pour la conjugaison à la protéine.

Le terme « protéine de support » se rapporte à une protéine à laquelle l'oligosaccharide est couplé ou fixé ou conjugué, généralement dans l'objectif d'amplifier ou de faciliter la détection de l'antigène par le système immunitaire. Les oligosaccharides sont des antigènes T-indépendants qui sont faiblement immunogènes et ne conduisent pas à des réponses immunoprotectrices à long terme. La conjugaison de l'antigène oligosaccharidique à une protéine de support change le contexte dans lequel les cellules immunitaires effectrices répondent aux oligosaccharides. Le terme protéine de support est censé couvrir à la fois les petits peptides et les gros

polypeptides (> 10 kDa). La protéine de support peut comprendre un ou plusieurs épitopes de lymphocytes T auxiliaires.

Les protéines de support utiles comprennent des  
5 toxines ou des anatoxines bactériennes, telles que  
l'anatoxine diphtérique ou l'anatoxine tétanique. Des  
fragments des toxines ou des anatoxines peuvent être  
également utilisés, par exemple, le fragment C de  
l'anatoxine tétanique (référence 8). Le mutant CRM<sub>197</sub> de  
10 la toxine diphtérique (références 9 à 11) est  
particulièrement utile avec l'invention. D'autres  
protéines de support appropriées comprennent la protéine  
de la membrane externe de *N. meningitidis* (référence 12),  
des peptides synthétiques (références 13 et 14), des  
15 protéines de choc thermique (références 15 et 16), des  
protéines pertussiques (références 17 et 18), des  
cytokines (référence 19), des lymphokines (référence 19),  
des hormones (référence 19), des facteurs de croissance  
(référence 19), la sérumalbumine humaine (de préférence  
20 recombinante), des protéines artificielles comprenant de  
multiples épitopes de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humains  
provenant de divers antigènes dérivés de pathogènes  
(référence 20) telles que N19 (référence 21), la  
protéine D de *H. influenzae* (références 22 et 23), la  
25 protéine de surface pneumococcique PspA (référence 24),  
la pneumolysine (référence 25), des protéines de capture  
du fer (référence 26), la toxine A ou B de *C. difficile*  
(référence 27), l'exoprotéine A recombinante de  
*Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) (référence 28), une  
30 protéine du SGB, etc.

Les protéines de support particulièrement appropriées comprennent CRM197, l'anatoxine tétanique (TT), le fragment C de l'anatoxine tétanique, la protéine D, les mutants non toxiques de la toxine tétanique et l'anatoxine diphtérique (DT). D'autres protéines de support appropriées comprennent les antigènes protéiniques GBS80, GBS67 et GBS59 de *Streptococcus agalactiae* et des protéines de fusion, par exemple, GBS59(6xD3) divulguée dans le document WO 2011/121576 et GBS59(6xD3)-1523 divulguée dans le document EP 14179945.2. L'utilisation de tels antigènes protéiniques du SGB peut être avantageuse pour un vaccin contre le SGB parce que, au contraire des supports hétérologues comme CRM197, la protéine a un rôle double d'augmentation de l'immunogénicité de l'oligosaccharide tout en provoquant également une réponse immunoprotectrice. Par conséquent, la réponse immunologique déclenchée contre le support peut fournir une réponse immunologique protectrice supplémentaire contre le SGB, particulièrement contre une protéine du SGB.

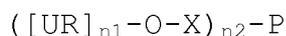
Tel qu'utilisé ici, le terme « degré de glycosylation » se rapporte au nombre d'oligosaccharides par molécule de protéine de support et il est calculé sur la base de la concentration en protéine et glucide. Il a été trouvé qu'un chargement situé entre 2 et 9 oligosaccharides par molécule de protéine de support est optimal. Il faudra comprendre que de telles valeurs de chargement, et ainsi le degré de glycosylation, sont des valeurs moyennes reflétant tous les conjugués dans l'échantillon. En variante, le degré de glycosylation

peut être décrit en référence au rapport oligosaccharide/protéine (p/p). Par exemple, un rapport situé entre 1/5 (c'est-à-dire, un excès de protéine) et 10/1 (c'est-à-dire, un excès d'oligosaccharide).

5 Les compositions peuvent comprendre une petite quantité de support libre (référence 29). Lorsqu'une protéine de support donnée est présente sous forme à la fois libre et conjuguée dans une composition de l'invention, la forme non conjuguée est de préférence de pas plus de 5 % de la quantité totale de la protéine de support dans la composition comme un tout, et de façon davantage préférée présente à moins de 2 % en poids.

Après la conjugaison, les oligosaccharides libres et conjugués peuvent être séparés. Il existe de nombreux procédés appropriés, y compris la chromatographie hydrophobe, l'ultrafiltration tangentielle, la diafiltration, etc. (voir également les références 30 et 31, etc.). Un procédé préféré est décrit dans la référence 32.

20 En particulier, les conjugués de l'invention auront la formule générale :



25 Dans laquelle UR représente l'unité répétitive du PS III du SGB,  $1 < n1 < 12$ ,  $1 < n2 < 20$ , P représente une protéine de support.

#### Compositions immunogènes

30 L'invention fournit en outre une composition immunogène comprenant un conjugué qui comprend au moins

un oligosaccharide conjugué à une protéine de support. Les compositions immunogènes peuvent comprendre toute quantité appropriée d'oligosaccharide(s) par dose unitaire. Les quantités appropriées d'oligosaccharide(s) peuvent être de 0,1 à 50 µg par dose unitaire. Généralement, chaque oligosaccharide est présent à une quantité de 1 à 30 µg, par exemple, de 2 à 25 µg, et en particulier de 5 à 20 µg.

Les procédés d'administration des compositions immunogènes de l'invention sont discutés ci-dessous. En bref, les compositions immunogènes de l'invention peuvent être administrées dans des doses simples ou multiples. Les inventeurs ont découvert que l'administration d'une dose simple des compositions immunogènes de l'invention est efficace. En variante, une dose unitaire suivie d'une seconde dose unitaire peut être efficace. Généralement, la seconde (ou troisième, quatrième, cinquième, etc.) dose unitaire est identique à la première dose unitaire. La seconde dose unitaire peut être administrée à tout moment approprié après la première dose unitaire, en particulier après 1, 2 ou 3 mois. Généralement, les compositions immunogènes de l'invention seront administrées par voie intramusculaire, par exemple, par administration intramusculaire dans la cuisse ou le haut du bras comme il est décrit ci-dessous.

Les compositions immunogènes de l'invention peuvent comprendre un ou plusieurs adjuvants. Toutefois, l'utilisation de compositions non adjuvées est également envisagée, par exemple, il peut être avantageux d'omettre les adjuvants afin de réduire la toxicité

potentielle. Par conséquent, des compositions immunogènes qui ne contiennent aucun adjuvant ou qui ne contiennent aucun adjuvant à base de sel d'aluminium sont envisagées.

5

#### Combinaisons de conjugués et d'autres antigènes

Les compositions immunogènes de l'invention peuvent comprendre un ou plusieurs autres antigènes. Le ou les autres antigènes peuvent comprendre d'autres conjugués  
10 comprenant des oligosaccharides dérivés des polysaccharides capsulaires du SGB. Les différents conjugués du SGB peuvent comprendre différents types de conjugués issus du même sérotype du SGB et/ou des conjugués issus de sérotypes différents du SGB. La  
15 composition sera généralement produite par la préparation des conjugués séparés (par exemple, un conjugué différent pour chaque sérotype) et ensuite la combinaison des conjugués.

Le ou les autres antigènes peuvent comprendre des  
20 antigènes protéiniques issus du SGB. Le ou les autres antigènes peuvent comprendre des antigènes provenant de pathogènes non-SGB. Ainsi, les compositions de l'invention peuvent comprendre en outre un ou plusieurs antigènes non-SGB, y compris des antigènes bactériens,  
25 viraux ou parasitaires supplémentaires. Ceux-ci peuvent être choisis parmi les suivants :

- un antigène protéinique de *N. meningitidis* du séro groupe B, tel que ceux dans les références 33 à 39, avec la protéine '287' (voir ci-dessous) et ses dérivés  
30 (par exemple, ' $\Delta$ G287') étant particulièrement préférés ;

- une préparation de vésicules de la membrane externe (OMV) de *N. meningitidis* du sérogroupe B, telle que celles divulguées dans les références 40 à 43, etc. ;

5 - un antigène saccharidique de *N. meningitidis* du sérogroupe A, C, W135 et/ou Y, tel que l'oligosaccharide divulgué dans la référence 44 issu du sérogroupe C ou les oligosaccharides de la référence 45 ;

10 - un antigène saccharidique de *Streptococcus pneumoniae* (par exemple, références 46 à 48, chapitres 22 et 23 de la référence 55) ;

- un antigène du virus de l'hépatite A, tel qu'un virus inactivé (par exemple, références 49 et 50, chapitre 15 de la référence 55) ;

15 - un antigène du virus de l'hépatite B, tel que les antigènes de la surface et/ou core (par exemple, références 50, 51, chapitre 16 de la référence 55) ;

- un antigène du virus de l'hépatite C (par exemple, référence 52) ;

20 - un antigène de *Bordetella pertussis*, tel que l'holotoxine pertussique (PT) et l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) de *B. pertussis*, éventuellement aussi en combinaison avec la pertactine et/ou les agglutinogènes 2 et 3 (par exemple, références 53 et 54, chapitre 21 de la référence 55) ;

25 - un antigène diphtérique, tel que l'anatoxine diphtérique (par exemple, chapitre 13 de la référence 55) ;

- un antigène tétanique, tel que l'anatoxine tétanique (par exemple, chapitre 25 de la référence 55) ;

- un antigène saccharidique de *Haemophilus influenzae* B (Hib) (par exemple, chapitre 14 de la référence 55) ;
- un antigène de *N. gonorrhoeae* (par exemple, 5 références 33 à 35) ;
- un antigène de *Chlamydia pneumoniae* (par exemple, références 56 à 62) ;
- un antigène de *Chlamydia trachomatis* (par exemple, référence 63) ;
- 10 - un antigène de *Porphyromonas gingivalis* (par exemple, référence 64) ;
- un ou plusieurs antigènes de la polio [par exemple, références 65 et 66 ; chapitre 24 de la référence 55) tel que l'IPV ;
- 15 - un ou plusieurs antigènes de la rage (par exemple, référence 67) tel que le virus inactivé lyophilisé (par exemple, référence 68, RABAVERT™) ;
- des antigènes de la rougeole, des oreillons et/ou de la rubéole (par exemple, chapitres 19, 20 et 26 de la 20 référence 55) ;
- un ou plusieurs antigènes grippaux (par exemple, chapitres 17 et 18 de la référence 55), tels que les protéines de la surface hémagglutinine et/ou neuraminidase ;
- 25 - un antigène de *Moraxella catarrhalis* (par exemple, référence 69) ;
- un antigène de *Streptococcus pyogenes* (streptocoque du groupe A) (par exemple, références 70 à 72) ;
- 30 - un antigène de *Staphylococcus aureus* (par exemple, référence 73).

Lorsqu'un antigène saccharidique ou glucidique est utilisé, il est conjugué de préférence à un support afin d'amplifier l'immunogénicité. La conjugaison des antigènes saccharidiques de *H. influenzae* B, méningococciques et pneumococciques est bien connue. Les antigènes protéiniques toxiques peuvent être détoxifiés lorsque c'est nécessaire (par exemple, détoxification de la toxine pertussique par des moyens chimiques et/ou génétiques (voir la référence 54)). Lorsqu'un antigène diphtérique est inclus dans la composition, il est également préféré d'inclure un antigène tétanique et des antigènes pertussiques. De façon similaire, lorsqu'un antigène tétanique est inclus, il est également préféré d'inclure des antigènes diphtériques et pertussiques. De façon similaire, lorsqu'un antigène pertussique est inclus, il est également préféré d'inclure des antigènes diphtériques et tétaniques. Les antigènes peuvent être absorbés sur un sel d'aluminium. Lorsqu'il y a plus d'un conjugué dans une composition, tous les conjugués n'ont pas besoin d'être adsorbés.

Un type de composition préférée comprend d'autres antigènes qui touchent les personnes âgées et/ou les immunodéprimés, et ainsi les antigènes du SGB de l'invention peuvent être combinés avec un ou plusieurs antigènes issus des pathogènes non-SGB suivants : le virus de la grippe, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, et le virus parainfluenza.

Les antigènes dans la composition seront généralement présents à une concentration d'au moins 1 µg/ml chacun. En général, la concentration de tout antigène donné sera suffisante pour déclencher une  
5 réponse immunitaire contre cet antigène.

En termes pratiques, il peut y avoir une limite supérieure au nombre d'antigènes inclus dans les compositions de l'invention. Le nombre d'antigènes (y compris les antigènes du SGB) dans une composition de  
10 l'invention peut être inférieur à 20, inférieur à 19, inférieur à 18, inférieur à 17, inférieur à 16, inférieur à 15, inférieur à 14, inférieur à 13, inférieur à 12, inférieur à 11, inférieur à 10, inférieur à 9, inférieur à 8, inférieur à 7, inférieur à 6, inférieur à 5,  
15 inférieur à 4, inférieur à 3, ou inférieur à 2. Le nombre d'antigènes du SGB dans une composition de l'invention peut être inférieur à 6, inférieur à 5, inférieur à 4, inférieur à 3, ou inférieur à 2.

## 20 Procédés pharmaceutiques et utilisations

Les compositions immunogènes de l'invention peuvent comprendre en outre un support pharmaceutiquement acceptable. Les « supports pharmaceutiquement acceptables » types comprennent tout support qui  
25 n'induit pas lui-même la production d'anticorps nocifs pour l'individu recevant la composition. Les supports appropriés sont généralement des grosses macromolécules métabolisées lentement comme des protéines, des polysaccharides, des polyacides lactiques, des  
30 polyacides glycoliques, des acides aminés polymères, des copolymères d'acides aminés, le saccharose (voir, par

exemple, la référence 74), le tréhalose (voir, par exemple, la référence 75), le lactose, et des agrégats de lipides (tels que des gouttelettes d'huile ou des liposomes). De tels supports sont bien connus d'une  
5 personne de compétence moyenne dans le domaine. Les vaccins peuvent également contenir des diluants, tels que l'eau, le sérum physiologique, le glycérol, etc. En outre, des substances auxiliaires, telles que des agents de mouillage ou émulsifiants, des substances tampons du  
10 pH, et analogues, peuvent être présentes. La solution saline physiologique tampon phosphate apyrogène stérile est un support type. Une discussion approfondie sur les excipients pharmaceutiquement acceptables est disponible en référence (voir, par exemple, la référence 76).

15 Les compositions de l'invention peuvent être sous forme aqueuse (c'est-à-dire, des solutions ou des suspensions) ou sous une forme séchée (par exemple, lyophilisée). Si un vaccin séché est utilisé alors il sera reconstitué dans un milieu liquide avant injection.  
20 La lyophilisation de vaccins conjugués est connue dans l'art, par exemple, le produit MENJUGATE™ est présenté sous forme lyophilisée. Lorsque les compositions immunogènes de l'invention comprennent d'autres conjugués, il est typique que les conjugués soient  
25 préparés séparément, mélangés et ensuite lyophilisés. De cette façon, des compositions lyophilisées comprenant deux, trois ou quatre, etc. conjugués tels que décrits ici peuvent être préparées. Pour stabiliser les conjugués durant la lyophilisation, il peut être préféré  
30 d'inclure un alcool de sucre (par exemple, du mannitol) et/ou un disaccharide (par exemple, du saccharose ou du

tréhalose), par exemple, dans une concentration de 1 mg/ml et 30 mg/ml (par exemple, environ 25 mg/ml) dans la composition. L'utilisation de saccharose a été recommandée en tant que stabilisant pour les vaccins à base de conjugués du SGB (voir, par exemple, la référence 77). Toutefois, il est typique que le stabilisant de la présente invention soit du mannitol. Lorsque le vaccin séché est reconstitué dans un milieu liquide avant injection, la concentration du mannitol résiduel sera généralement d'environ 2 à 20 mg/ml, par exemple, 3,75 mg/ml, 7,5 mg/ml ou 15 mg/ml. L'utilisation de mannitol est avantageuse parce que le mannitol est chimiquement distinct des unités répétitives de monosaccharide des saccharides capsulaires du SGB. Ceci signifie que la détection des saccharides capsulaires, par exemple, pour l'analyse de contrôle de qualité, peut être basée sur la présence des unités répétitives des saccharides sans interférence du mannitol. Au contraire, un stabilisant comme le saccharose contient du glucose, qui peut interférer avec la détection des unités répétitives de glucose dans les saccharides.

Les compositions peuvent se présenter dans des flacons, ou elles peuvent se présenter dans des seringues déjà remplies. Les seringues peuvent être fournies avec ou sans aiguille. Une seringue comprendra une dose simple de la composition, tandis qu'un flacon peut comprendre une dose simple ou des doses multiples. Les compositions aqueuses de l'invention sont également appropriées pour reconstituer d'autres vaccins à partir d'une forme lyophilisée. Lorsqu'une composition de l'invention doit

être utilisée pour une telle reconstitution extemporanée, l'invention fournit un kit, qui peut comprendre deux flacons, ou peut comprendre une seringue déjà remplie et un flacon, avec le contenu de la seringue étant utilisé  
5 pour réactiver le contenu du flacon avant injection.

Les compositions de l'invention peuvent être conditionnées sous une forme de dose unitaire ou sous une forme de doses multiples. Pour les formes de doses multiples, les flacons sont préférés aux seringues déjà  
10 remplies. Les volumes posologiques efficaces peuvent être établis en routine, mais une dose humaine type de la composition a un volume de 0,5 ml, par exemple, pour une injection intramusculaire.

Le pH de la composition se situe de préférence entre  
15 6 et 8, de préférence environ 7. Un pH stable peut être maintenu par l'utilisation d'un tampon. Les compositions immunogènes de l'invention comprennent généralement un tampon de dihydrogénophosphate de potassium. Le tampon de dihydrogénophosphate de potassium peut comprendre  
20 environ 1 à 10 mM de dihydrogénophosphate de potassium, par exemple, 1,25 mM, 2,5 mM ou 5,0 mM. Si une composition comprend un sel d'hydroxyde d'aluminium, il est préféré d'utiliser un tampon histidine (voir, par exemple, la référence 78). La composition peut être  
25 stérile et/ou apyrogène. Les compositions de l'invention peuvent être isotoniques par rapport aux êtres humains.

Les compositions de l'invention sont immunogènes, et sont de façon davantage préférée des compositions vaccinales. Les vaccins selon l'invention peuvent être  
30 soit prophylactiques (c'est-à-dire, pour prévenir une infection ou une maladie) soit thérapeutiques (c'est-à-

dire, pour traiter une infection ou une maladie), mais ils seront généralement prophylactiques. Les compositions immunogènes utilisées en tant que vaccins comprennent une quantité immunologiquement efficace d'antigène(s), ainsi que tout autre composant, selon les besoins. Par « quantité immunologiquement efficace », il est signifié que l'administration de cette quantité à un individu, soit dans une dose simple soit faisant partie d'une série, est efficace pour le traitement ou la prévention. Cette quantité varie selon la santé et l'état physique de l'individu à traiter, l'âge, le groupe taxonomique de l'individu à traiter (par exemple, primate non humain, primate, etc.), la capacité du système immunitaire de l'individu à synthétiser des anticorps, le degré de protection souhaité, la formulation du vaccin, l'estimation du médecin traitant de la situation médicale, et d'autres facteurs pertinents. On s'attend à ce que la quantité se situe au sein d'une plage relativement large qui peut être déterminée par l'intermédiaire d'essais de routine.

Au sein de chaque dose, la quantité d'un antigène saccharidique individuel sera généralement située entre 0,1 et 50  $\mu\text{g}$  (mesurée en masse de saccharide), particulièrement entre 1 et 50  $\mu\text{g}$  ou 0,5 à 25  $\mu\text{g}$ , plus particulièrement 2,5 à 7,5  $\mu\text{g}$ , par exemple, environ 1  $\mu\text{g}$ , environ 2,5  $\mu\text{g}$ , environ 5  $\mu\text{g}$ , environ 10  $\mu\text{g}$ , environ 15  $\mu\text{g}$ , environ 20  $\mu\text{g}$  ou environ 25  $\mu\text{g}$ . Au sein de chaque dose, la quantité totale de saccharides capsulaires chimériques sera généralement  $\leq 70 \mu\text{g}$  (mesurée en masse de saccharide), par exemple,  $\leq 60 \mu\text{g}$ . En particulier, la quantité totale peut être  $\leq 40 \mu\text{g}$  (par exemple,  $\leq 30 \mu\text{g}$ )

ou  $\leq 20 \mu\text{g}$  (par exemple,  $\leq 15 \mu\text{g}$ ). Il peut être  
avantageux de minimiser la quantité totale de  
saccharide(s) capsulaire(s) chimérique(s) par dose  
unitaire afin de réduire la toxicité potentielle. Par  
5 conséquent, une quantité totale  $\leq 20 \mu\text{g}$  peut être  
utilisée, par exemple,  $\leq 15 \mu\text{g}$ ,  $\leq 7,5 \mu\text{g}$  ou  $\leq 1,5 \mu\text{g}$ .

Le SGB touche différentes zones du corps et ainsi  
les compositions de l'invention peuvent être préparées  
sous diverses formes. Par exemple, les compositions  
10 peuvent être préparées sous la forme d'injectables, sous  
la forme soit de solutions soit de suspensions liquides.  
La composition peut être préparée pour une  
administration pulmonaire, par exemple, sous la forme  
d'un inhalateur, en utilisant une poudre fine ou une  
15 pulvérisation. La composition peut être préparée sous la  
forme d'un suppositoire ou d'un ovule. La composition  
peut être préparée pour une administration nasale,  
auriculaire ou oculaire, par exemple, sous la forme d'une  
pulvérisation, de gouttes, d'un gel ou de poudre (par  
20 exemple, références 79 et 80). Le succès d'une  
administration nasale de saccharides pneumococciques  
(références 81 et 82), de saccharides de Hib  
(référence 83), de saccharides de MenC (référence 84) et  
de mélanges de conjugués saccharidiques de Hib et de  
25 MenC (référence 85) a été rapporté.

Les compositions de l'invention peuvent comprendre  
un antimicrobien, particulièrement lors d'un  
conditionnement sous format de doses multiples.

Les compositions de l'invention peuvent comprendre  
30 un détergent, par exemple, un TWEEN™ (polysorbate), tel

que TWEEN™ 80. Les détergents sont généralement présents à des taux bas, par exemple, < 0,01 %.

Les compositions de l'invention peuvent comprendre des sels de sodium (par exemple, du chlorure de sodium) pour donner la tonicité. Une concentration de 10 ± 2 mg/ml de NaCl est typique. Dans certains modes de réalisation, une concentration de 4 à 10 mg/ml de NaCl peut être utilisée, par exemple, 9,0, 7,0, 6,75 ou 4,5 mg/ml. Les compositions de l'invention comprendront généralement un tampon. Un tampon phosphate est typique. Les compositions de l'invention peuvent être administrées conjointement avec d'autres agents immunorégulateurs. En particulier, les compositions peuvent comprendre un ou plusieurs adjuvants. De tels adjuvants sont connus dans l'art et comprennent, mais n'y sont pas limités, des sels d'aluminium tels que l'alun et MF59.

#### Procédés de traitement

L'invention fournit également un procédé pour soulever une réponse immunitaire chez un mammifère approprié, comprenant l'administration d'une composition pharmaceutique de l'invention au mammifère approprié. La réponse immunitaire est de préférence protectrice et elle implique de préférence des anticorps. Plus particulièrement, la réponse immunitaire est protectrice contre le SGB est de préférence elle implique des anticorps contre le SGB. Le procédé peut soulever une réponse à un rappel.

Le mammifère approprié est de préférence un être humain. Lorsque le vaccin est destiné à une utilisation

prophylactique, l'être humain est de préférence un enfant (par exemple, un jeune enfant ou un nourrisson) ou un adolescent ; lorsque le vaccin est destiné à une utilisation thérapeutique, l'être humain est de préférence un adulte. Un vaccin prévu pour des enfants peut être également administré à des adultes, par exemple, pour estimer l'innocuité, le dosage, l'immunogénicité, etc. Une classe préférée d'êtres humains pour le traitement sont des femmes en âge de procréer (par exemple, des adolescentes et au-delà). Une autre classe préférée consiste en des femmes enceintes. Les patients âgés (par exemple, ceux d'un âge supérieur à 50, 60, 70, 80 ou 90, etc. ans, particulièrement de plus de 65 ans), spécialement ceux vivant dans des maisons de repos où le risque d'infection par le SGB peut être accru (référence 86), constituent une autre classe préférée d'êtres humains pour le traitement. Les femmes avec des taux indétectables d'anticorps contre le ou les saccharides capsulaires du SGB peuvent présenter des taux supérieurs d'infection par le SGB chez leur nouveau-né. Ceci est dû au fait que des taux supérieurs d'anticorps maternels dirigés contre les saccharides capsulaires du SGB sont corrélés avec un risque réduit de maladie chez les nouveau-nés (références 87 et 88). Par conséquent, l'administration à ces femmes est spécifiquement envisagée dans la présente invention.

L'invention fournit également une composition de l'invention pour une utilisation en tant que médicament. Le médicament est de préférence capable de soulever une réponse immunitaire chez un mammifère approprié (c'est-

à-dire qu'il s'agit d'une composition immunogène) et il est de façon davantage préférée un vaccin.

L'invention fournit également l'utilisation d'une composition de l'invention dans la fabrication d'un médicament destiné à soulever une réponse immunitaire chez un mammifère approprié.

Ces utilisations et procédés peuvent être destinés à la prévention et/ou au traitement d'une maladie provoquée par *S. agalactiae*, par exemple, la septicémie ou la bactériémie néonatale, la pneumonie néonatale, la méningite néonatale, l'endométrite, l'ostéomyélite, l'arthrite septique, etc. Ces utilisations et procédés peuvent être destinés à la prévention et/ou au traitement d'une maladie provoquée par *S. pneumoniae*, par exemple, la bronchite, la rhinite, la sinusite aiguë, l'otite moyenne, la conjonctivite, la méningite, la bactériémie, la septicémie, l'ostéomyélite, l'arthrite septique, l'endocardite, la péritonite, la péricardite, la cellulite, et l'abcès cérébral.

Le sujet chez lequel la maladie est prévenue peut ne pas être le même que le sujet qui reçoit le conjugué de l'invention. Par exemple, un conjugué peut être administré à une femme (avant ou durant la grossesse) afin de protéger sa descendance (la dite « immunisation maternelle », références 89 à 91).

Une façon de vérifier l'efficacité d'un traitement thérapeutique implique le suivi de l'infection par le SGB après l'administration de la composition de l'invention. Une façon de vérifier l'efficacité d'un traitement prophylactique implique le suivi des réponses immunitaires contre le pathogène ciblé, par exemple, les

antigènes du SGB après l'administration de la composition.

Les compositions préférées de l'invention peuvent conférer un titre en anticorps chez un patient qui est  
5 supérieur au critère pour la séroprotection pour chaque composant antigénique pour un pourcentage acceptable de sujets humains. Les antigènes avec un titre en anticorps associé au-dessus duquel un hôte est considéré comme  
10 ayant subi une séroconversion contre l'antigène sont bien connus, et de tels titres sont publiés par des organisations telles que l'OMS. De préférence, plus de 80 % d'un échantillon statistiquement significatif de sujets ont subi une séroconversion, de façon davantage préférée plus de 90 %, de façon encore davantage préférée  
15 plus de 93 % et de façon préférée entre toutes 96 à 100 %.

Les compositions de l'invention seront généralement administrées directement à un patient. L'administration directe peut être accomplie par injection parentérale (par exemple, par voie sous-cutanée, intrapéritonéale,  
20 intraveineuse, intramusculaire, ou dans l'espace interstitiel d'un tissu), ou par administration rectale, orale, vaginale, topique, transdermique, intranasale, oculaire, auriculaire, pulmonaire ou autre mucosale. L'administration intramusculaire dans la cuisse ou le  
25 haut du bras est préférée. L'injection peut être réalisée à l'aide d'une aiguille (par exemple, une aiguille hypodermique), mais une injection sans aiguille peut être utilisée en variante. Une dose intramusculaire type est de 0,5 ml.

30 L'invention peut être utilisée pour déclencher une immunité systémique et/ou mucosale. Le traitement

posologique peut être un calendrier d'une dose simple ou un calendrier de doses multiples. Les doses multiples peuvent être utilisées dans un calendrier d'immunisation primaire et/ou dans un calendrier d'immunisation de  
5 rappel. Un calendrier de dose primaire peut être suivi d'un calendrier de dose de rappel. Le temps approprié entre les doses de sensibilisation (par exemple, entre 4 et 16 semaines), et entre la sensibilisation et le rappel, peut être déterminé en routine.

10

#### Généralités

Le terme « comprenant » englobe « incluant » ainsi que « constitué de », par exemple, une composition « comprenant » X peut être constituée exclusivement de  
15 X ou peut inclure quelque chose de supplémentaire, par exemple, X + Y.

Le terme « sensiblement » n'exclut pas « complètement », par exemple, une composition qui est « sensiblement dépourvue » de Y peut être complètement  
20 dépourvue de Y. Lorsque c'est nécessaire, le terme « sensiblement » peut être omis de la définition de l'invention.

Dans certaines mises en œuvre, le terme « comprenant » se rapporte à l'inclusion de l'agent  
25 actif indiqué, tel que les polypeptides cités, ainsi que l'inclusion d'autres agents actifs, et de supports, excipients, émoullients, stabilisants, etc. pharmaceutiquement acceptables, qui sont connus dans l'industrie pharmaceutique. Dans certaines mises en  
30 œuvre, le terme « constitué essentiellement de » se rapporte à une composition, dont le seul principe actif

est le(s) principe(s) actif(s) indiqué(s), toutefois, il peut être inclus d'autres composés qui sont destinés à la stabilisation, la conservation, etc. de la formulation, mais qui ne sont pas impliqués directement

5 dans l'effet thérapeutique du principe actif indiqué. L'utilisation de la phrase de transition « constitué essentiellement » signifie que l'étendue d'une revendication doit être interprétée comme englobant les matériaux ou les étapes spécifiés cités dans la

10 revendication, et ceux qui n'affectent matériellement pas la ou les caractéristiques basiques et nouvelles de l'invention revendiquée. Voir, *In re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976) (en italique dans l'original) ; voir également MPEP § 2111.03. Ainsi, le

15 terme « constitué essentiellement de », lorsqu'il est utilisé dans une revendication de cette invention, n'est pas censé être interprété comme étant équivalent à « comprenant ». Le terme « constitué de » et ses variations comprend « incluant et limité à » sauf

20 précision expressément contraire. Dans certains territoires, le terme « comprenant un principe actif constitué de » peut être utilisé à la place de « constitué essentiellement ». Le terme « environ » en relation avec une valeur numérique  $x$  signifie, par

25 exemple,  $x + 10\%$ ,  $x + 5\%$ ,  $x + 4\%$ ,  $x + 3\%$ ,  $x + 2\%$ ,  $x + 1\%$ . Le terme « sensiblement » n'exclut pas « complètement », par exemple, une composition qui est « sensiblement dépourvue » de Y peut être complètement dépourvue de Y. Lorsque c'est nécessaire, le terme

30 « sensiblement » peut être omis de la définition de l'invention.

Sauf indication spécifique, un procédé comprenant une étape de mélange de deux composants ou plus ne nécessite pas un ordre spécifique quelconque de mélange. Ainsi, les composants peuvent être mélangés dans un ordre  
5 quelconque. Lorsqu'il y a trois composants, alors deux composants peuvent être combinés l'un avec l'autre, et ensuite la combinaison peut être combinée avec le troisième composant, etc.

Les anticorps seront généralement spécifiques de  
10 leur cible. Ainsi, ils présenteront une affinité supérieure pour la cible par rapport à une protéine témoin non pertinente, telle que la sérumalbumine bovine.

### Exemples

15

#### Exemple 1

Souches bactériennes - La souche du SGB du sérotype III COH1 (sérotype III) a été obtenue auprès de Dennis Kasper (Harvard Medical School, Boston, MA).

20 Isolement et purification du polysaccharide capsulaire du sérotype III - La souche du SGB COH1 a été utilisée pour la préparation du PSC III à partir de 1 litre de culture bactérienne développée jusqu'à la phase exponentielle dans du bouillon de Todd Hewitt. Le  
25 procédé de purification était basé sur des procédures décrites auparavant (Wessels M. R., 1990 J. Clin. Investig. 86, 1428-1433). En bref, le culot bactérien a été récupéré par centrifugation à 4000 tr/min pendant  
30 Après centrifugation à 4000 tr/min pendant 20 min, du tampon Tris 1 M (1/9, v/v) a été ajouté au surnageant et

dilué avec du HCl (1/1, v/v) pour atteindre un pH neutre. Pour encore purifier le PSC du sérotype III, 2 M de CaCl<sub>2</sub> (concentration finale de 0,1 M) et de l'éthanol (concentration finale de 30 % (v/v)) ont été ajoutés à la solution. Après centrifugation à 4000 x g pendant 20 min, le surnageant a été soumis à une filtration à flux tangentiel avec un seuil de masse moléculaire de 10 000 (Hydrosart Sartorius ; surface de 0,1 m<sup>2</sup>) contre 14 volumes de 50 mM de Tris, 500 mM de NaCl, pH 8,8 et 7 volumes de 10 mM de phosphate de sodium, pH 7,2.

#### Exemple 2 - Fragments des polysaccharides du sérotype III préparés par désamination

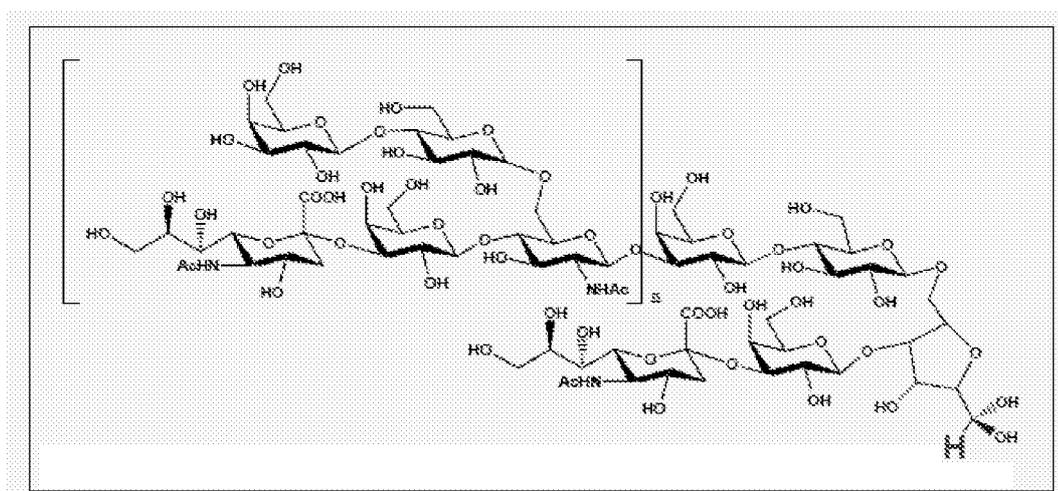
Le PS du sérotype III natif a été partiellement N-désacylé comme suit : le polysaccharide a été dissous dans 3 ml de 0,5 M de NaOH, chauffé en 70 °C pendant 2 à 4 h, et ensuite glacé dans un bain de glace-eau. De l'acide acétique glacial a été ajouté à l'échantillon pour amener le pH à 4,5. Le produit partiellement N-désacylé a été désaminé par l'addition de 200 µl de NaNO<sub>2</sub> à 5 % (p/v) et agité à 4 °C pendant 2 h. Le matériau a été purifié par une colonne G25 s'éluant avec de l'eau.

Pour reconstituer la pleine N-acétylation des résidus d'acide sialique, une solution diluée à 1/1 de 4,15 µl/ml d'anhydride acétique dans de l'éthanol a été ajoutée, et la réaction a été incubée à température ambiante pendant 2 h. Le matériau a été purifié par une colonne G25 s'éluant avec de l'eau.

### Exemple 3 - Purification des oligosaccharides

Les fragments de longueur différente ont été séparés par chromatographie d'échange anionique en utilisant une CLHP semi-préparative avec une colonne MONO Q™. En augmentant le pourcentage de NaCl du tampon d'élu-  
5 tion avec un gradient en escalier, il a été possible d'isoler les oligosaccharides présentant une différence de longueur de chaîne (degré de polymérisation ou DP) dans la plage de 1 à 2 unités répétitives (UR) (figure 2).  
10 Ces fragments étaient composés d'une UR modifiée et d'un nombre variable d'UR non modifiées.

La longueur des oligosaccharides a été déterminée par une analyse de RMN <sup>1</sup>H (figure 3). Le rapport entre l'intégrale du signal du proton de l'aldéhyde du cycle furanoside généré durant la réaction de dépolymérisation (à 6,62 ppm sous la forme d'hémi-acétal) et les signaux des protons associés aux autres monosaccharides a été  
15 utilisé pour mesurer la longueur de l'oligosaccharide.



20

La longueur du DP2 a été confirmée par spectrométrie de masse (MALDI TOF) en mode négatif en utilisant de

l'acide dihydroxybenzoïque comme matrice (MS trouvée : 1938,21 ; calculée : 1937,70). Le DP2 contient deux unités répétitives : une unité répétitive et un appendice composé d'une unité répétitive modifiée. Cette nomenclature (par exemple, DP3, DP4) sera utilisée ci-dessous.

Pour corroborer l'intégrité des DP2 et DP3 obtenus observée par l'analyse de RMN, une analyse HPAEC-PAD a été effectuée avec un Dionex ICS3000 équipé d'une colonne CarboPac PA1. Le PSIII a été utilisé comme témoin. Le rapport relatif des différents sucres composant le polymère a été déterminé (tableau 1), indiquant qu'aucune perte significative d'acide sialique n'a été produite durant la dépolymérisation. En considérant qu'un résidu GlcNAc a été perdu dans la molécule entière (celui qui devait devenir un résidu 2,5-anhydro-D-mannose durant la réaction), la longueur de l'oligosaccharide a été estimée en utilisant la formule :

$$DP = [X]/([X]-[GlcNAc])$$

où [X] représente la concentration de Glc ou la moitié de la concentration de Gal. Les DP estimées (tableau 4.1) par ce procédé concordent bien avec la longueur estimée par l'intermédiaire de l'analyse de RMN et de MS.

Tableau 1

Quantification par HPAEC-PAD des composants monosaccharidiques et estimation de la longueur relative

Echantillon	GlcNAc μmol/ml	Glc μmol/ml	Gal μmol/ml	NeuNAc μmol/ml	DP calculée par GlcNAc
DP2	7,71	13,79	30,75	12,91	2,1
DP3	9,81	14,86	29,46	14,31	3,0
PSIII	5,86	5,97	12,06	5,83	n.a.

5 PSIII se rapporte au polysaccharide natif du SGB du sérotype III.

#### Exemple 4 - Structures synthétiques (figures 4A à D)

Procédés généraux pour la synthèse chimique des oligosaccharides

10 Tous les produits chimiques étaient de qualité réactive, et ils ont été utilisés sans autre purification. Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice 60 F<sub>254</sub> (Sigma Aldrich) ; après examen sous lumière UV, les composés

15 ont été visualisés par chauffage avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> éthanolique à 10 % (v/v). Dans les procédures de préparation, les solutions organiques ont été lavées avec les quantités des solutions aqueuses indiquées, puis séchées avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, et concentrées sous

20 pression réduite à une température de 30 à 50 °C sur un bain-marie. La chromatographie sur colonne a été effectuée sur des cartouches préremplies de silice REDISEP™ (Teledyne-Isco, 0,040 à 0,063 nm) ou BIOTAGE™ SNAP Ultra (0,050 nm de silice irrégulière). Sauf

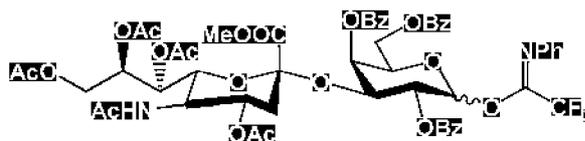
25 précision contraire, un gradient de 0 → 100 % du mélange d'élution a été appliqué dans un instrument COMBIFLASH™

R<sub>f</sub> (Teledyne-Isco) ou ISOLERA™ (Biotage). Des mélanges de solvants moins polaires que ceux utilisés pour la CCM ont été utilisés au début de la séparation. Les spectres de RMN <sup>1</sup>H ont été mesurés à 400 MHz et 298 K avec un spectromètre Bruker AVANCE™ III ; les valeurs de δ<sub>H</sub> ont été rapportées en ppm, par rapport à l'étalon interne Me<sub>4</sub>Si (δ<sub>H</sub> = 0,00, CDCl<sub>3</sub>) ou le signal de l'eau (δ<sub>H</sub> = 4,79 ppm, D<sub>2</sub>O). Les spectres de RMN <sup>13</sup>C ont été mesurés à 100 MHz et 298 K avec un spectromètre Bruker Avance<sup>III</sup> ; les valeurs de δ<sub>C</sub> sont rapportées en ppm par rapport au signal du CDCl<sub>3</sub> (δ<sub>C</sub> = 77,0, CDCl<sub>3</sub>). Les signaux de RMN ont été attribués par spectroscopie dimensionnelle à corrélation homonucléaire et hétéronucléaire. Lors du rapport des attributions des signaux de RMN, les résidus de sucre dans les oligosaccharides sont indiqués avec des lettres majuscules, les attributions incertaines sont indiquées par "/". Les noyaux associés au lieu sont indiqués avec un prime. Les masses exactes ont été mesurées par spectroscopie seuil à ionisation par électronébulisation, en utilisant un instrument Q-Tof *microMacromass* (Waters). La rotation optique a été mesurée avec un P2000 Jasco à 25 °C.

La figure 4A fournit la structure de l'unité répétitive du polysaccharide du SGB du sérotype III (PSIII du SGB). Les figures 4B à 4D fournissent les structures des fragments pentasaccharidiques synthétiques du PSIII du SGB (composés 1, 2, et 3, respectivement).

Exemple 5 - Synthèse du fragment 1 (figure 5)

Schéma 1. Réactifs et conditions : a. NaOMe, MeOH ;  
 (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, DMF, PTSA, 50 °C, puis TEA, mélange 9/1  
 de MeOH-H<sub>2</sub>O, 90 °C ; BnBr, 60 % NaH, DMF, 57 % (sur  
 5 3 étapes) ; b. mélange 4/1 d'AcOH-H<sub>2</sub>O, 70 °C ; (EtO)<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>,  
 PTSA, CH<sub>3</sub>CN, puis mélange 4/1 d'AcOH-H<sub>2</sub>O, 65 % (sur  
 3 étapes) ; c. NIS, TfOH, DCM, -20 °C, 72 % ; d. mélange  
 4/1 d'AcOH-H<sub>2</sub>O, 70 °C ; TBDPSCl, DMAP, Py, 60 °C, 80 %  
 (sur 2 étapes) ; e. Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>CClNPh, DCM, 82 % ;  
 10 f. TMSOTf, DCM, 55 % ; g. LiI, Py, 120 °C ; H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>,  
 EtOH, 90 °C ; Ac<sub>2</sub>O-Py ; NaOMe, MeOH ; H<sub>2</sub>, Pd-C, 31 %.

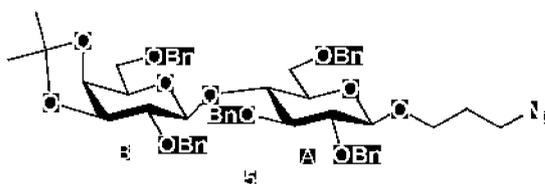


10

15 Trifluoroacétimidate de 2,4,6-tri-O-benzoyl-3-O-  
 (4,7,8,9-tétra-O-acétyl-5-(N-acétamido)3,5-didésoxy-D-  
 glycéro- $\alpha$ -D-galacto-non-2-ulopyranosylonate de  
 méthyle)-D-galactopyranosyl-N-phényle ( $\alpha, \beta$ ) 11

A une solution du composé 10 (1,5 g, 1,4 mmol) dans  
 20 du DCM (10 ml) et de chlorure de 2,2,2-trifluoro-N-  
 phénylacétimidoyl (3 équivalents), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
 (1 équivalent) a été ajouté à 0 °C, et la réaction a été  
 agitée à TA pendant 3 h. Le solide a été séparé par  
 filtration et le solvant a été évaporé. Le produit brut  
 25 a été purifié par chromatographie flash (mélange 8/2 de  
 toluène/acétone) pour produire le composé 11 sous la  
 forme d'une mousse brune dans un rendement de 82 %  
 (1,15 g). HR ESI-MS *m/z* C<sub>55</sub>H<sub>55</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>21</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 1159,3147 ;

trouvé 1159,3065. (Ando *et al.* Carbohydrate Research 338 (2003) 503-514).



5

2,6-Di-O-benzyl-3,4-di-O-isopropylidène-3-D-galactopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzyl-3-D-glucopyranoside de 3-azidopropyle 5

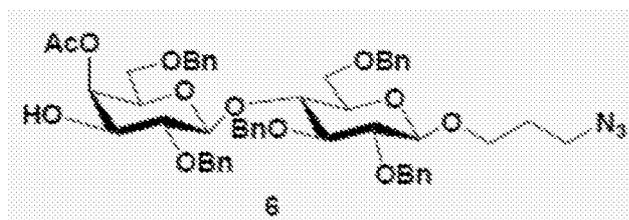
Le composé 4 connu (5,0 g, 11,7 mmol) a été dissous dans 100 ml de mélange 9/1 de 2,2-diméthoxy-propane/DMF. Du PTSA catalytique (0,2 équivalent) a été ajouté et la réaction a été réchauffée à 50 °C pendant 3 h. Une CCM (mélange 9/1 de DCM/MeOH) a montré la disparition du matériau de départ et la formation de 2 taches, accompagnées d'autres sous-produits. La réaction a été neutralisée avec de la TEA jusqu'à pH neutre, et le solvant a été éliminé sous pression réduite. Le produit brut a été dissous dans 150 ml de mélange 9/1 de MeOH/H<sub>2</sub>O et réchauffé à 90 °C pendant 2 h, lorsque la présence d'une tache majeure a été détectée par CCM. Le solvant a été éliminé sous pression réduite, et le produit brut a été purifié par chromatographie flash (mélange 9/1 de DCM/MeOH) pour donner le galactose isopropylé dans un rendement de 72 % (3,9 g).

Le composé à venir a été dissous dans du DMF sec (50 ml) sous une atmosphère d'azote. La solution a été refroidie à 0 °C, et du NaH à 60 % (2,2 g, 55,25 mmol) a été ajouté par parties. Après 20 min, du BnBr (10,3 ml, 85 mmol) et du TBAI (7,8 g, 21,25 mmol) ont été ajoutés.

La réaction a été agitée pendant une nuit à TA, puis neutralisée par l'addition de MeOH et le solvant a été éliminé sous pression réduite. Le produit brut a été dissous dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, lavé 2 fois avec du NaHCO<sub>3</sub> aqueux et une fois avec de l'eau. La phase organique a été recueillie, séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash (mélange 8/2 de cyclohexane/EtOAc) pour donner le composé 5 dans un rendement de 79 % sous la forme d'une huile jaune pâle (6,1 g). HR ESI-MS *m/z* C<sub>53</sub>H<sub>61</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 938,4204 ; trouvé 938,4200.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7,50-7,20 (m, 25H, H-Ar), 4,99 - 4,35 (m, 12H, CH<sub>2</sub>Ph, y compris, 4,45, d, H-1a, *J* = 8,0 Hz, 1H ; 4,39, d, H-1b, *J* = 8,7 Hz, 1H), 4,15 (dd, 1H, *J* = 5,5, 1,1 Hz, H-4a), 4,07-3,96 (m, 3H, OCH<sub>2a</sub>, H-3, H-4), 3,86 (dd, 1H, *J* = 10,9, 4,1 Hz, H-6<sub>b</sub>), 3,80-3,70 (m, 3H, H-6<sub>b</sub>, H-6<sub>a</sub>, H-3), 3,67 (m, 1H, OCH<sub>2b</sub>), 3,64-3,54 (m, 2H, H-6<sub>a</sub>, H-5), 3,48-3,35 (m, 5H, H-2a, H-2b, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, H-5), 1,93 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, 2H), 1,45 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)), 1,40 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 138,95-126,96 (50 x C-Ar, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 109,78, 103,58 (C1b), 101,85 (C1a), 82,98, 81,80 (C2b), 80,63 (C2a), 79,37, 77,25, 76,29, 75,43, 75,07-73,20 (5 x CH<sub>2</sub>Ph), 72,01, 68,94 (C6a), 68,18 (C6b), 66,48 (OCH<sub>2</sub>), 65,30, 48,33 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 29,27 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 27,98, 26,42 (2 x C(CH<sub>3</sub>)).



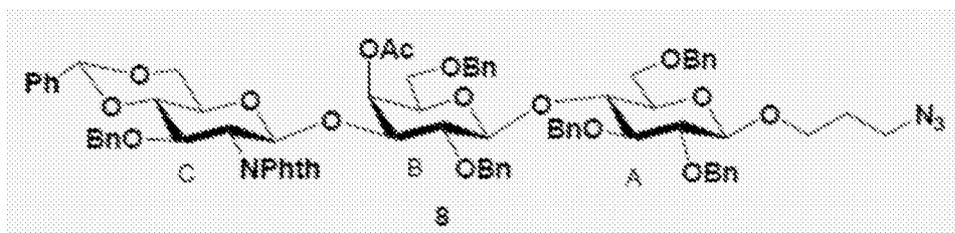
4-O-Acétyl-2,6-di-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-  
(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside de 3-  
azidopropyle 6

5 Le lactoside 5 (6,1 g, 6,7 mmol) a été mis en  
suspension dans un mélange 4/1 de AcOH/H<sub>2</sub>O (200 ml). La  
réaction a été réchauffée à 70 °C pendant 2 h. Une CCM  
(mélange 7/3 de cyclohexane/acétate d'éthyle) a montré  
la disparition du matériau de départ et la formation  
10 d'une tâche avec un Rf inférieur. Le solvant a été  
éliminé à pression réduite et le produit brut a été  
coévaporé avec du toluène (3 x 100 ml). Le produit brut  
a été dissous dans du CH<sub>3</sub>CN (100 ml), puis de  
l'orthoacétate de triéthyle (3,7 ml, 20,1 mmol) et du  
15 PTSA (270 mg, 1,34 mmol) ont été ajoutés. La réaction a  
été agitée à TA pendant 4 h, puis le solvant a été  
éliminé sous pression réduite. Le produit brut a été  
dissous dans un mélange 4/1 d'AcOH/H<sub>2</sub>O (100 ml) et après  
2 h, le solvant a été éliminé à pression réduite. Le  
20 produit brut a été purifié par chromatographie flash  
(mélange 6/4 de cyclohexane/EtOAc) pour donner le  
composé 6 dans un rendement global de 65 % (3,9 g) sous  
la forme d'une huile jaune pâle. HR ESI-MS *m/z* C<sub>52</sub>H<sub>59</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>  
[M+Na]<sup>+</sup> 939,3996 ; trouvé 940,4030.

25 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,47-7,13 (m, 25H, H-Ar),  
5,37 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H, H-4<sup>B</sup>), 5,01-4,63 (m, 7H, 7 x  
CHHPH), 4,53-4,43 (m, 3H, y compris, 2 x CHHPH, H-1a ;  
4,39, d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H-1<sup>B</sup>), 4,27 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H,  
CHHPH), 4,01 (m, 2H, 1 x OCH<sub>2a</sub>, H-4<sup>A</sup>), 3,82 (dd, *J* = 10,9,  
30 3,9 Hz, 1H, H-6<sup>A</sup>), 3,75 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H, H-6<sub>a</sub>), 3,69-  
3,49 (m, 5H, H-3<sup>B</sup>, OCH<sub>2b</sub>, H-6<sub>b</sub>, H-4<sup>B</sup>, H-5<sup>B</sup>), 3,48 - 3,31

(m, 7H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, H-2<sup>A</sup>, H-2<sup>B</sup>, H-3<sup>A</sup>, H-5<sup>A</sup>, H-6<sup>A</sup>), 2,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1,92 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171,00 (COCH<sub>3</sub>), 138,99-126,97 (C-Ar), 103,57 (C-1<sup>A</sup>), 102,30 (C-1<sup>B</sup>), 82,71, 81,68, 80,08 (C-2<sup>A</sup>, C-2<sup>B</sup>), 76,28, 75,25, 75,04, 73,39, 73,23, 72,43, 71,98 (C-3<sup>A</sup>, C-3<sup>B</sup>), 69,63 (C-4<sup>B</sup>), 68,09 (C-6<sup>B</sup>), 67,23 (OCH<sub>2</sub>), 66,50 (C-6<sup>A</sup>), 48,30 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 29,25 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 20,78 (CH<sub>3</sub>CO).



10

3-O-Benzyl-4,6-O-benzylidène-2-désoxy-2-phtalimido-gluco-pyranosyl-(1→3)-4-O-acétyl-2,6-di-O-benzyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzyl-β-D-gluco-pyranoside de 3-azidopropyle 8

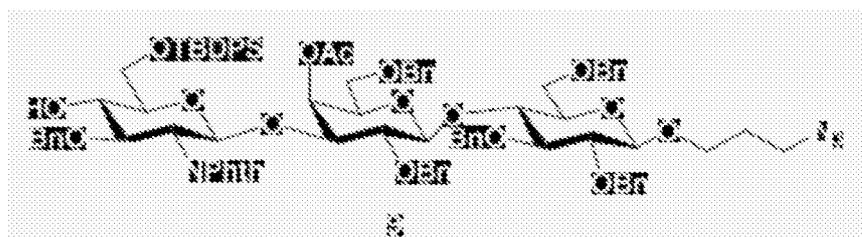
Une solution de l'accepteur 6 (800 mg, 0,87 mmol) et du donneur 7 connu (655 mg, 1,13 mmol) avec des tamis moléculaires activés (4 Å, 1,0 g) dans du DCM (10 ml) a été agitée pendant 20 min sous azote. Du NIS (508 mg, 2,26 mmol) et du TfOH (20 µl, 0,23 mmol) ont été ajoutés à -20 °C. Après agitation du mélange réactionnel pendant 24 h à température ambiante, de la TEA a été ajoutée jusqu'à pH neutre, le solide a été séparé par filtration et le solvant a été éliminé à pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash (mélange 4/1 de toluène/EtOAc) pour donner le composé 8 dans un rendement de 72 % (870 mg) sous la forme d'une

25

huile incolore. HR ESI-MS  $m/z$   $C_{80}H_{82}N_4O_{18}$   $[M+Na]^+$   
1409,5522 ; trouvé 1409,5604.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,47-7,13 (m, 39H, H-Ar),  
5,55 (s, 1H, CHPh), 5,31-5,27 (m, 2H, H-1<sup>C</sup>, H-4<sup>B</sup>), 4,83-  
5 4,52 (m, 5H, CHHPh), 4,45-4,33 (m, 5H, 4 x CHHPh, H-4<sup>C</sup>),  
4,21-3,39 (m, 6H, H-1<sup>A</sup>, H-1<sup>B</sup>, H-2<sup>C</sup>, 3 x CHHPh), 3,85-3,71  
(m, 5H, H-2<sup>A-B</sup>, H-6<sub>a</sub><sup>A-C</sup>), 3,62-3,18 (m, 15H, H3<sup>A-C</sup>, H-4<sup>A-C</sup>,  
2 x H-5, H-6<sub>b</sub><sup>A-C</sup>, OCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2,97-2,90 (m, 1H, H-5),  
2,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1,82-1,69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>).

10 RMN  $^{13}C$  (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  169,90, 167,50 (CO),  
139,04-123,14 (C-Ar), 103,46 (C-1<sup>A</sup>), 101,87 (C-1<sup>B</sup>),  
101,27 (CHPh), 99,20 (C-1<sup>C</sup>), 82,83 (C-2<sup>A</sup>), 82,65, 78,88,  
78,63, 75,66, 75,16, 75,04, 74,68, 74,43 (C-2<sup>B</sup>), 74,31  
(CH<sub>2</sub>Ph), 74,26 (CH<sub>2</sub>Ph), 74,04 (CH<sub>2</sub>Ph), 73,55 (CH<sub>2</sub>Ph),  
15 73,11 (CH<sub>2</sub>Ph), 72,82 (CH<sub>2</sub>Ph), 72,49 (C-3<sup>C</sup>), 69,85 (C-4<sup>C</sup>),  
68,76, 68,50, 68,21, 67,61, 66,25, 65,91 (C-6<sup>A</sup>), 65,91  
(C-6<sup>B</sup>), 66,39 (OCH<sub>2</sub>), 65,91 (C-6<sup>C</sup>), 56,11 (C-2<sup>C</sup>), 48,29  
(CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 29,21 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 20,88 (CH<sub>3</sub>CO).



20

3-O-Benzyl-6-O-t-butyl-diphénylsilyl-2-désoxy-2-  
phtalimido-glucopyranosyl-(1→3)-4-O-acétyl-2,6-di-O-  
benzyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzyl-β-  
25 D-glucopyranoside de 3-azidopropyle 9

Le trisaccharide 7 (0,29 mmol, 400 mg) a été mis en  
suspension dans un mélange 4/1 d'AcOH/H<sub>2</sub>O (25 ml). La

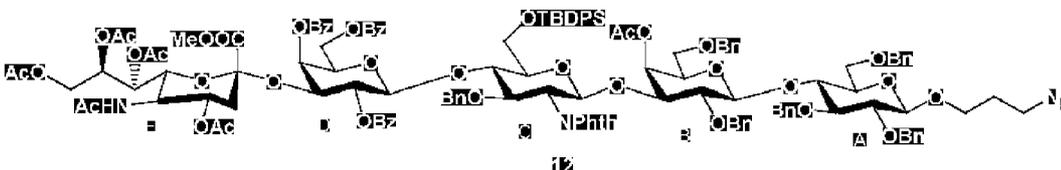
réaction a été réchauffée à 70 °C et agitée pendant 4 h. Le solvant a été éliminé à pression réduite et le produit brut a été purifié par chromatographie flash (mélange 6/4 de cyclohexane/EtOAc) pour produire le trisaccharide debenzylidiné dans un rendement de 87 % (325 mg, 0,25 mmol) sous la forme d'une huile jaune pâle.

Le matériau a été dissous dans de la pyridine (10 ml). Du TBDPSCl (0,50 mmol, 140 µl) et de la DMAP (0,05 mmol, 10 mg) ont été ajoutés et la réaction a été agitée pendant une nuit à 60 °C, lorsque la CCM (mélange 7/3 de cyclohexane/EtOAc) a montré une réaction complète. Le solvant a été éliminé à pression réduite et le produit brut a été purifié par chromatographie flash (cyclohexane/EtOAc) pour donner le composé 9 dans un rendement de 92 % (675 mg) sous la forme d'une huile jaune. HR ESI-MS  $m/z$   $C_{89}H_{96}N_4O_{18}Si$   $[M+Na]^+$  1159,6387 ; trouvé 1559,6224.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,31-7,14 (m, 44H, H-Ar), 5,38-5,32 (m, 2H, H-1c, H-4b), 4,91 (d,  $J = 10,5$  Hz, 1H, CHHPPh), 4,86-4,36 (m, 7H, CHHPPh), 4,33 (dd,  $J = 11,4, 2,8$  Hz, 1H, H-4<sup>c</sup>), 4,30-4,18 (m, 6H, H-1<sup>A</sup>, H-1b, 4 x CHHPPh), 4,17-4,08 (m, 2H, H-2<sup>c</sup>, H-6<sub>a</sub>), 4,02 (m, 2H, H-6<sup>c</sup>, H-3), 3,95-3,83 (m, 3H, H-4<sup>A</sup>, OCH<sub>2a</sub>), 3,63 (m, 1H, H-5), 3,60-3,45 (m, 3H, H-5<sup>B</sup>, H-6<sub>a</sub>, OCH<sub>2b</sub>), 3,45-3,23 (m, 9H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, H-6<sub>a</sub>, 2 x H-6<sub>b</sub>, H-2<sup>A</sup>, H-2<sup>B</sup>, 2 x H-3), 3,04 (d,  $J = 9,5$  Hz, 1H, H-5), 2,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1,92-1,82 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1,12 (s, 9H, t-Bu).

RMN  $^{13}C$  (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  169,80, 166,70 (CO), 135,59-120,48 (C-Ar), 103,41 (C-1<sup>A</sup>), 101,82 (C-1<sup>B</sup>), 98,41 (C-1<sup>C</sup>), 82,58, 81,53, 79,11, 78,44, 77,72, 75,48, 75,09, 75,00, 74,96, 74,69, 74,33, 74,20, 73,90, 73,38, 73,07,

72,71, 69,93 (C-4<sup>c</sup>), 68,34 (C-6b), 67,62 (C-6a), 66,35 (OCH<sub>2</sub>), 65,31 (C-6<sup>c</sup>), 55,75 (C-2<sup>c</sup>), 48,25 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 31,07 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,18 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 26,83 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20,66 (CH<sub>3</sub>CO).



O-[4,7,8,9-Tétra-O-acétyl-5-(N-acétamido)-3,5-didésoxy-D-glycéro- $\alpha$ -D-galacto-non-2-ulopyranosylonate de méthyle]-(2 $\rightarrow$ 3)-O-(2,4,6-tri-O-benzoyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-O-benzyl-2-désoxy-2-phtalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside)-(1 $\rightarrow$ 3)-4-O-acétyl-2,6-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside de 3-azidopropyle 12

Une solution du trisaccharide accepteur 9 (675 mg, 0,23 mmol) et du disaccharide donneur 11 (261 mg, 0,23 mmol) avec des tamis moléculaires 4 Å activés (800 mg) dans du DCM (8 ml) a été agitée pendant 20 min sous azote. Du TMSOTf (0,046 mmol, 9  $\mu$ l) a été ajouté à 0 °C. Ensuite le mélange réactionnel a été agité pendant 10 h à TA, lorsque la CCM (mélange 7/3 de toluène/acétone) a montré une réaction complète. De la TEA a été ajoutée jusqu'à pH neutre, le solide a été séparé par filtration et le solvant a été éliminé à pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash (toluène/acétone) pour donner le composé 12 dans un rendement de 55 % (314 mg) sous la forme d'un solide amorphe. HR ESI-MS  $m/z$  C<sub>136</sub>H<sub>145</sub>N<sub>5</sub>O<sub>38</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 2506,9235 ; trouvé 2506,9224.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,28-7,11 (m, 59H, H-Ar), 5,73 (ddd,  $J = 2,2, 6,0, 9,2$  Hz, 1H, H-8<sup>E</sup>), 5,54 (dd,  $J = 8,0, 10,2$  Hz, 1H, H-2<sup>D</sup>), 5,37 (m,  $J = 3,5$  Hz, 1H, H-7<sup>E</sup>), 5,28-5,22 (m, 3H, H-1<sup>D</sup>, H-4<sup>B</sup>, H-4<sup>D</sup>), 5,17 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, H-1<sup>C</sup>), 4,96-4,61 (m, 9 H, y compris m, 4,81, H-4<sup>E</sup> et m, 4,62, H-6<sup>E</sup>), 4,48-4,00 (m, 15H), 3,89-3,79 (m, 7H, y compris m, 5,02, H-5<sup>E</sup>, et s, 3,83,  $\text{COOCH}_3$ ), 3,65-3,62 (m, 1H), 3,59-3,50 (m, 1H,  $\text{OCH}_{2\text{b}}$ ), 3,45-3,24 (m, 10H), 2,97-2,95 (m, 1H), 2,46 (dd,  $J = 4,5, 12,6$  Hz, 1H, H-3<sup>eE</sup>), 2,18, 2,15, 2,11, 2,03, 1,96 (5 x s, 3H chacun, 5  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1,89-1,80 (m, 5 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ , y compris s, 1,83,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1,70 (t,  $J = 12,0$  Hz, H-3<sup>aE</sup>), 1,60 (s, 9H, t-Bu).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,70-164,81 (C=O), 138,91-125,28 (C-Ar), 103,39 (C-1<sup>A/B</sup>), 102,00 (C-1<sup>A/B</sup>), 99,88 (C-1<sup>D</sup>), 97,45 (C-1<sup>C</sup>), 82,48, 81,61, 80,05, 78,43, 78,31, 77,32, 77,21, 77,01, 76,69, 75,52, 75,43, 75,08, 75,00, 74,85, 74,72, 74,30, 74,14, 73,31, 73,00, 72,61, 72,27, 72,21, 71,71, 70,80, 69,78, 69,30, 68,58, 68,14, 67,83, 67,69, 66,54, 66,35, 62,51, 62,11, 56,54 (C-2<sup>C</sup>), 53,04 (C-5<sup>E</sup>), 49,02 ( $\text{COOCH}_3$ ), 48,27 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 37,39 (C-3<sup>E</sup>), 29,26 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 29,21 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 26,80 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 23,16, 21,44, 21,21, 20,75, 20,71, 19,36 (6 x  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

#### Exemple 6 - Synthèse du fragment 2 (figure 6)

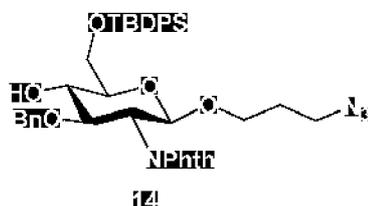
Schéma 2. Réactifs et conditions : a.  $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{N}_3$ , NIS, TfoH, 84 % ; b. mélange 4/1 d'AcOH- $\text{H}_2\text{O}$ , 70 °C ; TBDPSCl, DMAP, Py, 60 °C, 70 % (sur 2 étapes) ; c. TMSOTf, DCM, 70 % ; d. HF·Py, mélange 4/1 de THF-Py, 0 °C à TA, 78 % ; e. AgOTf, DCM, 68 % ; f. LiI, Py, 120 °C ;  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ , EtOH, 90 °C ;  $\text{Ac}_2\text{O}$ -Py ; NaOMe, MeOH ;  $\text{H}_2$ , Pd-C, 42 %.



4,6-O-Benzylidène-3-O-benzyl-2-désoxy-2-  
5 phtalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside de 3-azidopropyle 13

Une solution du composé 7 (2,0 g, 3,45 mmol) et de  
3-azido-1-propanol (707 mg, 7,0 mmol) avec des tamis  
moléculaires activés (4 Å, 3,0 g) dans du DCM (25 ml) a  
été agitée pendant 20 min sous azote. Du NIS (1,57 g,  
10 7,0 mmol) et du TfOH (61  $\mu$ l, 0,7 mmol) ont été ajoutés  
à -10 °C. Après 12 h (CCM ; mélange 7/3 de cyclohexane/  
EtOAc), la réaction a été neutralisée avec de la TEA, le  
solide a été séparé par filtration et le solvant a été  
éliminé à pression réduite. Le produit brut a été purifié  
15 par chromatographie flash (cyclohexane/EtOAc) pour  
donner le composé 13 dans un rendement de 84 % (1,65 g)  
sous la forme d'une huile jaune. Les données de RMN  
concordaient avec celles rapportées dans la littérature  
(J Carbohydr Chem 24: 755-769, 2005).

20



3-O-Benzyl-6-O-t-butyldiphénylsilyl-2-désoxy-2-  
25 phtalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside de 3-azidopropyle 14

Le monosaccharide 13 (1,65 g, 2,9 mmol) a été mis  
en suspension dans un mélange 4/1 d'AcOH/H<sub>2</sub>O (40 ml). La

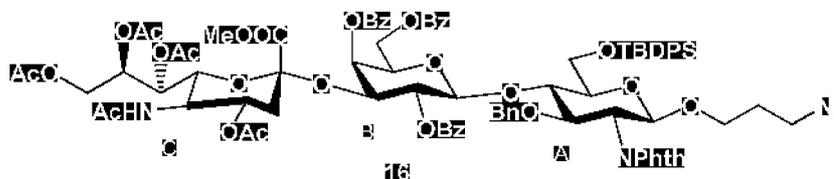
réaction a été réchauffée à 70 °C et laissée sous agitation pendant 4 h. Le solvant a été éliminé sous pression réduite et le produit brut a été purifié par chromatographie flash (mélange 6/4 de cyclohexane/EtOAc) pour produire du 3-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranoside de 3-azidopropyle dans un rendement de 89 % (1,24 g, 2,6 mmol) sous la forme d'une huile jaune pâle.

Le matériau a été dissous dans de la pyridine (20 ml). Du TBDPSCl (1,34 ml, 5,2 mmol) et de la DMAP (65 mg, 0,52 mmol) ont été ajoutés et la solution a été agitée pendant une nuit à 60 °C, moment auquel la réaction a été complète (CCM, mélange 8/2 de cyclohexane/EtOAc). Le mélange a été dilué avec du DCM et lavé avec de l'eau. La phase organique a été séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée à pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash (cyclohexane/EtOAc) pour donner le composé 17 dans un rendement de 79 % (1,48 g) sous la forme d'une huile jaune pâle. HR ESI-MS *m/z* C<sub>40</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 743,2877 ; trouvé 743,2819.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,12-6,84 (m, 19H, H-Ar), 5,17 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, H-1), 4,82, 4,59 (2 d, *J* = 12,2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,30 (dd, *J* = 10,7, 8,5 Hz, 1H, H-3), 4,17 (dd, *J* = 10,7, 8,5 Hz, 1H, H-2), 4,06-3,96 (m, 2H, 2 x H-6), 3,92 (t, *J* = 9,0 Hz, 1H, H-4), 3,76-3,82 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>a), 3,63 (dt, *J* = 9,8, 5,1 Hz, 1H, H-5), 3,54-3,40 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>b), 3,12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1,78-1,57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1,13 (s, 9H, t-Bu).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167,81 (CO), 138,22-127,41 (C-Ar), 98,14 (C-1), 78,79 (C-3), 74,60, 74,38,

74,33 (CH<sub>2</sub>Ph, C-4, C-5), 65,82 (OCH<sub>2</sub>), 65,09 (C-6), 55,35 (C-2), 48,00 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 31,04 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28,81 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 26,82 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).



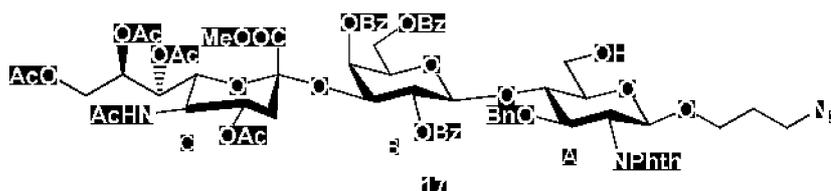
5

O-[4,7,8,9-Tétra-O-acétyl-5-(N-acétamido)-3,5-didésoxy-D-glycéro- $\alpha$ -D-galacto-non-2-ulopyranosylonate de méthyle]-(2 $\rightarrow$ 3)-O-(2,4,6-tri-O-benzoyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-benzyl-6-O-t-butylidiphénylsilyl-2-désoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside de 3-azidopropyle 16

Une solution du disaccharide donneur 11 (500 mg, 0,44 mmol) et de l'accepteur 14 (320 mg, 0,44 mmol) avec des tamis moléculaires activés (4 Å, 800 mg) dans du DCM (8 ml) a été agitée pendant 20 min sous azote. Du TMSOTf (16  $\mu$ l, 0,088 mmol) a été ajouté à -10 °C. Après agitation pendant 10 h à TA, la CCM a montré une réaction complète (mélange 7/3 de toluène/acétone). De la TEA a été ajoutée jusqu'à pH neutre, le solide a été séparé par filtration et le solvant a été éliminé à pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash (toluène/acétone) pour donner le composé 16 dans un rendement de 70 % (520 mg) sous la forme d'un solide vitreux. HR ESI-MS  $m/z$  C<sub>87</sub>H<sub>93</sub>N<sub>5</sub>O<sub>27</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 1690,5275 ; trouvé 1690,5801.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,32-6,52 (m, 34H), 5,57 (dd,  $J$  = 7,2, 9,0 Hz, 1H, H-2<sup>B</sup>), 5,45 (d,  $J$  = 3,3 Hz, 1H, H-4<sup>B</sup>), 5,35 (d,  $J$  = 7,8 Hz, 1H, H-1<sup>A</sup>), 5,27 (dd,  $J$  = 9,2,

2,4 Hz, 1H, H-8<sup>C</sup>), 5,02 (d,  $J = 10,0$  Hz, H-1<sup>B</sup>), 5,04-4,93 (m, 1H), 4,80-4,77 (m, 2H), 4,71 (d,  $J = 12,4$  Hz, 1H, CHHP), 4,43-4,17 (m, 8H), 4,10 (dd,  $J = 10,6, 8,6$  Hz, 1H), 4,02 (dd,  $J = 12,6, 4,6$  Hz, 1H), 3,92-3,77 (m, 3H), 5 3,73 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3,66 (dd,  $J = 10,8, 2,5$  Hz, 1H), 3,58-3,53 (m, 1H, OCH<sub>2b</sub>), 3,31 (d,  $J = 9,6$  Hz, 1H, H-6<sup>bA</sup>), 3,23-3,17 (m, 1H, H-5<sup>B</sup>), 3,01 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2,41 (dd,  $J = 12,7, 4,6$  Hz, 1H, H-3<sup>eC</sup>), 2,12, 1,98, 1,91, 1,81 (5 x s, 3H chacun, 5 x CH<sub>3</sub>CO), 1,70-1,67 (m, 2H, 10 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1,62-1,60 (m, 4H, CH<sub>3</sub>CO, H-3<sup>aC</sup>), 1,07 (s, 9H, t-Bu).



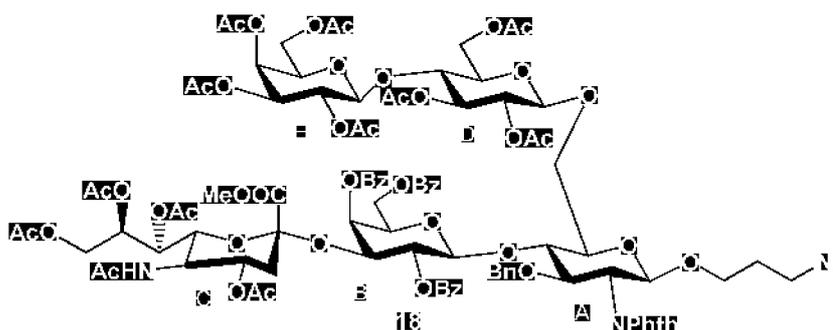
15 O-[4,7,8,9-Tétra-O-acétyl-5-(N-acétamido)-3,5-didésoxy-D-glycéro- $\alpha$ -D-galacto-non-2-ulopyranosylonate de méthyle]-(2 $\rightarrow$ 3)-O-(2,4,6-tri-O-benzoyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside de 3-azidopropyle 17

20 Le trisaccharide 16 (520 mg, 0,31 mmol) a été mis en suspension dans un mélange 4/1 de THF/pyridine (10 ml). Du HF $\cdot$ py (930  $\mu$ l) a été ajouté à 0 °C. La solution a été agitée pendant une nuit (CCM, mélange 7/3 de toluène/acétone), puis la réaction a été diluée avec du 25 DCM et lavée avec de l'eau. La phase organique a été séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée à pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash (toluène/acétone) pour donner le composé 17 (345 mg) dans un rendement de 78 % sous la forme d'un solide

vitreux. HR ESI-MS  $m/z$   $C_{71}H_{75}N_5O_{27}$   $[M+Na]^+$  1452,4547 ;  
trouvé 1452,4557.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,51-6,53 (m, 24H, H-Ar),  
5,83 (td,  $J = 9,3, 2,4$  Hz, 1H, H-8<sup>C</sup>), 5,55 (dd,  $J = 8,3,$   
5 10,5 Hz, 1H, H-2<sup>B</sup>), 5,32 (d,  $J = 3,2$  Hz, 1H, H-4<sup>B</sup>), 5,20  
(d,  $J = 10,2$  Hz, 1H, H-1<sup>A</sup>), 5,13 (m, 2H, H-7<sup>C</sup>, NH), 5,02  
(d,  $J = 8,5$  Hz, 1H, H-1<sup>B</sup>), 4,91 (d,  $J = 12,5$  Hz, 1H,  
CHHPH), 4,87 (dd,  $J = 3,0, 10,5$  Hz, 1H, H-3<sup>B</sup>), 4,80 (dd,  
 $J = 4,5, 10,7$  Hz, 1H, H-4<sup>C</sup>), 4,61 (d,  $J = 12,5$  Hz, 1H,  
10 CHHPH), 4,55 (dd,  $J = 11,9, 2,4$  Hz, 1H, H-6<sup>C</sup>), 4,49 (t,  
 $J = 9,0$  Hz, 1H, H-6<sup>aB</sup>), 4,30-4,09 (m, 5H, H-2<sup>B</sup>, H-3<sup>A</sup>, H-  
5<sup>B</sup>, H-6<sup>bB</sup>, H-6<sup>aA</sup>), 3,95 (dd,  $J = 3,2, 9,0$  Hz, 1H, H-9<sup>aC</sup>),  
3,89-3,75 (m, 7H, H-2<sup>A</sup>, H-4<sup>A</sup>, H-9<sup>bC</sup>,  $OCH_{2a}$ , y compris s,  
3,82,  $COOCH_3$ ), 3,63 (dd,  $J = 10,7, 2,7$  Hz, 1H, H-5<sup>A</sup>),  
15 3,39-3,29 (m, 2H,  $OCH_{2b}$ , H-6<sup>bA</sup>), 3,16-2,99 (m, 2H,  $CH_2N_3$ ),  
2,47 (dt,  $J = 13,6, 6,8$  Hz, 1H, H-3<sup>eC</sup>), 2,18, 2,12, 1,75  
(4 x s, 3H chacun, 4 x  $CH_3$ ), 1,70-1,57 (m, 3H, H-3<sup>aE</sup>,  
 $CH_2CH_2N_3$ ).

RMN  $^{13}C$  (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  172,22, 171,43, 170,98,  
20 170,78, 170,60, 170,37, 170,25, 170,12, 169,17, 168,02,  
167,58, 165,94, 165,83, 165,68, 165,49, 165,20 (C=O),  
138,59-123,18 (C-Ar), 100,97 (C-1<sup>B</sup>), 98,19 (C-1<sup>A</sup>), 96,82  
(C-2<sup>C</sup>), 78,04 (C-3<sup>A</sup>), 76,47 (C-4<sup>A</sup>), 75,20 (C-5<sup>A</sup>), 74,44  
( $CH_2Ph$ ), 71,73 (C-3<sup>B</sup>), 71,59 (C-2<sup>B</sup>), 71,46 (C-5<sup>B</sup>), 70,62  
25 (C-6<sup>C</sup>), 69,39 (C-4<sup>B</sup>), 68,30 (C-8<sup>C</sup>), 67,36 (C-4<sup>C</sup>), 66,78  
(C-7<sup>C</sup>), 65,87 ( $OCH_2$ ), 63,77 (C-9<sup>C</sup>), 61,71 (C-6<sup>A/B</sup>), 60,16  
(C-6<sup>A/B</sup>), 55,67 (C-2<sup>A</sup>), 53,17 (C-5<sup>C</sup>), 48,53 ( $COOCH_3$ ),  
47,91 ( $CH_2N_3$ ), 37,31 (C-3<sup>C</sup>), 28,72 ( $CH_2CH_2N_3$ ), 23,02,  
21,41, 21,35, 20,81, 20,68, 20,45 ( $CH_3CO$ ).



O-[4,7,8,9-Tétra-O-acétyl-5-(N-acétamido)-3,5-  
 didésoxy-D-glycéro- $\alpha$ -D-galacto-non-2-ulopyranosylonate  
 5 de méthyle]-(2 $\rightarrow$ 3)-O-(2,4,6-tri-O-benzoyl- $\beta$ -D-galacto-  
 pyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- $\beta$ -D-galacto-  
 pyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acétyl- $\beta$ -D-gluco-  
 pyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 6)]-3-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-  
 glucopyranoside de 3-azidopropyle 18

10 Une solution du trisaccharide accepteur 18 (345 mg,  
 0,24 mmol) et du donneur 17 (420 mg, 0,60 mmol) avec des  
 tamis moléculaires activés (4 Å, 800 mg) dans du DCM  
 (8 ml) a été agitée pendant 20 min sous azote. De l'AgOTf  
 (77 mg, 0,30 mmol) a été ajouté à 0 °C. Puis le mélange  
 15 réactionnel a été agité pendant 10 h à TA, lorsque la  
 CCM (mélange 7/3 de toluène/acétone) a montré une  
 réaction complète. De la TEA a été ajoutée, le solide a  
 été séparé par filtration et le solvant a été éliminé à  
 pression réduite. Le produit brut a été purifié par  
 20 chromatographie flash (toluène/acétone) pour donner le  
 composé 18 (300 mg, 0,14 mmol) dans un rendement de 68 %  
 sous la forme d'un solide vitreux. HR ESI-MS  $m/z$   
 $C_{97}H_{109}N_5O_{44}$   $[M+Na]^+$  2070,6343 ; trouvé 2070,6296.

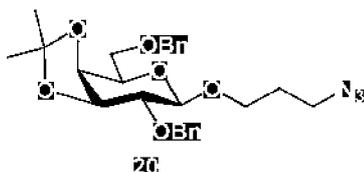
RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,26-6,73 (m, 24H, H-Ar),  
 25 5,73 (ddd,  $J = 2,2, 6,0, 9,2$  Hz, 1H, H-8 $^B$ ), 5,53 (dd,  
 $J = 8,3, 10,5$  Hz, 1H, H-2 $^B$ ), 5,36-5,31 (m, 2H), 5,25-

4,79 (m, 11H), 4-59-4,40 (m, 5H), 4,30-3,62 (m, 20 H, y compris s, 3,82, COOCH<sub>3</sub>), 3,41-3,38 (m, 1H), 3,15-3,07 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2,47 (dt, J = 12,8, 4,6 Hz, 1H, H-3<sup>eC</sup>), 2,28, 2,19, 2,18, 2,17, 2,16, 2,11, 2,06, 2,05, 2,03, 5 1,98, 1,91, 1,75 (12 x s, 3H chacun, 12 x CH<sub>3</sub>), 1,70-1,59 (m, 3H, H-3<sup>aE</sup>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170,91, 170,76, 170,52, 170,38, 170,22, 170,16, 170,10, 169,34, 168,15, 165,50, 164,99 (C=O), 133,76-123,28 (C-Ar), 101,34 (C-1<sup>D/E</sup>), 10 101,03 (C-1<sup>D/E</sup>), 100,72 (C-1<sup>B</sup>), 97,69 (C-1<sup>A</sup>), 96,91, 79,63, 77,18, 75,05, 74,69, 72,96, 72,37, 71,74, 71,59, 71,44, 71,35, 71,16, 71,05, 70,97, 70,86, 70,69, 70,57, 69,40, 69,00, 68,19, 66,69, 66,58, 66,17 (4 x C-6), 55,68 (C-2<sup>A</sup>), 53,19 (C-5<sup>C</sup>), 48,70 (COOCH<sub>3</sub>), 47,96 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 37,25 15 (C-3<sup>C</sup>), 28,67 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 23,11, 22,68, 21,44, 20,86, 20,80, 20,75, 20,73, 20,65, 20,54, 20,52 (12 x CH<sub>3</sub>CO).

#### Exemple 7 - Synthèse du fragment 3 (composé 3) (figure 7)

Schéma 3. Réactifs et conditions : a. NaOMe, MeOH ; 20 mélange 9/1 de (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DMF, PTSA, 50 °C, puis TEA, mélange 9/1 de MeOH-H<sub>2</sub>O, 90 °C ; BnBr, Na H à 60 %, DMF, 59 % (sur 3 étapes) ; b. mélange 4/1 d'AcOH-H<sub>2</sub>O, 70 °C ; (EtO)<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>, PTSA, CH<sub>3</sub>CN, puis mélange 4/1 d'AcOH-H<sub>2</sub>O, 80 % (sur 3 étapes) ; c. NIS, TfOH, DCM, -20 °C, 72 % ; 25 d. BH<sub>3</sub>·Me<sub>3</sub>, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, 64 % ; e. TMSOTf, DCM, 72 % ; f. DDQ, mélange 4/1 de DCM-MeOH, 85 % ; e. 65 % ; g. LiI, Py, 120 °C ; H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, EtOH, 90 °C ; Ac<sub>2</sub>O-Py ; NaOMe, MeOH ; H<sub>2</sub>, Pd-C, 55 % ; h. NaOMe, MeOH ; acétal diméthylrique de naphtylidène, DMF, PTSA, 50 °C ; BnBr, 30 NaH à 60 %, DMF, 63 % (sur 3 étapes).

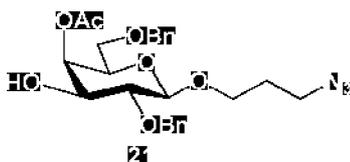


2,6-O-Benzyl-3,4-O-isopropylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside de 3-azidopropyle 20

5 Le composé 19 (3,0 g, 6,77 mmol) a été dissous dans du DMF sec (40 ml) sous une atmosphère d'azote. La solution a été refroidie à 0 °C, et une dispersion dans de l'huile minérale de NaH à 60 % (704 mg, 17,6 mmol) a été ajoutée par parties. Après 20 min, du BnBr (3,2 ml, 10 27,08 mmol) et du TBAI (2,5 g, 6,7 mmol) ont été ajoutés. La réaction a été agitée pendant une nuit à TA (CCM, mélange 8/2 de cyclohexane-EtOAc), puis neutralisée par l'addition de MeOH et de TEA. Après élimination du solvant sous pression réduite, le produit brut a été 15 dissous dans du DCM et lavé deux fois avec du NaHCO<sub>3</sub> aqueux et deux fois avec de l'eau. Les phases organiques ont été combinées, séchées avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash pour donner le composé 20 dans un rendement de 85 % (2,75 g). HR ESI-MS *m/z* C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 506,2267 ; trouvé 506,2214.

25 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,54-7,23 (m, 10H, C-Ar), 4,84 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,67, 4,60 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,34 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-1), 4,24-4,12 (m, 2H, H-3, H-4), 4,05-4,03 (m, 1H, OCH<sub>2a</sub>), 3,96 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H, H-6<sub>a</sub>), 3,86-3,79 (m, 2H, H-5, H-6<sub>b</sub>), 3,68-3,64 (m, 1H, OCH<sub>2b</sub>), 3,49-3,39 (m, 3H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, H-2), 2,04-1,83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1,41, 1,37 (2 x s, 3H chacun, 2 x CH<sub>3</sub>).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  128,50-127,62 (C-Ar,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 102,81 (C-1), 79,59 (C-2), 79,06 (C-4), 73,81 (C-3), 73,58 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73,55 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72,24 (C-5), 69,51 (C-6), 66,37 ( $\text{OCH}_2$ ), 48,33 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 29,22 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ),  
 5 27,79, 26,33 (2 x  $\text{CH}_3$ ).



4-O-Acétyle-2,6-O-benzyle- $\beta$ -D-galactopyranoside de  
 10 3-azidopropyle 21

Le composé 20 (2,75 g, 5,7 mmol) a été mis en suspension dans un mélange 4/1 d'AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (50 ml). La réaction a été réchauffée à 70 °C pendant 2 h, lorsque la CCM (mélange 7/3 de cyclohexane/EtOAc) a montré la  
 15 disparition du matériau de départ et la formation d'une tache avec un  $R_f$  inférieur. Le solvant a été éliminé à pression réduite et le produit brut a été purifié par chromatographie flash (cyclohexane/EtOAc) pour produire  
 20 dans un rendement de 92 % sous la forme d'une huile (2,30 g). HR ESI-MS  $m/z$   $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  446,1954 ; trouvé 446,1954.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,43-7,19 (m, 10H, H-Ar), 4,89, 4,67 (2 x d,  $J = 11,5$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4,56 (s, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4,33 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, H-1), 4,06-3,89 (m, 2H, H-4,  $\text{OCH}_{2a}$ ), 3,74 (m, 2H, 2 x H-6), 3,60 (m, 3H, H-3, H-5,  $\text{OCH}_{2b}$ ), 3,49 (m, 1H, H-2), 3,38 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 1,92-1,88 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  138,44-127,67 (C-Ar), 103,60 (C-1), 79,30 (C-2), 74,67 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73,60 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73,37 (C-5), 73,15 (C-3), 69,36 (C-6), 68,99 (C-4), 66,39 ( $\text{OCH}_2$ ), 48,31 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 29,21 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ).

5 Le diol a été dissous dans du  $\text{CH}_3\text{CN}$  (30 ml), puis de l'orthoacétate de triéthyle (2,8 ml, 15,6 mmol) et du PTSA (208 mg, 1,04 mmol) ont été ajoutés. La réaction a été agitée à TA pendant 4 h (CCM, mélange 6/4 de cyclohexane/EtOAc), puis le solvant a été éliminé sous  
10 pression réduite. Le produit brut a été dissous dans un mélange 4/1 d'AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (50 ml) et après 2 h, le mélange a été concentré. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash (cyclohexane/EtOAc) pour donner le composé 21 dans un rendement de 87 % (2,20 g) sous la  
15 forme d'une huile jaune pâle. HR ESI-MS  $m/z$   $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  508,2060 ; trouvé 508,2072.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,38-7,28 (m, 10H, H-Ar), 5,38 (dd,  $J = 3,6, 0,8$  Hz, H-4), 4,94, 4,71 (2 x d,  $J = 10,9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4,58, 4,48 (2 x d,  $J = 11,9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4,41 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H, H-1), 4,12-4,09 (m, 1H, H-6<sub>a</sub>), 4,07-4,01 (m, 1H,  $\text{OCH}_{2a}$ ), 3,79-3,76 (m, 2H, H-5, H-6<sub>b</sub>), 3,69-3,67 (m, 1H,  $\text{OCH}_{2b}$ ), 3,61-3,49 (m, 1H, H-2, H-3), 3,42 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 2,09 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,95-1,90 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ).

25 RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171,26 (CO), 138,27-127,78 (C-Ar), 103,88 (C-1), 79,37 (C-2), 74,93 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73,64 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72,46 (C-5), 71,94 (C-3), 68,48 (C-6), 68,06 (C-4), 64,99 ( $\text{OCH}_2$ ), 48,30 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 29,19 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 21,07 ( $\text{CH}_3$ ).

30



Phénylthio-4,6-O-naphtylidène-2-désoxy-2-phtalimido-glucopyranoside 23

5 La phénylthio-glucosamine protégée 22 (5 g, 13,1 mmol) a été désacétylée par traitement pendant une nuit avec du NaOMe dans du MeOH jusqu'à pH 9 à 10. Le mélange a été neutralisé avec de la Dowex H<sup>+</sup>, puis il a été filtré. Le filtrat a été concentré et dissous dans  
 10 du CH<sub>3</sub>CN (20 ml) auquel de l'acétal diméthylique de naphthyl-benzaldéhyde fraîchement préparé (5 équivalents) et du PTSA (0,2 équivalent) ont été ajoutés. Après agitation pendant une nuit, le mélange brut a été purifié sur gel de silice (cyclohexane-EtOAc) pour donner 3,5 g  
 15 de produit, qui a été utilisé directement pour la benzylation.

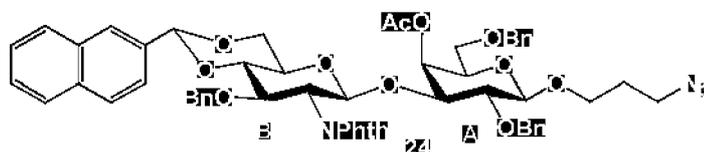
A une solution du sucre 3-OH (3,7 g, 9,4 mmol) dans du DMF (20 ml), du NaH à 60 % dans de l'huile minérale (587 mg, 14,1 mmol) a été ajouté à 0 °C sous une  
 20 atmosphère d'azote. Après agitation pendant 20 min, du BnBr (3,3 ml, 28,5 mmol) a été ajouté et le mélange a été agité pendant une nuit. Le mélange brut a été partagé dans de l'eau (x 3), et les phases organiques combinées ont été concentrées et purifiées sur du gel de silice  
 25 (cyclohexane-EtOAc) pour fournir le monosaccharide 23 (5,3 g) sous la forme d'un solide blanc (rendement de 69 % sur trois étapes). HR ESI-MS *m/z* C<sub>38</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 626,1613 ; trouvé 626,1607.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,78-6,77 (m, 21H, H-Ar),  
 30 5,70 (s, 1H, CHNap), 5,58 (d, *J* = 10,5 Hz, H-1), 4,70,

4,42 (2 x d,  $J = 12,3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4,41-4,32 (m, 2H, H-3, H-6<sub>a</sub>), 4,24 (t,  $J = 10,0$  Hz, H-2), 3,82 (t,  $J = 10,1$  Hz, H-6<sub>b</sub>), 3,79 (t,  $J = 8,9$  Hz, H,4), 3,72-3,65 (m, 1H, H-5).

5 RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167,82 (CO), 137,70-123,40 (C-Ar), 101,53 (CHNap), 84,16 (C-1), 82,93 (C-4), 75,46 (C-3), 74,23 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 70,44 (C-5), 68,77 (C-6), 54,75 (C-2).

10



3-O-Benzyl-4,6-O-naphtylidène-2-désoxy-2-phtalimido-glucopyranosyl-(1→3)-4-O-acétyl-2,6-di-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranoside de 3-azidopropyle 24

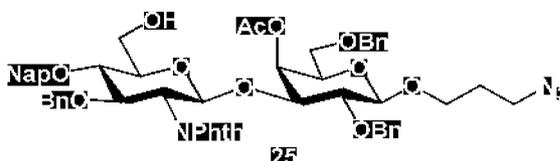
15 Une solution du donneur 23 (800 mg, 1,27 mmol) et de l'accepteur 21 (514 mg, 1,05 mmol) avec des tamis moléculaires activés (4 Å, 1,2 g) dans du DCM (12 ml) a été agitée pendant 20 min sous azote. Du NIS (570 mg, 2,54 mmol) et du TfOH (22  $\mu\text{l}$ , 0,254 mmol) ont été ajoutés

20 à  $-20$  °C. Après agitation pendant 3 h (CCM, mélange 7/3 de toluène/EtOAc), le mélange réactionnel a été neutralisé avec de la TEA, le solide a été séparé par filtration et le solvant a été éliminé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par

25 chromatographie flash (toluène/EtOAc) pour donner le composé 24 dans un rendement de 72 % (760 mg) sous la forme d'une huile jaune. HR ESI-MS  $m/z$   $\text{C}_{57}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{13}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1027,3742 ; trouvé 1027,3769.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,15-6,71 (m, 26H, H-Ar),  
 5,81 (s, 1H, CHNap), 5,46 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, H-1<sup>B</sup>), 5,42  
 (d,  $J = 3,3$  Hz, 1H, H-4<sup>A</sup>), 4,83 (t,  $J = 11,4$  Hz, 2H, 2 x  
 CHHP), 4,69-4,33 (m, 5H, 4 x CHHP, H-3<sup>B</sup>), 4,26 (d,  $J =$   
 5 8,0 Hz, 1H, H-1<sup>A</sup>), 4,22 (dd,  $J = 7,9, 10,2$  Hz, 1H, H-2<sup>B</sup>),  
 3,97-3,80 (m, 5H, 2 x H-6<sup>A,B</sup>,  $\text{OCH}_{2a}$ ), 3,74 (dd,  $J = 9,6,$   
 3,4 Hz, 1H, H-3<sup>A</sup>), 3,72-3,60 (m, 1H, H-5<sup>A</sup>), 3,58-3,42 (m,  
 4H,  $\text{OCH}_{2b}$ , H-5<sup>B</sup>, H-2<sup>A</sup>, H-4<sup>B</sup>), 3,18 (dd,  $J = 10,1, 6,4$  Hz,  
 2H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 2,14 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1,75-1,69 (m, 2H,  
 10  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171,48, 167,38 (CO),  
 134,00-123,16 (C-Ar), 103,47 (C-1<sup>B</sup>), 101,60 (CHNap),  
 99,07 (C-1<sup>A</sup>), 82,91, 82,73, 78,71, 78,39, 74,50, 74,35,  
 74,30, 74,20, 74,01, 73,67, 72,76, 69,72 (C-4<sup>A</sup>), 69,03,  
 15 68,71 (2 x C-6), 68,55 ( $\text{OCH}_2$ ), 56,07 (C-2<sup>B</sup>), 48,05 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ),  
 28,99 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 20,89 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).



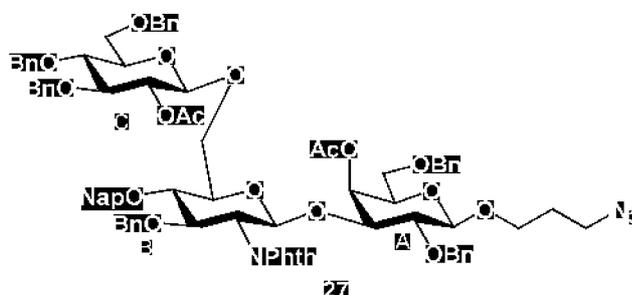
20 3-O-Benzyl-4-O-(2-naphtyl)méthylène-2-désoxy-2-  
 phtalimido-glucopyranosyl-(1→3)-4-O-acétyl-2,6-di-O-  
 benzyl- $\beta$ -D-galactopyranoside de 3-azidopropyle 25

Le disaccharide 24 (760 mg, 0,75 mmol) a été  
 dissous dans du  $\text{CH}_3\text{CN}$  (15 ml). La solution a été  
 25 refroidie à 0 °C et du complexe  $\text{BH}_3\cdot\text{NMe}_3$  (275 mg,  
 3,75 mmol) et du  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  (470  $\mu\text{l}$ , 3,75 mmol) ont été  
 ajoutés. La solution a été agitée pendant 6 h en  
 maintenant la température à 0 °C (CCM, mélange 7/3 de  
 toluène/EtAOc), puis la réaction a été neutralisée par

l'addition de TEA et de MeOH. Le solvant a été éliminé sous pression réduite et le produit brut a été purifié par chromatographie flash (toluène/EtOAc) pour donner le composé 25 dans un rendement de 64 % (483 mg, 0,48 mmol) sous la forme d'une huile jaune. HR ESI-MS  $m/z$   $C_{57}H_{58}N_4O_{13}$   $[M+Na]^+$  1029,3898 ; trouvé 1029,3902.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,86-7,37 (m, 26H, H-Ar), 5,64 (d,  $J = 3,4$  Hz, 1H, H-4<sup>A</sup>), 5,41 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H, H-1<sup>B</sup>), 5,04, 4,92 (2 d,  $J = 11,1$  Hz, 2H,  $CH_2Ar$ ), 4,86-4,73 (m, 2H, 2 CHHPPh), 4,48-4,25 (m, 5H, 4 CHHPPh, H-3<sup>B</sup>), 4,21 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H, H-1<sup>A</sup>), 4,18 (dd,  $J = 8,0, 10,1$  Hz, 1H, H-2<sup>B</sup>), 4,06-3,88 (m, 2H, 2 x H-6<sub>a</sub><sup>A,B</sup>), 3,87-3,82 (m, 1H,  $OCH_{2a}$ ), 3,72 (t,  $J = 9,0$  Hz, 2H, H-6b<sup>A,B</sup>), 3,69-3,67 (m, 1H,  $OCH_{2b}$ ), 3,50-3,34 (m, 5H, H-2<sup>A</sup>, H-3<sup>A</sup>, H-4<sup>B</sup>, H-5<sup>A,B</sup>), 3,17-2,98 (m, 2H,  $CH_2N_3$ ), 2,08 (s, 3H,  $CH_3CO$ ), 1,72-1,65 (m, 2H,  $CH_2CH_2N_3$ ).

RMN  $^{13}C$  (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171,51, 167,42 (CO), 134,11-123,13 (C-Ar), 103,44 (C-1<sup>B</sup>), 99,56 (C-1<sup>A</sup>), 81,11, 79,15, 78,77, 78,42, 77,79, 77,23, 75,71, 75,20, 74,89, 73,76, 73,38, (4 x  $CH_2Ar$ ), 72,38, 69,92 (C-4<sup>A</sup>), 68,08, 68,81 (2 x C-6), 61,50 ( $OCH_2$ ), 56,11 (C-2<sup>B</sup>), 48,01 ( $CH_2N_3$ ), 28,96 ( $CH_2CH_2N_3$ ), 21,23 ( $CH_3CO$ ).



25

2-O-Acétyle-3,4,6-tri-O-benzyle- $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 6)-3-O-benzyle-4-O-(2-naphtyle)méthylène-2-désoxy-2-

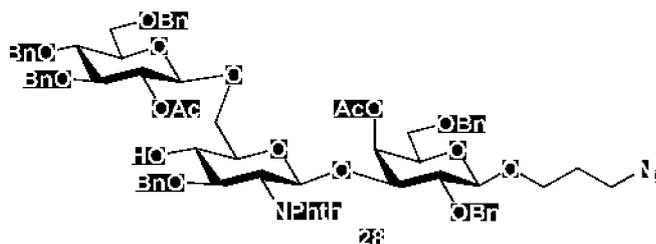
phtalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-4-O-acétyl-2,6-di-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranoside de 3-azidopropyle 27

Une solution des composés 25 (483 mg, 0,48 mmol) et 26 (413 mg, 0,62 mmol) avec des tamis moléculaires  
5 activés (4 Å, 800 mg) dans du DCM (8 ml) a été agitée pendant 20 min sous azote. Du TMSOTf (23  $\mu$ l, 0,12 mmol) a été ajouté à -10 °C. Après agitation du mélange réactionnel pendant 12 h à TA, de la TEA a été ajoutée jusqu'à pH neutre, le solide a été séparé par filtration  
10 et le solvant a été éliminé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash (mélange 8/2 de toluène/EtOAc) pour donner le composé 27 dans un rendement de 72 % (504 mg). HR ESI-MS  $m/z$  C<sub>86</sub>H<sub>88</sub>N<sub>4</sub>O<sub>19</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 1503,5940 ; trouvé 1503,5855.

15 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,76-6,55 (m, 41H, H-Ar), 5,42 (d,  $J$  = 3,2 Hz, 1H, H-4<sup>A</sup>), 5,34 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 1H, H-1<sup>B</sup>), 5,06 (t,  $J$  = 8,8 Hz, 1H, H-2<sup>C</sup>), 4,97-4,72 (m, 5H, 5 x CHHPh), 4,65 (d,  $J$  = 12,5 Hz, 1H, CHHPh), 4,60-4,39 (m, 9H, 8 x CHHPh, H-1<sup>C</sup>), 3,88-3,64 (m, 9H), 3,583,30 (m,  
20 9H), 3,26-3,09 (m, 3H, y compris, 3,10, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2,65, 2,10 (2 x s, 3H chacun, 2 x CH<sub>3</sub>CO), 1,82-1,71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171,38, 170,37, 169,72, 169,49 (C=O), 133,59-123,10 (C-Ar), 103,54 (C-1<sup>A</sup>),  
25 101,34 (C-1<sup>C</sup>), 98,56 (C-1<sup>B</sup>), 82,88, 79,94, 79,07, 78,64, 78,07, 77,60, 77,23, 75,25, 74,92, 74,74, 74,10, 73,69, 73,47 (7 x CH<sub>2</sub>Ar), 72,21, 69,78 (C-4<sup>A</sup>), 68,68, 68,53, 68,04 (3 x C-6), 66,71 (OCH<sub>2</sub>), 56,26 (C-2<sup>B</sup>), 48,09 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 29,03 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 22,28, 22,10 (2 x CH<sub>3</sub>CO).

30

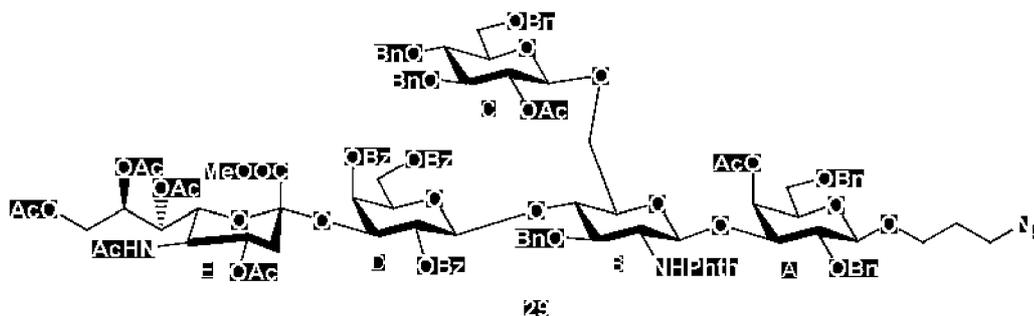


2-O-Acétyle-3,4,6-tri-O-benzyle- $\beta$ -D-glucopyranosyle-  
 (1 $\rightarrow$ 6)-3-O-benzyle-2-désoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyle-  
 5 (1 $\rightarrow$ 3)-4-O-acétyle-2,6-di-O-benzyle- $\beta$ -D-galactopyranoside de 3-azidopropyle 28

A une solution du composé 27 (504 mg, 0,34 mmol) dans un mélange 4/1 de DCM/CH<sub>3</sub>OH (12 ml), de la DDQ (235 mg, 1,02 mmol) a été ajoutée. Le mélange  
 10 réactionnel a été agité à TA pendant 5 h (CCM, mélange 7/3 de cyclohexane/EtOAc), puis il a été dilué avec du DCM et partagé avec du NaHCO<sub>3</sub> aqueux. La phase aqueuse a été extraite 3 fois avec 20 ml de DCM, puis les phases organiques combinées ont été séchées avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et  
 15 évaporées sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash (cyclohexane/EtOAc) pour donner le composé 28 sous la forme d'une huile jaune dans un rendement de 85 % (390 mg, 0,29 mmol). HR ESI-MS *m/z* C<sub>86</sub>H<sub>84</sub>N<sub>4</sub>O<sub>19</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1341,5495 ; trouvé 1341,5532.

20 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,76-6,55 (m, 34H, H-Ar), 5,36 (m, 2H, H-1<sup>B</sup>, H-4<sup>A</sup>), 5,07 (t, *J* = 8,2 Hz, 1H, H-2<sup>C</sup>), 4,89-4,75 (m, 3H, 3 x CHHPh), 4,71-4,41 (m, 8 H, CHHPh, y compris d, 4,66, d, *J* = 7,9 Hz, H-1<sup>C</sup>), 4,24-4,09 (m, 4H, H-6a<sup>A/C</sup>, 2 x CHHPh, y compris, 4,12, d, *J* = 7,0 Hz, H-1<sup>A</sup>), 4,03-3,61 (m, 10H), 3,59-3,67 (m, 7H), 3,15-3,09 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2,02, 2,00 (2 x s, 3H chacun, 2 x CH<sub>3</sub>CO), 1,73-1,66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171,40, 170,35, 169,72, 169,56 (C=O), 138,42-123,08 (C-Ar), 103,46 (C-1<sup>A</sup>), 100,42 (C-1<sup>C</sup>), 98,38 (C-1<sup>B</sup>), 82,70, 78,49, 78,29, 77,91, 75,03, 74,78, 74,23, 74,17, 74,07, 73,88, 73,71, 73,57, 5  
73,53, 72,80 (6 X  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72,54, 72,26, 69,65 (C-4<sup>A</sup>), 69,12, 68,20, 67,96 (3 x C-6), 66,76 ( $\text{OCH}_2$ ), 55,72 (C-2<sup>B</sup>), 48,07 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 29,23 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 20,96, 20,77 (2 x  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).



10

O-[4,7,8,9-Tétra-O-acétyl-5-(N-acétamido)-3,5-didésoxy-D-glycéro- $\alpha$ -D-galacto-non-2-ulopyranosylonate de méthyle]-(2 $\rightarrow$ 3)-O-(2,4,6-tri-O-benzoyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2-O-acétyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 6)]-3-O-benzyl-2-désoxy-2-phtalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-4-O-acétyl-2,6-di-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranoside de 3-azidopropyle 29

Une solution du trisaccharide 28 (390 mg, 0,29 mmol) et du disaccharide donneur (329 mg, 0,29 mmol) avec des tamis moléculaires activés (4 Å, 700 mg) dans du DCM (8 ml) a été agitée pendant 20 min sous azote. Du TMSOTf (11  $\mu\text{l}$ , 0,058 mmol) a été ajouté à  $-10^\circ\text{C}$ . Après agitation du mélange réactionnel pendant 10 h à TA, suivi par CCM (mélange 7/3 de toluène/acétone), de la TEA a été ajoutée jusqu'à pH neutre, le solide a été séparé

25

par filtration et le solvant a été éliminé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash (toluène/acétone) pour donner le composé 29 dans un rendement de 65 % (430 mg) sous la  
5 forme d'une mousse. HR ESI-MS  $m/z$   $C_{122}H_{129}N_3O_{39}$   $[M+Na]^+$  2310,8162 ; trouvé 2310,8175.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,10-6,62 (m, 49H, H-Ar), 5,59-5,56 (m, 1 H, H-8<sup>B</sup>), 5,41 (dd,  $J = 7,8, 9,2$  Hz, 1H, H-2<sup>D</sup>), 5,29-5,27 (s, 2H, H-7<sup>E</sup>, NH), 5,18 (dd,  $J = 2,3,$   
10 9,4 Hz, 1H, H-3<sup>D</sup>), 5,13 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, H-1<sup>B</sup>), 5,02 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H, H-1<sup>D</sup>), 4,92-4,88 (m, 2H, H-4<sup>A</sup>, H-4<sup>D</sup>), 4,87-4,57 (m, 7H), 4,51-4,25 (m, 9H, y compris d, 4,46,  $J = 7,8$  Hz, H-1<sup>C</sup>, et d, 4,26,  $J = 9,0$  Hz, H-1<sup>A</sup>), 4,15-3,94 (m, 8H), 3,81-3,57 (m, 13H, y compris s, 3,74,  
15  $COOCH_3$ ), 3,53 (dd,  $J = 2,3, 10,8$  Hz, 1H), 3,47-3,26 (m, 5H), 3,19 (t,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 3,07-3,02 (m, 2H,  $CH_2N_3$ ), 2,45 (dd,  $J = 12,5, 4,4$  Hz, 1H, H-3<sup>E</sup>), 2,11, 1,96, 1,85, 1,83, 1,70 (5 x s, 3H chacun, 6 x  $CH_3CO$ ), 1,64-1,53 (m, 3H, H-3<sup>A</sup>,  $CH_2CH_2N_3$ ), 1,35, 1,18 (2 x s, 3H chacun, 2 x  
20  $CH_3CO$ ).

RMN  $^{13}C$  (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  170,73, 170,55, 170,27, 170,21, 169,96, 169,13, 168,12, 167,77, 165,71, 165,55, 165,12 (C=O), 138,55-122,99 (C-Ar), 103,41 (C-1<sup>A</sup>), 101,54 (C-1<sup>C</sup>), 101,00 (C-1<sup>D</sup>), 98,45 (C-1<sup>B</sup>), 96,91, 82,61,  
25 79,17, 78,55, 78,18, 77,73, 76,82, 75,00, 74,82, 74,75, 74,62, 74,50, 74,02, 73,58, 73,48, 73,31, 72,48, 71,85, 71,80, 71,65, 70,67, 69,91, 69,37, 68,77, 68,68, 68,23, 67,93, 67,61, 66,61, 66,20, 62,10, 61,59 (4 x C-6), 56,11 (C-2<sup>B</sup>), 53,09 (C-5<sup>E</sup>), 48,87 ( $COOCH_3$ ), 48,05 ( $CH_2N_3$ ), 37,26  
30 (C-3<sup>C</sup>), 28,97 ( $CH_2CH_2N_3$ ), 23,15, 21,43, 21,08, 20,80, 20,75, 20,71, 20,24 (7 x  $CH_3CO$ ).

Exemple 8 - Déprotection finale des oligosaccharides et des composés 12, 18 et 29

Un mélange de pentasaccharide protégé (0,1 mmol) et  
5 de LiI (3 mmol) dans de la pyridine (5 ml) a été chauffé  
pendant 24 h à 120 °C. Le mélange réactionnel a été  
concentré sous vide, et le résidu a été purifié par  
chromatographie sur colonne de gel de silice (gradient  
de 2 % de MeOH dans du DCM) pour donner le produit  
10 déméthylé. Ce matériau a été dissous dans de l'éthanol  
(4 ml), et de l'éthylènediamine (400 ml) a été ajoutée.  
Après agitation pendant 16 h à 90 °C, le mélange  
réactionnel a été ensuite concentré sous vide, et le  
résidu a été coévaporé à partir de toluène (2 x 10 ml)  
15 et d'EtOH (2 x 5 ml). Le mélange brut a été redissous  
dans de la pyridine (5 ml), et de l'anhydride acétique  
(5 ml) a été ajouté. Après agitation pendant 16 h à  
température ambiante, le mélange réactionnel a été  
concentré sous pression réduite. Le résidu a été dissous  
20 dans du MeOH et du MeONa a été ajouté jusqu'à pH = 13.  
Après 48 h, la réaction a été neutralisée et le solvant  
a été éliminé sous vide. Le résidu a été dissous dans du  
MeOH et du Pd/C (1/1 p/p par rapport au sucre) a été  
ajouté. Le mélange réactionnel a été agité sous pression  
25 de H<sub>2</sub> (3 bars) pendant 72 h. Puis, le catalyseur a été  
séparé par filtration et le filtrat a été concentré sous  
pression réduite. Le mélange réactionnel a été purifié  
par chromatographie d'exclusion sur colonne G-10 en  
utilisant de l'eau pour l'élution. Les fractions  
30 contenant le sucre ont été quantifiées par dosage de  
l'acide sialique et cryodesséchées pour donner les

composés oligosaccharidiques déprotégés 1 à 3 sous la forme d'une poudre amorphe (rendement de 31 à 55 %).

O-[5-N-Acétamido-3,5-didésoxy-D-glycéro- $\alpha$ -D-galacto-non-2-ulopyranosyl-(2→3)-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1→3)-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1→4)-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de 3-aminoopropyle 1

HR ESI-MS  $m/z$  C<sub>40</sub>H<sub>69</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1056,3971 ; trouvé 1056,3966.

10 O-[5-N-Acétamido-3,5-didésoxy-D-glycéro- $\alpha$ -D-galacto-non-2-ulopyranosyl-(2→3)-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-[( $\beta$ -D-glucopyranosyl)(1→6)]-O-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1→3)-O- $\beta$ -D-galactopyranoside de 3-aminoopropyle 2

15 HR ESI-MS  $m/z$  C<sub>40</sub>H<sub>69</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 1078,3810 ; trouvé 1078,3810.

O-[5-N-Acétamido-3,5-didésoxy-D-glycéro- $\alpha$ -D-galacto-non-2-ulopyranosyl-(2→3)-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-[( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1→6)]-O-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside 3-aminoopropyle 3

HR ESI-MS  $m/z$  C<sub>40</sub>H<sub>69</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1056,3969 ; trouvé 1056,3966.

25 Les spectres de RMN des composés 1 à 3 sont rapportés dans le tableau 2 ci-dessous :

Table 2

Signaux de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (ppm) des composés 1 à 3 dans de la D<sub>2</sub>O<sup>a</sup>

Résidu		Composé 2		Composé 1		Composé 3	
		<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
Gal	1	4,45	103,28	4,43	103,77	4,39	103,72

		<i>J</i> 7,8 Hz		<i>J</i> 8,2 Hz		<i>J</i> 8,0 Hz	
	2	3,55	71,58	3,57	70,68	3,57	70,49
	3	3,68	73,18	3,72	82,85	3,72	83,08
	4	3,93	69,48	4,16	69,05	4,16	69,16
	5	3,68	72,96	3,66	75,10	3,69	75,70
	6	3,71	61,58	3,65	63,16	3,73	62,35
	6'	3,76		3,88		3,76	
	1	4,52	101,98	4,69	103,72	4,71	103,63
		<i>J</i> 7,8 Hz		<i>J</i> 8,2 Hz		<i>J</i> 8,0 Hz	
GlcNAc	2	3,75	55,68	3,81	55,89	3,80	56,08
	3	3,72	74,23	3,73	72,82	3,73	73,40
	4	3,86	77,98	3,76	78,50	3,88	78,28
	5	3,72	76,02	3,72	75,69	3,73	74,38
	6	4,00	68,18	3,95	68,18	3,97	68,51
	6'	4,31		3,95		4,30	
	1	4,55	103,00	4,50	102,74	4,52	103,66
		<i>J</i> 7,8 Hz		<i>J</i> 8,5 Hz		<i>J</i> 8,0 Hz	
Glc	2	3,37	73,35	3,32	73,51	3,31	73,88
	3	3,67	75,15	3,64	75,38	3,52	76,78
	4	3,67	78,75	3,65	78,58	3,40	70,78
	5	3,68	75,54	3,66	75,38	3,53	76,58
	6	3,84	60,73	3,81	60,62	3,73	61,38
	6'	3,99		3,96		3,93	
	1	4,61	102,78	4,56	103,00	4,62	102,95
		<i>J</i> 7,6 Hz		<i>J</i> 9,0 Hz		<i>J</i> 7,8 Hz	
Gal <sub>s</sub>	2	3,56	69,89	3,57	70,22	3,57	70,28
	3	4,10	75,93	4,12	76,18	4,10	76,48
	4	3,96	68,27	3,92	68,78	3,97	68,40
	5	3,67	75,33	3,71	75,56	3,70	76,08
	6	3,71	61,80	3,74	61,85	3,73	61,78
	6'	3,75		3,71		3,76	
	3	2,76	40,36	2,76	40,35	2,76	40,38
	3'	1,83		1,80		1,82	
	4	3,67	69,30	3,68	69,05	3,68	69,38
	5	3,85	52,34	3,85	52,36	3,85	52,58
NeuNAc	6	3,63	73,60	3,62	73,70	3,64	74,05
	7	3,60	69,05	3,65	68,78	3,60	69,25
	8	3,87	72,45	3,87	72,59	3,88	72,70
	9	3,86	63,18	3,88	63,27	3,87	63,54
	9'	3,66		3,65		3,66	

a. Les expériences de RMN ont été réalisées sur un instrument de RMN 500 MHz Bruker équipé d'une sonde TBI refroidie à température contrôlée ( $\pm 0,1$  °C). L'acquisition et le traitement des données ont été effectués en utilisant le logiciel TOPSPIN™ 1.3 et 3.1, respectivement.

b. Gal<sub>s</sub> se rapporte au résidu lié à NeuNAc

#### Conjugaison à CRM<sub>197</sub>

Une solution de SIDEA (10 équivalents) et de TEA (0,2 équivalent) dans du DMSO a été ajoutée au pentasaccharide 13. La réaction a été agitée pendant 3 h, puis le produit a été précipité à 0 °C par addition d'acétate d'éthyle (9 volumes). Le solide a été lavé 10 fois avec de l'acétate d'éthyle (2 volumes à chaque fois) et lyophilisé. Le sucre activé a été conjugué à CRM<sub>197</sub> dans du NaPi 100 mM à une concentration de protéine de 5 mg/ml, en utilisant un rapport de 50 à 100/1 de mol de saccharide/mol de protéine.

#### Exemple 9 - Conjugaison d'oligosaccharides PSIII semi-synthétiques à une protéine de support

Pour la réaction de conjugaison à CRM<sub>197</sub>, des oligosaccharides purifiés provenant d'une dépolymérisation chimique ont été dissous dans 100 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7.2. Du CRM<sub>197</sub> a été ajouté à la solution dans un rapport molaire ester actif sur protéine variant de 10/1 à 70/1 et une concentration finale de 10 mg/ml en protéine. Puis, du NaBCNH<sub>3</sub> a été ajouté à la solution (saccharide/NaBCNH<sub>3</sub>, 1/1, p/p) et incubé pendant une nuit à 37 °C. La conjugaison a été suivie par SDS-PAGE avec 4 à 12 % de polyacrylamide dans du MOPS. Les conjugués ont été purifiés à partir du saccharide qui n'a pas réagi sur une colonne d'hydroxyapatite CHT, en utilisant pour l'élution 2 mM de phosphate de sodium/300 mM de NaCl à pH 7,2 (20 ml, 1 ml/min), ceci suivi de 400 mM de phosphate de sodium à pH 7,2 (40 ml, 1 ml/min). Lorsque du CRM<sub>197</sub> qui n'avait

pas réagi était présent, le conjugué a été purifié par chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite CHT en utilisant un programme d'élution en 4 étapes : 2 mM de phosphate de sodium/ 300 mM de NaCl à pH 7,2 (20 ml, 1 ml/min), 10 mM de phosphate de sodium à pH 7,2 (20 ml, 1 ml/min), 35 mM de phosphate de sodium à pH 7,2 (20 ml, 1 ml/min), et 400 mM de phosphate de sodium à pH 7,2 (40 ml, 1 ml/min). Le conjugué a été détecté par mesure de l'absorption UV à 215, 254 et 280 nm. La teneur en protéine dans les glycoconjugués purifiés a été déterminée par micro-BCA (Thermo-scientific). La teneur en saccharide a été estimée par une analyse HPAEC-PAD. Les spectres MALDI TOF des oligosaccharides conjugués sont fournis sur la figure 8A (conjugués des fragments synthétiques 1 à 3) et 8B (conjugués des oligosaccharides), où GD indique le degré de glycosylation.

Tableau 3

20 Caractéristiques physico-chimiques des glycoconjugués préparés

	Concentration en protéine (µg/ml)	Concentration en saccharide (µg/ml)	Degré de glycosylation (mol/mol)
CRM-fragment synthétique III 1	1428	75	3,0
CRM-fragment synthétique III 2	1268	64	3,0
CRM-fragment synthétique III 2	1035	409	23,0
CRM-fragment synthétique III 3	1518	700	27,0
CRM-III DP2	1122	140	3,5

CRM-III DP2	535	160	9,0
CRM-III DP3	383	44	2,0
CRM-III DP3	484	130	4,5
CRM-III DP5	639	159	3,0
CRM-III DP5	349	161	5,5
CRM-III DP6,5	456	79	1,5
CRM-III DP6,5	289	110	3,5
CRM-III DP11	531	235	2,5
CRM-III PSIII	725	836	0,4

Exemple 10 - Immunogénicité des conjugués chez des souris

Deux groupes de huit souris BALB/c femelles ont été immunisés par injection intrapéritonéale de 0,5 µg de teneur en saccharide de chaque glycoconjugué formulé avec 400 µg d'hydroxyde d'aluminium en tant qu'adjuvant. De l'hydroxyde d'aluminium et CRM-PSIII ont été utilisés en tant que témoins. Les souris ont reçu les vaccins aux jours 1, 21 et 35. Les sérums ont été prélevés aux jours 1, 21, 35 et 49.

Analyse ELISA : les titres du test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) indirect des IgG spécifiques du PS ont été déterminés en utilisant du HSA-PSIII en tant que réactif de sensibilisation. Des plaques de microtitrage (NUNC Maxisorp ; Nalge Nunc International Corp., Rochester, NY) ont été sensibilisées par l'addition de 100 µl par puits de réactif de sensibilisation (1 µg/ml) dans du PBS 1X à pH 7,2. Les plaques ont été incubées pendant une nuit à 4 °C et elles ont été lavées avec du PBS contenant 0,05 % de Tween 20 (PBS-T) puis bloquées avec 2 % de sérumalbumine bovine dans du PBS-T pendant 1,5 h à 37 °C. Les puits ont été ensuite remplis avec 100 µl de sérum dilué dans du PBS-

T + 2 % de BSA et incubés à 37 °C pendant 1 h. Après 3 lavages, 100 µl/puits d'IgG anti-souris-phosphatase alcaline ou d'IgG anti-lapin-phosphatase alcaline diluée dans du PBST + 2 % de BSA ont été ajoutés (Sigma-  
5 Aldrich) et les plaques ont été incubées pendant 1,5 h à 37 °C. Les plaques ont été à nouveau lavées 3 fois avec du PBS-T, et finalement 100 µl de substrat de peroxydase (4 mg/ml en diéthanolamine pH 9,8) ont été ajoutés dans chaque puits, ceci suivi d'une incubation  
10 des plaques pendant 30 min à TA. La réaction a été neutralisée par l'addition de 100 µl d'une solution de 7 % d'EDTA et les plaques ont été lues immédiatement à 405 nm.

Test ELISA par compétition : des tests d'inhibition  
15 par compétition ont été effectués en suivant la procédure ELISA telle que décrite ci-dessus avec les modifications suivantes. Après l'étape de blocage, en utilisant une plaque de microtitrage en polypropylène à liaison faible (NUNC), le PS III ou ses fragments ont été dilués dans  
20 du tampon de dilution (PBS-T + 2 % de BSA) avec une étape de dilution au demi débutant à partir de 2 mg/ml. Ensuite, le même volume d'Acm à une concentration fixée a été ajouté aux puits et la réaction a été laissée interagir pendant 20 min à TA. Après un léger mélange, la réaction  
25 a été transférée (100 µl/puits) aux plaques sensibilisées et saturées et incubée pendant 1 heure à 37 °C. Le reste de la procédure a été suivi comme il a été décrit ci-dessus.

Test de destruction par opsonophagocytose (OPKA) :  
30 l'activité fonctionnelle des sérums a été déterminée dans un test OPKA. Des cellules HL-60 ont été cultivées

dans du RPMI 1640 avec 20 % de sérum de veau fœtal. L'incubation a été réalisée à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules HL-60 se sont différenciées en neutrophiles avec 0,78 % de DMF et après 4 à 5 jours, elles ont été  
5 utilisées comme source de phagocytes. Les sérums dilués en série dans du HBSS rouge ont été mélangés avec  $6 \times 10^4$  CFU par puits de la souche de SGB du sérotype III COH1. Des cellules HL-60 ( $2 \times 10^6$  cellules/puits) et du complément de lapin (dilué à 2 % dans de l'eau) ont été  
10 ajoutés et incubés à 37 °C pendant 1 h sous agitation. Avant (T0) et après (T60) l'incubation, les mélanges ont été dilués et plaqués sur des plaques de gélose au sang (Becton-Dickinson). Chaque plaque a été ensuite incubée pendant une nuit à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>, comptage des  
15 CFU le jour suivant. Le titre OPA a été exprimé sous la forme de l'inverse de la dilution de sérum conduisant à 50 % de destruction des bactéries, et le pourcentage de destruction est calculé comme suit : % de destruction =  
(T0 - T60)/T0 où T0 représente la moyenne des CFU  
20 comptées à T0, et T60 représente la moyenne des CFU comptées à T60 pour les deux réplicats de chaque dilution de sérum.

Analyse par résonance plasmonique de surface (RPS) : les cinétiques et les affinités de liaison ont été  
25 déterminées par RPS en utilisant un système BIACORE X100. Les glycoconjugués du PSIII et de ses fragments ont été immobilisés sur des puces de capteurs CM5 de qualité recherche (Biacore) en utilisant le kit de couplage d'amine fourni par le fabricant (Biacore). Les  
30 immobilisations ont été conduites dans 10 mM d'acétate de sodium (pH 4,5) à des concentrations de conjugués de

50 mg/ml. La densité de surface immobilisée était de ~250 unités de résonance dans chaque cas. Les mesures ont été conduites dans 10 mM de HEPES (pH 7,2), 150 mM de NaCl, 3 mM d'EDTA, 0,005 % de Tween 20 à 25 °C et à un débit de 45 µl/min. À la suite de la liaison de l'Acm ou du Fab, les surfaces des conjugués ont été régénérées avec 3,5 M de MgCl<sub>2</sub> et un temps de contact de 120 s. Les données des sensorgrammes ont été analysées en utilisant le logiciel BIAevaluation (Biacore).

10 Inhibition de la liaison des Fab par RPS : des tests d'inhibition ont été effectués en suivant la procédure de RPS telle que décrite ci-dessus en utilisant une puce de capteur CM5 avec du HSA-PSIII immobilisé. L'analyse de la liaison a été effectuée avec des échantillons de 15 Fab à une concentration fixée préincubés avec le PSIII ou ses fragments dilués en série (2x) en débutant partir d'une concentration de 2 mg/ml.

#### Résultats

20 Les données montrent que les conjugués de l'invention comprenant des oligosaccharides fournissent des caractéristiques équivalentes ou améliorées comparativement aux conjugués comprenant des polysaccharides capsulaires natifs pleine longueur.

25 Les expériences ELISA par compétition utilisant l'Acm de lapin NVS 1-19-5m montrent la dépendance à la longueur de la capacité du polysaccharide à inhiber la liaison aux Acm protecteurs anti-PSIII (figure 9a). L'inhibition de la liaison des Acm a légèrement augmenté avec la taille des PS de DP2 à 13 jusqu'à 1 log et se 30 sont retrouvés 5 log supérieurs lorsque le PSIII a été utilisé en tant qu'inhibiteur.

Pour exclure l'effet de l'interaction des IgG bivalentes des AcM sur l'avidité, il a été effectué un test de RPS par compétition dans lequel des fragments oligosaccharidiques (plage de DP1 à 13) ont été testés en tant que compétiteurs pour la liaison du fragment Fab soluble au PSIII conjugué à de la sérumalbumine humaine (HSA) immobilisé sur la puce. Deux populations majeures d'inhibiteurs,  $DP \geq 2$  et  $DP < 2$ , ont été différenciées (figure 9b). Les oligosaccharides  $DP \geq 2$  ont montré une augmentation de façon asymptotique de l'affinité pour le PSIII natif, avec une différence de seulement 2 log entre le PSIII et le DP2 (figures 9A et 9B). Cette observation a été corroborée par une différence inférieure à un log du  $K_d$  pour l'interaction du PSIII et d'un Fab protecteur de lapin-HSA calculé par RPS (comme il est montré dans le tableau 4). Ces données suggèrent que la partie impliquée dans la liaison n'est pas différente pour les fragments avec une  $DP \geq 2$ .

20

Tableau 4

Constantes cinétiques et d'affinité pour la liaison du Fab de lapin aux conjugués de CRM

	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_d$ (M)
PSIII	$1,4 \times 10^5$ ( $\pm 1,4$ ) <sup>a</sup>	$3,6 \times 10^{-3}$ ( $\pm 0,8$ )	$2,6 \times 10^{-8}$
DP2	$3,9 \times 10^4$ ( $\pm 1,4$ )	$4,4 \times 10^{-3}$ ( $\pm 6,1$ )	$1,1 \times 10^{-7}$

<sup>a</sup> Les nombres entre parenthèses sont les ET en %

Exemple 11 - Analyse ELISA du sérum immun de souris en utilisant des fragments synthétiques en tant que réactifs de sensibilisation

Les glycoconjugués issus des fragments synthétiques DP1 1 à 3 ont été utilisés pour mesurer par un test ELISA les anticorps spécifiques présents dans le sérum murin anti-PSIII produits par immunisation avec le polysaccharide natif conjugué à une protéine des poils des SGB (figure 10). Les composés conjugués 2 et 3, présentant un résidu Glc  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)lié à GlcNAc, ont affiché la liaison la plus élevée. À l'opposé, l'oligosaccharide linéaire conjugué 1 a été reconnu ~10 fois moins que 2 et 3, et seulement légèrement mieux que le témoin négatif CRM197. Comme on s'y attendait, le taux le plus élevé d'anticorps anti-PSIII a été détecté pour le témoin positif PSIII-CRM<sub>197</sub>. En somme, ces données ont indiqué que la présence de la ramification est un motif structural pertinent pour la reconnaissance des anticorps anti-PSIII.

20

Exemple 12 - Analyse *in vivo* des conjugués oligosaccharidiques de longueur différente (figures 11A et B)

L'effet de la longueur de la chaîne sur l'immunogénicité des glycoconjugués de PSIII a été testé *in vivo*. Les souris ont été immunisées avec des conjugués de CRM197 des différents fragments. Un rappel a été donné après deux semaines, suivi d'un second rappel après trois semaines. Après la troisième immunisation, les sérums ont été examinés pour la teneur en IgG anti-PSIII et leur activité opsonophagocytaire.

30

Le conjugué de DP 2 a été le fragment le plus court déclenchant des anticorps anti-PSIII (figure 11A). Une souris a donné des anti-PSIII dirigés contre l'unité répétitive ramifiée (structure 2). Ce sérum était doté d'une fonctionnalité modeste dans l'analyse OPKA. Les fragments avec une DP  $\geq$  3 ont induit des IgG anti-PSIII à des taux significativement supérieurs par rapport au PSIII natif pleine longueur. Les titres OPKA ont été 4 à 5 fois supérieurs à celui du PSIII natif (tableau 4 et figure 11B). Ces données ont indiqué que les fragments avec une DP  $\geq$  2 peuvent être utilisés pour préparer des vaccins anti-SGB du sérotype III efficaces, puisqu'ils contiennent la partie minimale qui est nécessaire pour soulever des anticorps protecteurs.

15

Tableau 5

Moyenne géométrique et titres OPKA pour les sérums dérivant des différents conjugués

	Degré de glycosylation (mol/mol)	Titre ELISA (UE/ml) Moyenne géométrique (IC à 95 %)	Titre OPK moyen
CRM-fragment synthétique III 1	3,0	10	< 30
CRM-fragment synthétique III 2	3,0	10	< 30
CRM-fragment synthétique III 2	23,0	15 (10-29)	< 30
CRM-fragment synthétique III 3	27,0	-	< 30
CRM-III DP2	3,5	13 (10-19)	< 30
CRM-III DP2	9,0	237 (101-556)	590
CRM-III DP3	2,0	61 (23-161)	176

CRM-III DP3	4,5	1946 (953-3977)	1862
CRM-III DP5	3,0	3124 (1780-5484)	2499
CRM-III DP5	5,5	1179 (159-8771)	3321
CRM-III DP6,5	1,5	540 (196-1484)	1250
CRM-III DP6,5	3,5	2262 (1467-3490)	1501
CRM-III DP11	2,5	756 (332-1723)	461
CRM-III PSIII	0,4	517 (345-774)	484

Pour les fragments les plus courts (DP 2 et 3), un paramètre qui s'est révélé crucial pour induire des bons taux d'anticorps fonctionnels a été le rapport molaire saccharide/protéine. Comme il est montré sur la figure 12, lorsque ce rapport a été bas (3,5 pour DP 2 et 4,5 pour DP 3), les glycoconjugués ont été inefficaces. Toutefois, lorsque le rapport molaire saccharide/protéine a été augmenté jusqu'à 9,0 et 4,5 mol de saccharide/mol de protéine pour les DP2 et 3, respectivement, les glycoconjugués sont devenus comparables ou supérieurs au polysaccharide pleine longueur en termes de titres à la fois en IgG et OPKA (figures 12A et 12B, degré de glycosylation indiqué entre parenthèses sur les figures).

Alors que certains modes de réalisation de la présente invention ont été décrits et illustrés spécifiquement ci-dessus, il n'est pas prévu que l'invention soit limitée à de tels modes de réalisation. Diverses modifications peuvent y être apportées sans s'écarter de l'étendue et de l'esprit de la présente

invention telle que présentée dans les revendications suivantes.

Références

1. Wessels *et al.* (1990) *J Clin Invest* 86: 1428-33.
2. Paoletti *et al.* (1992) *Infect Immun* 60: 4009-14.
- 5 3. Paoletti *et al.* (1992) *J Clin Invest* 89: 203-9.
4. Wessels *et al.* (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9170-4.
5. Wang *et al.* (2003) *Vaccine* 21: 1112-7.
- 10 6. Wessels *et al.* (1993) *Infect Immun* 61: 4760-6.
7. Wessels *et al.* (1995) *J Infect Dis* 171: 879-84.
8. WO 2005/000346
9. Anonyme (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- 15 10. Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1): 233-238.
11. Anderson *et al.* (1985) *J Clin Invest* 76(1): 52-59.
12. EP-A-0372501
13. EP-A-0378881
- 20 14. EP-A-0427347
15. WO 93/17712
16. WO 94/03208
17. WO 98/58668
18. EP-A-0471177
- 25 19. WO 91/01146
20. Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31: 3816-24.
21. Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72: 4884-87.
- 30 22. EP-A-0594610

23. WO 00/56360
24. WO 02/091998
25. Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63: 2706-13.
26. WO 01/72337
- 5 27. WO 00/61761
28. WO 00/33882
29. WO 96/40242
30. Lei *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103: 259-  
264.
- 10 31. WO 00/38711 ; brevet US 6 146 902.
32. Demande de brevet international  
PCT/IB2008/02690, 'CONJUGATE PURIFICATION',  
revendiquant la priorité à GB-0713880.3 (NOVARTIS AG),  
publié sous WO 2009/010877.
- 15 33. WO 99/24578
34. WO 99/36544
35. WO 99/57280
36. WO 00/22430
37. Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287: 1809-1815.
- 20 38. WO 96/29412
39. Pizza *et al.* (2000) *Science* 287: 1816-1820.
40. WO 01/52885
41. Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775): 1093-  
1096.
- 25 42. Fukasawa *et al.* (1999) *Vaccine* 17: 2951-2958.
43. Rosenqvist *et al.* (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:  
323-333.
44. Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10: 691-698.
45. WO 03/007985
- 30 46. Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 331-332.
47. Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 269-285.

48. Jedrzejak (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 187-207.
49. Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 1187-1188.
50. Iwarson (1995) *APMIS* 103: 321-326.
- 5 51. Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl: S63-68 & 79-80.
52. Hsu et al. (1999) *Clin Liver Dis* 3: 901-915.
53. Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334: 349-355.
- 10 54. Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9: 232-238.
55. *Vaccines* (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.
56. WO 02/02606
57. Kalman et al. (1999) *Nature Genetics* 21: 385-15 389.
58. Read et al. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
59. Shirai et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3): S524-S527.
- 20 60. WO 99/27105
61. WO 00/27994
62. WO 00/37494
63. WO 99/28475
64. Ross et al. (2001) *Vaccine* 19: 4135-4142.
- 25 65. Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 287-308.
66. Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59: 113-118, 125-126.
67. Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl: S2-6.
- 30 68. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16; 47(1): 12, 19.

69. McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1: S101-107.
70. WO 02/34771
71. Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13: 227-43, viii.
- 5 72. Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
73. Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264): 1225-1240 ; voir également pages 1218-1219.
74. Paoletti *et al.* (2001) *Vaccine* 19: 2118-2126.
75. WO 00/56365
- 10 76. Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ème édition, ISBN: 0683306472.
77. Paoletti (2001) *Vaccine* 19(15-16): 2118-26.
78. WO 03/009869
79. Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3: 15 455-467.
80. Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37: 6-16.
81. WO 00/53221
82. Jakobsen *et al.* (2002) *Infect Immun* 70: 1443-20 1452.
83. Bergquist *et al.* (1998) *APMIS* 106: 800-806.
84. Baudner *et al.* (2002) *Infect Immun* 70: 4785-4790.
85. Ugozzoli *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186: 1358-25 1361.
86. Hennings *et al.* (2001) *J Infect Dis.* 183(7): 1138-42. Epub le 1er mars 2001
87. Lin *et al.* (2001) *J Infect Dis.* 184(8): 1022-8.
- 30 88. Lin *et al.* (2004) *J Infect Dis.* 190(5): 928-34

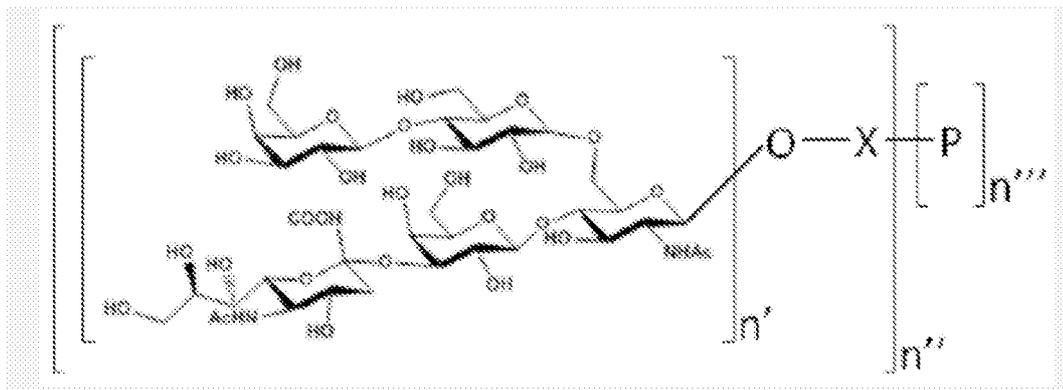
89. Glezen & Alpers (1999) *Clin. Infect. Dis.* 28:  
219-224
90. Madoff *et al.* (1994) *J Clin Invest* 94: 286-92.
91. Paoletti *et al.* (1994) *Infect Immun* 62: 3236-  
5 43.

REVENDICATIONS

1. Conjugué comprenant un fragment d'un polysaccharide capsulaire (PSC) d'un streptocoque du groupe B (SGB) du sérotype III et une protéine de support, dans lequel le fragment est un oligosaccharide comportant de 2 à 11 unités répétitives du PSC du SGB du sérotype III et où le conjugué présente un degré de glycosylation de 2 à 9.

2. Conjugué ayant la formule : (1)

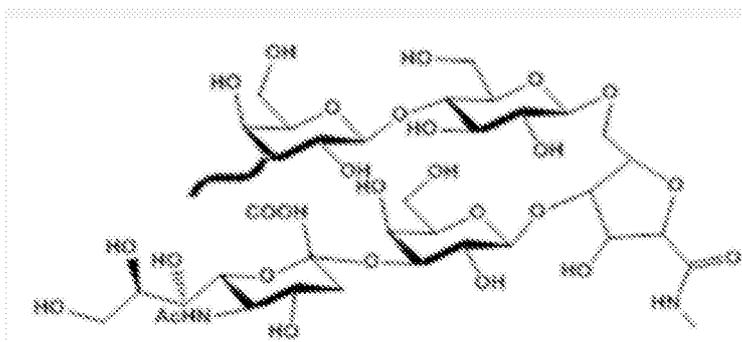
10



dans laquelle P représente une protéine de support, X représente soit :

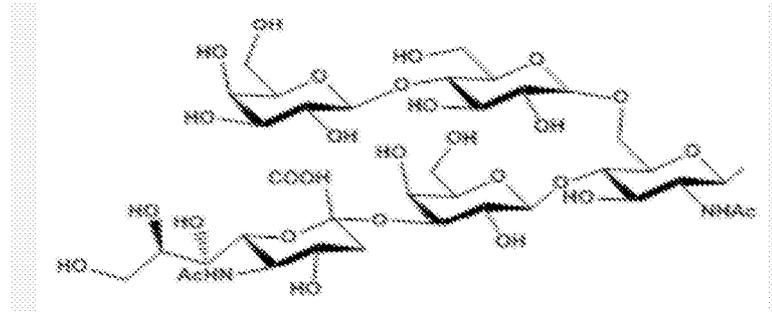
(i)

15



soit

(ii)



5            n' est un nombre entier de 1 à 10, n'' est un nombre  
entier de 2 à 9 et dans lequel n''' vaut 1.

3. Conjugué selon la revendication 1 ou 2, dans  
lequel la protéine de support est choisie dans le groupe  
constitué de l'anatoxine diphtérique, CRM197 et  
10 l'anatoxine tétanique.

4. Conjugué selon la revendication 3, dans lequel  
l'oligosaccharide est un oligosaccharide synthétique.

5. Conjugué selon la revendication 3, dans lequel  
l'oligosaccharide est préparé par dépolymérisation du  
15 PSC du SGB du sérotype III.

6. Composition comprenant le conjugué selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 5.

7. Composition selon la revendication 6, où ladite  
composition est un vaccin.

20            8. Composition selon l'une quelconque des  
revendications précédentes pour une utilisation dans un  
procédé permettant de générer une réponse immunitaire  
chez un mammifère.

FIG. 1

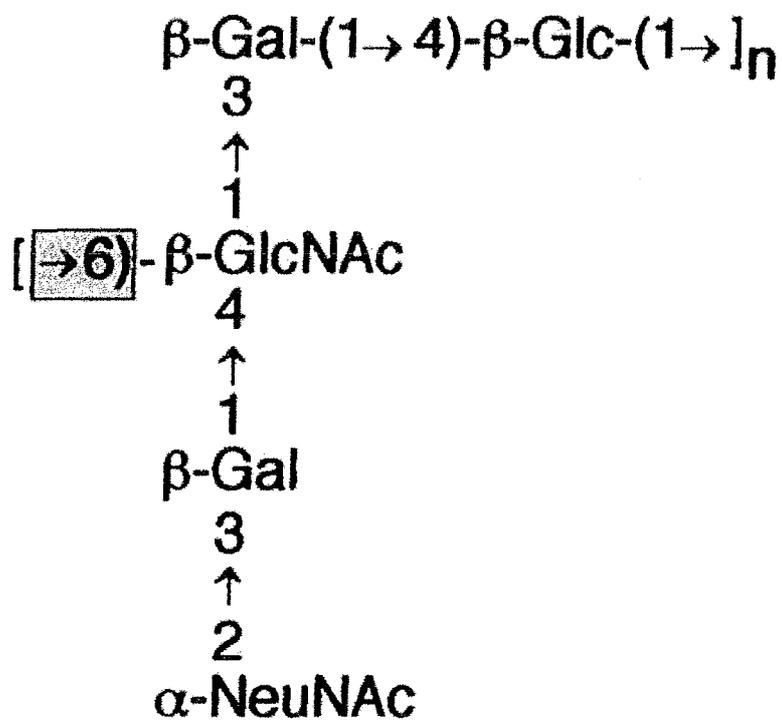


FIG 2

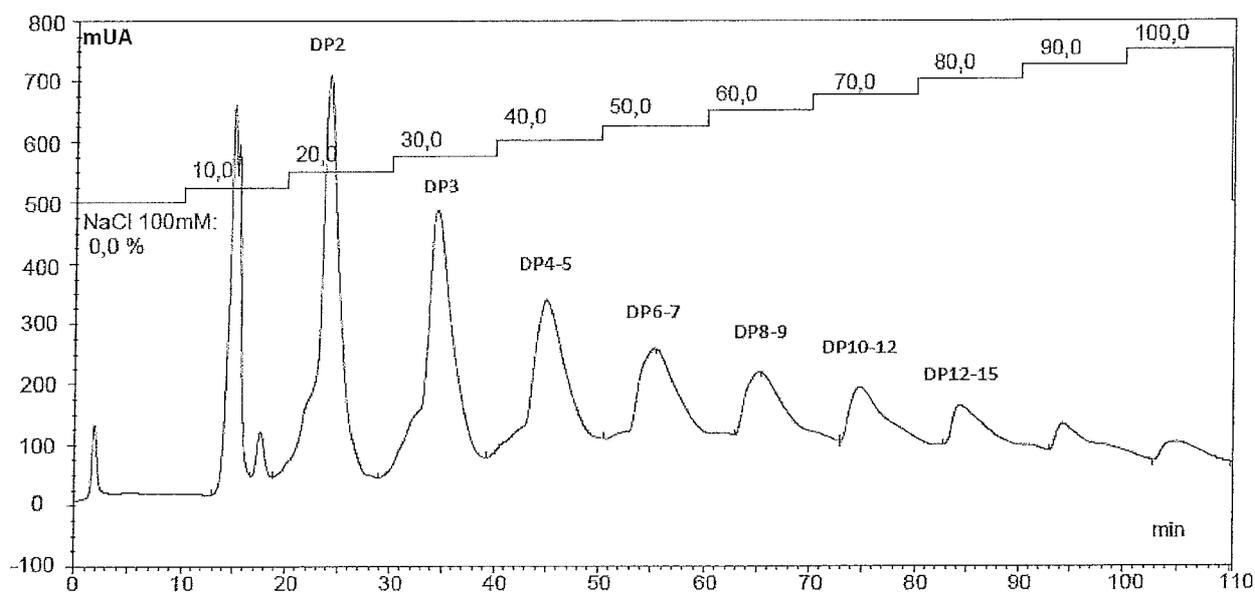
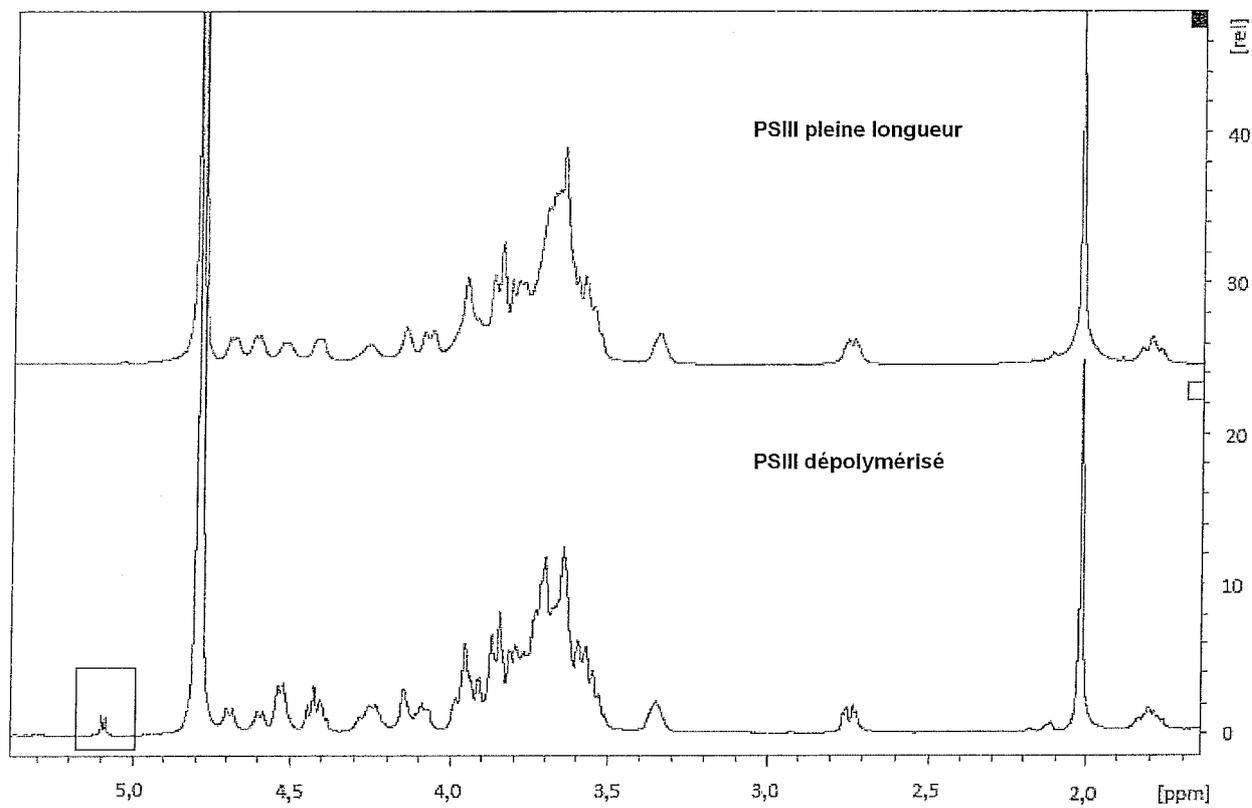


FIG 3



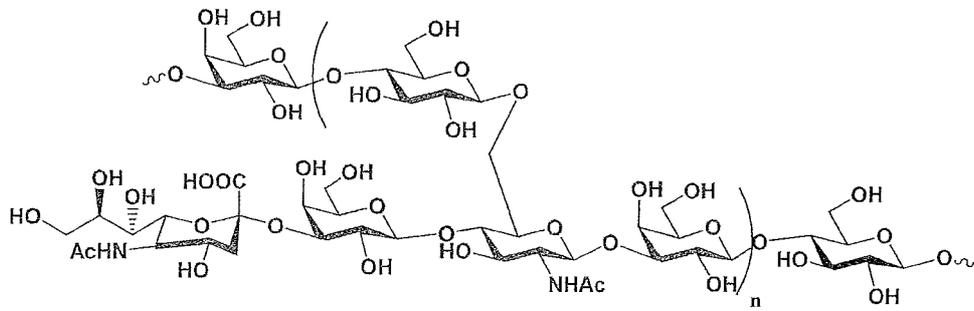


Fig. 4A

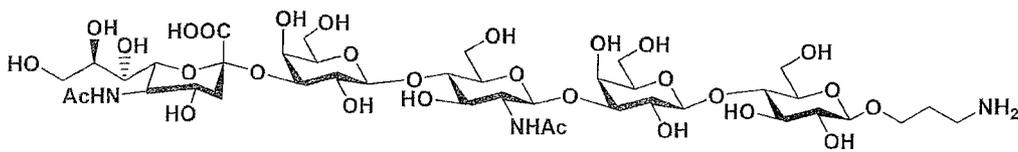


Fig. 4B

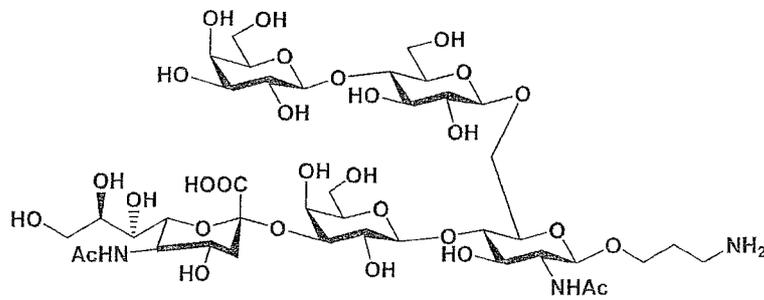


Fig. 4C

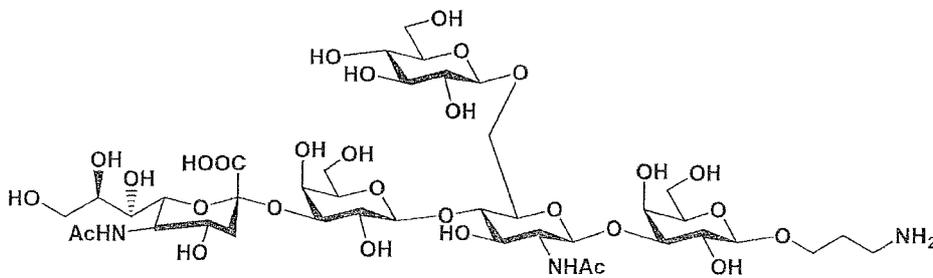


Fig. 4D

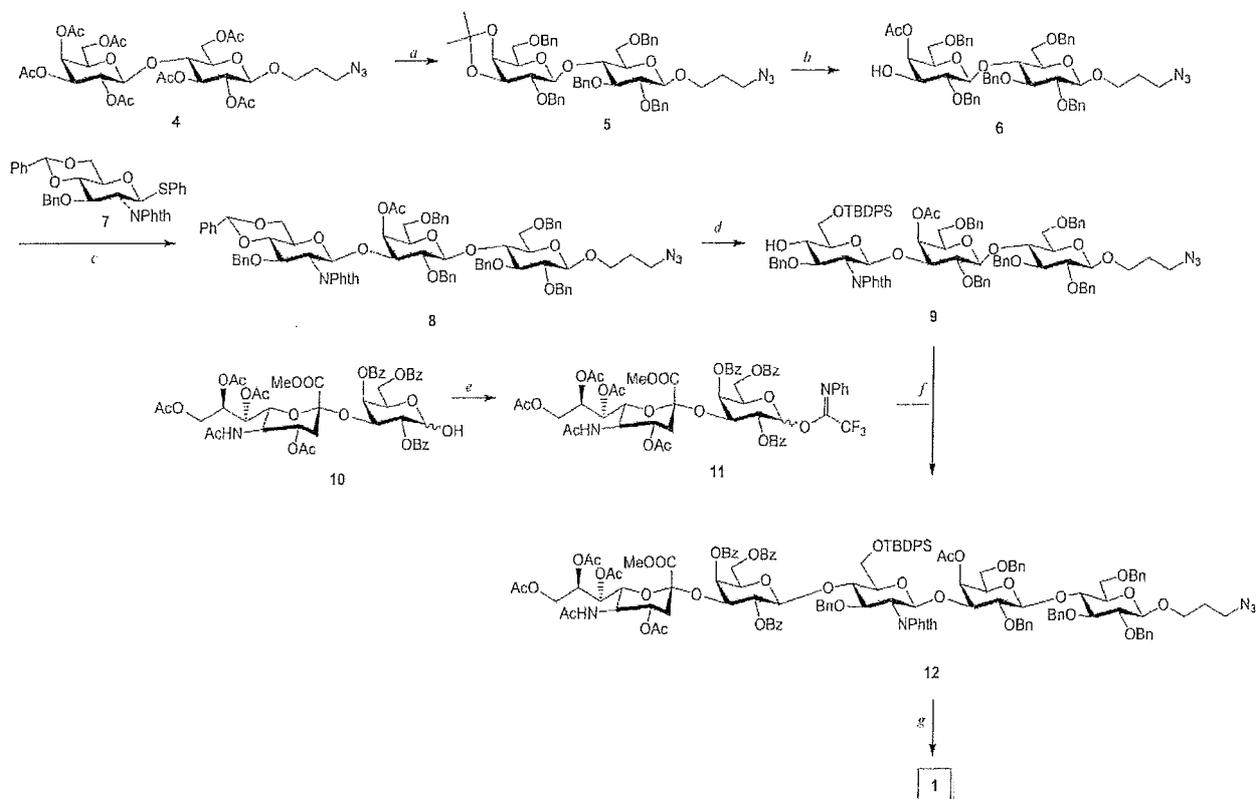


FIG. 5

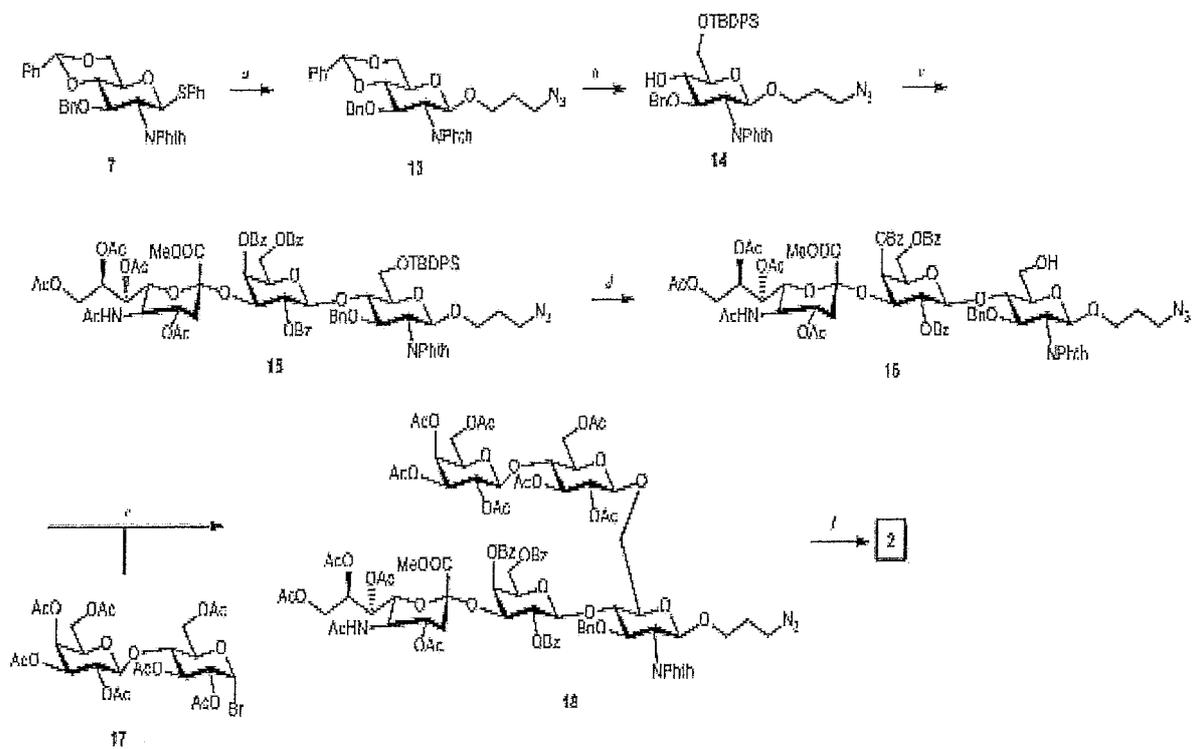


FIG. 6

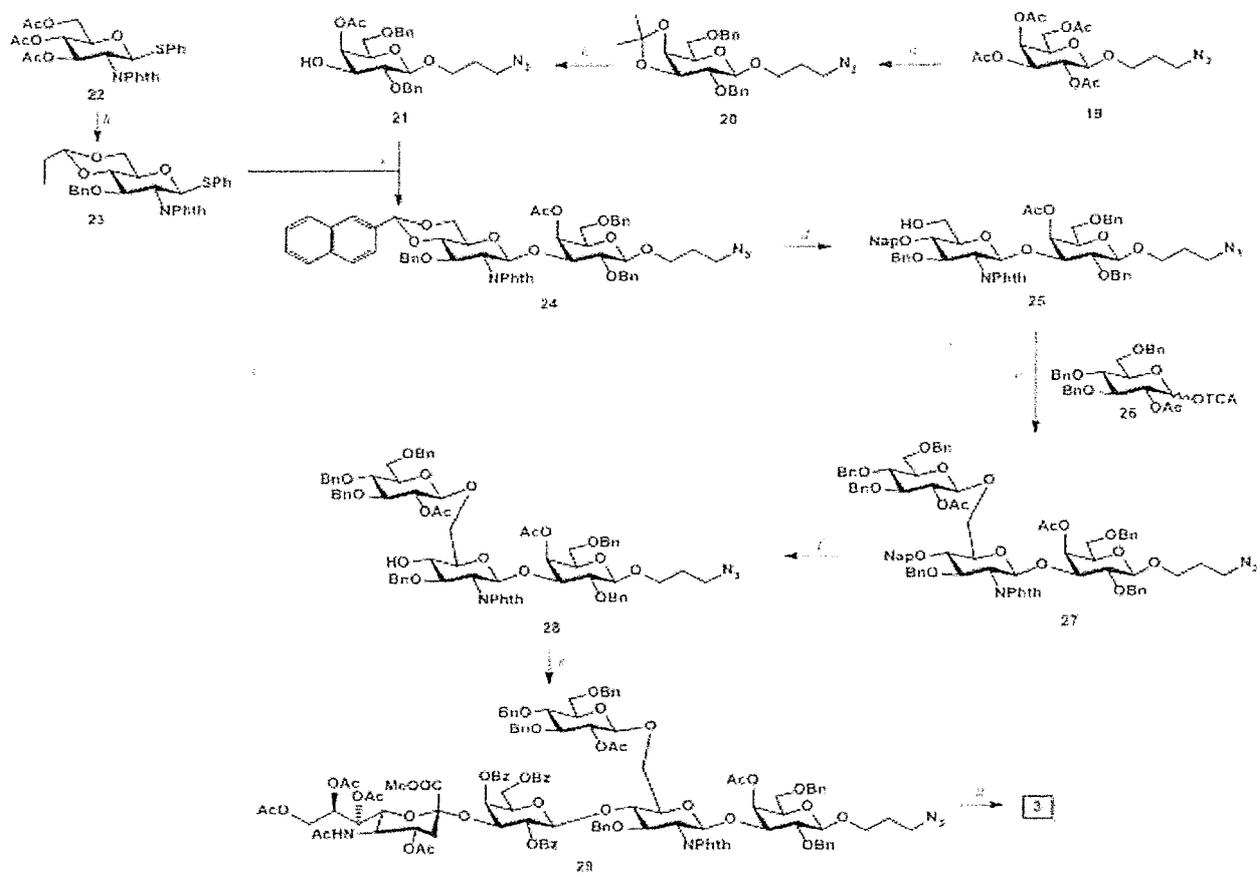
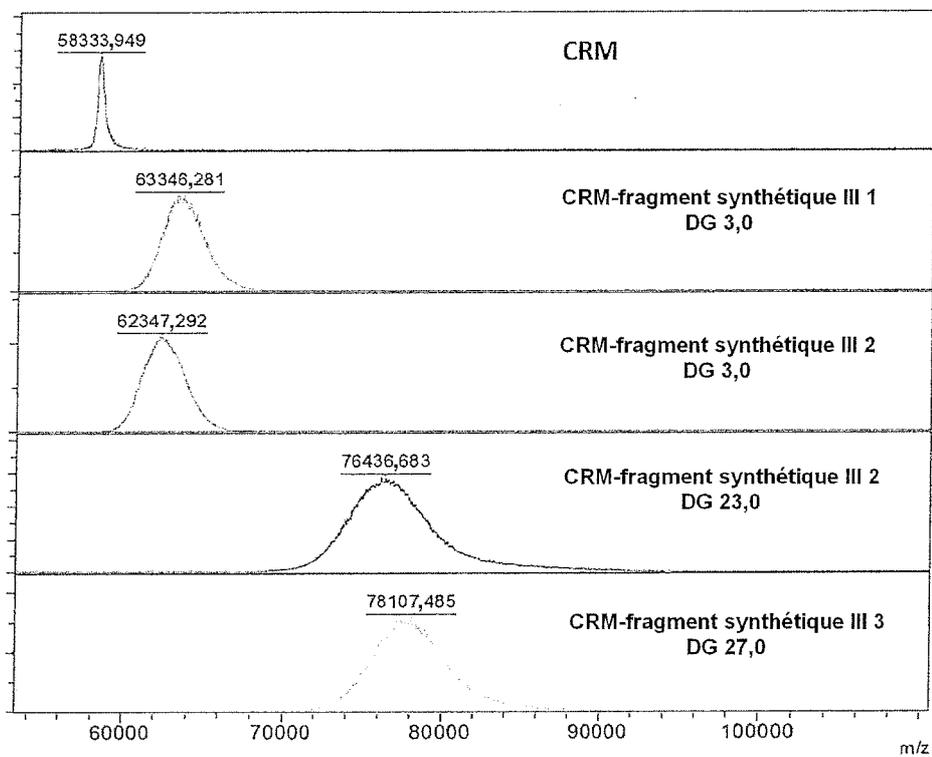


FIG. 7

FIG. 8A



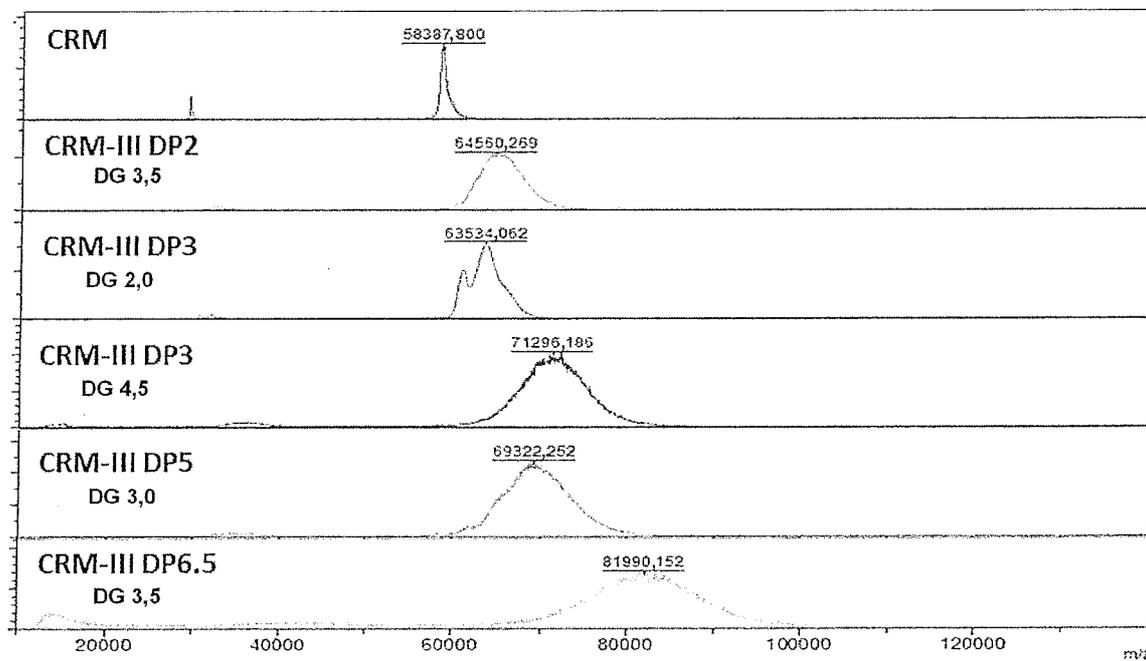


FIG. 8B

FIG. 9A

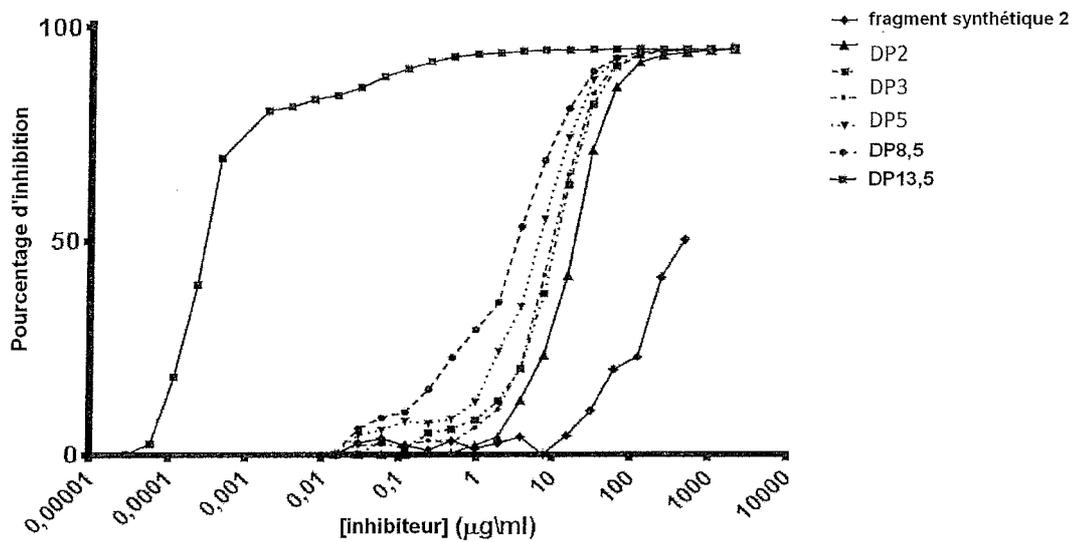


FIG. 9B

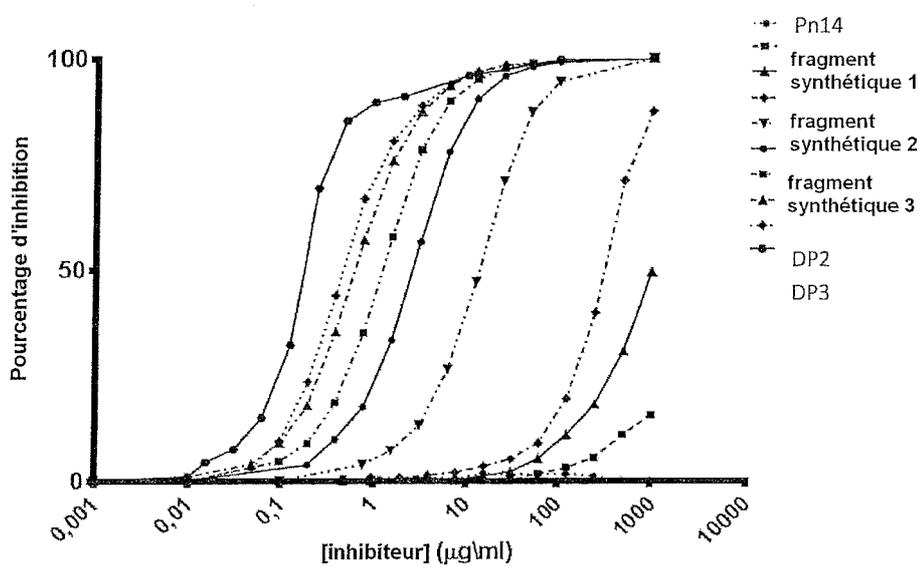


FIG. 10

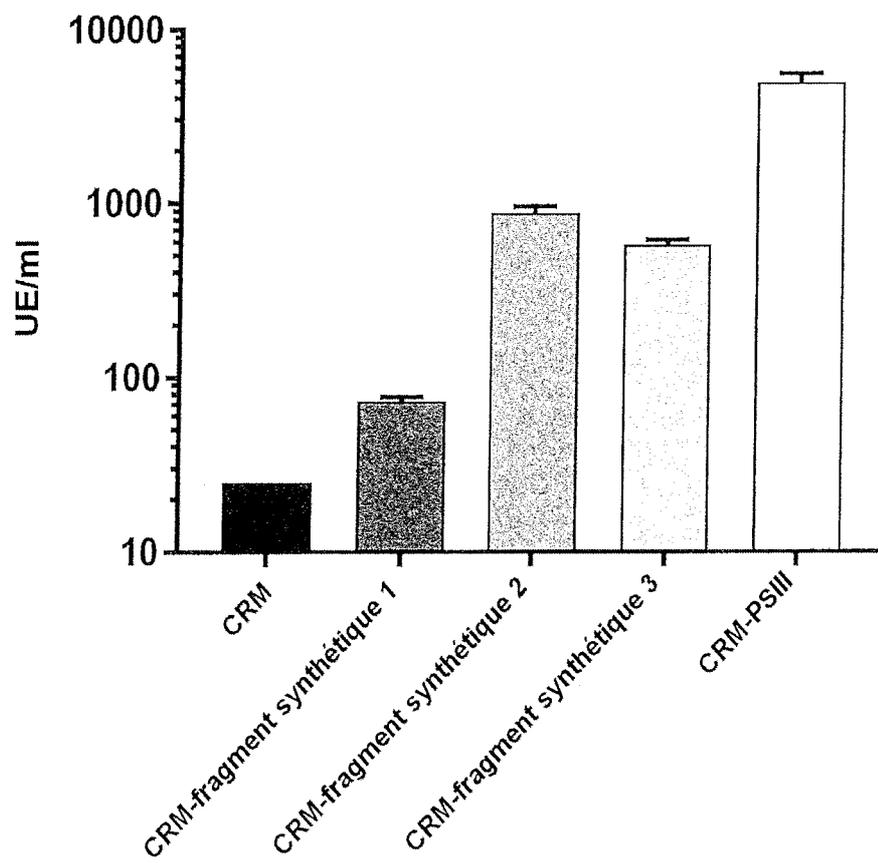
*Titres ELISA des IgG*

FIG. 11A

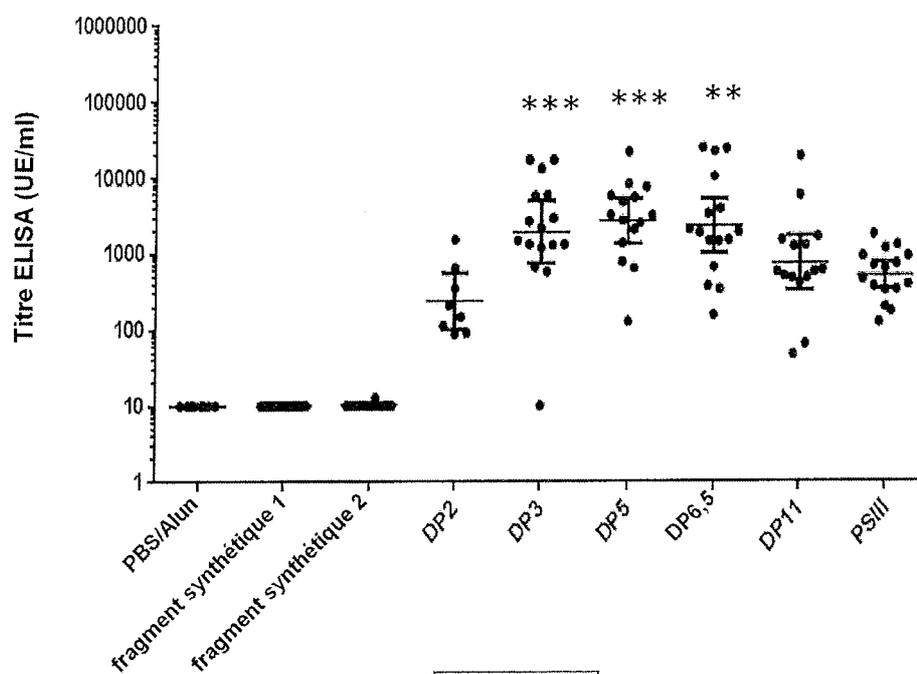


FIG. 11B

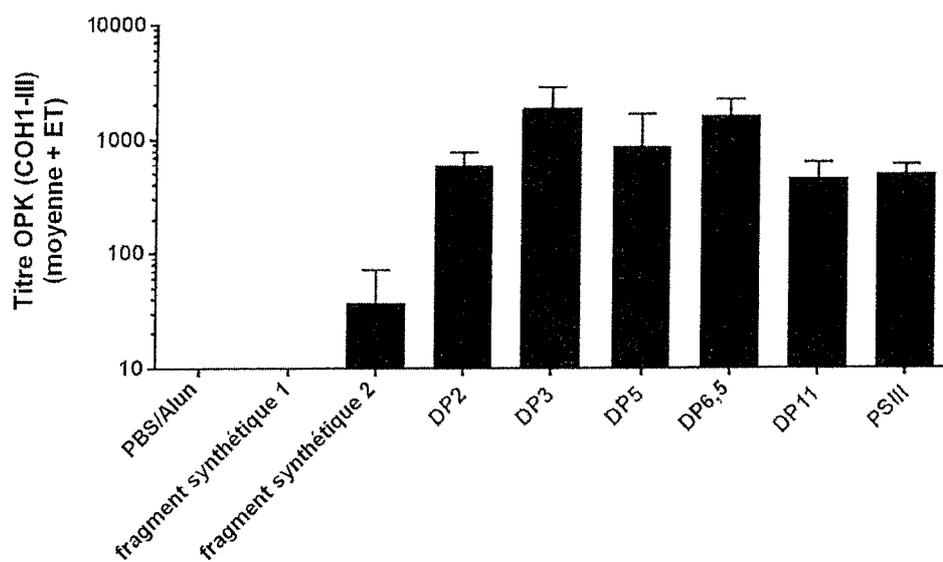


FIG. 12A

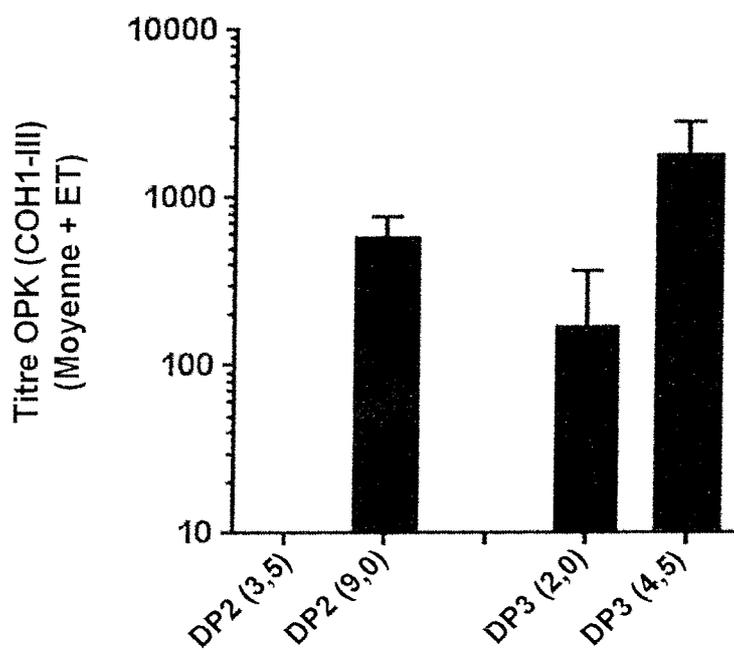
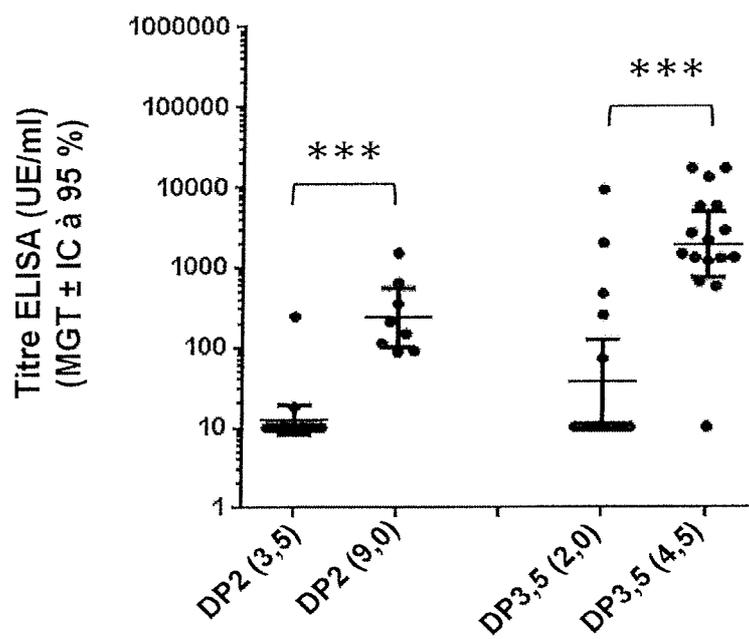


FIG. 12B

ABRÉGÉCOMPOSITIONS IMMUNOGÈNES

5

La présente invention concerne des conjugués comprenant des fragments du polysaccharide capsulaire du streptocoque du groupe B (SGB) de type III. Les fragments appropriés peuvent être produits par synthèse ou par

10

dépolymérisation du polysaccharide natif.



**RAPPORT DE RECHERCHE**  
 établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
 de la loi belge sur les brevets d'invention  
 du 28 mars 1984

BO 11462  
 BE 201705163

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
X	ZOU W ET AL: "Oligosaccharide fragments of the type III group B streptococcal polysaccharide derived from <i>S. pneumoniae</i> type 14 capsular polysaccharide by a chemoenzymatic method", CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 309, no. 3, 1 juillet 1998 (1998-07-01), pages 297-301, XP004145715, ISSN: 0008-6215, DOI: 10.1016/S0008-6215(98)00134-7	1,6-8	INV. A61K47/64
Y	* abrégé; figure 1 * * page 300, colonne 1, dernier alinéa *	1,3-8	
X	ALBERTO NILO ET AL: "Exploring the Effect of Conjugation Site and Chemistry on the Immunogenicity of an anti-Group B Streptococcus Glycoconjugate Vaccine Based on GBS67 Pilus Protein and Type V Polysaccharide", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 26, no. 8, 19 août 2015 (2015-08-19), pages 1839-1849, XP055377046, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00365 * page 1840, colonne 2, alinéa 3; figure 1 * * page 1842; tableau 1 *	1,7,8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) A61K
	----- -/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 novembre 2017		Langer, Miren	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document interclassés		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 03 02 (06/04/05)



**RAPPORT DE RECHERCHE**  
 établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
 de la loi belge sur les brevets d'invention  
 du 28 mars 1984

BO 11462  
 BE 201705163

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
Y	FIKRI Y AVCI ET AL: "A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design", NATURE MEDICINE, vol. 17, no. 12, 20 novembre 2011 (2011-11-20), pages 1602-1609, XP055179286, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm.2535 * abrégé * * page 1606, colonne 2, alinéa 3 * * page 1608, colonne 1, alinéa 1 *	1,3-8	
Y,D	WO 2011/121576 A2 (NOVARTIS AG [CH]; GRANDI GUIDO [IT]; MAIONE DOMENICO [IT]; RINUADO DAN) 6 octobre 2011 (2011-10-06) * page 96 *	1,3-8	
A	X. SHEN ET AL: "Systemic and Mucosal Immune Responses in Mice after Mucosal Immunization with Group B Streptococcus Type III Capsular Polysaccharide-Cholera Toxin B Subunit Conjugate Vaccine", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 68, no. 10, 1 octobre 2000 (2000-10-01), pages 5749-5755, XP055303530, US ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.68.10.5749-5755.2000	1-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
A	WO 91/04335 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]) 4 avril 1991 (1991-04-04) -/--	1-8	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 novembre 2017		Langer, Miren	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document interclassés		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 03 02 (06/04/05)



**RAPPORT DE RECHERCHE**  
 établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
 de la loi belge sur les brevets d'invention  
 du 28 mars 1984

BO 11462  
 BE 201705163

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
A	POZSGAY V ET AL: "COMBINED CHEMICAL AND ENZYMIC SYNTHESIS OF A PENTASACCHARIDE REPEATING UNIT OF THE CAPSULAR POLYSACCHARIDE OF TYPE III GROUP B STREPTOCOCCUS AND ONE- AND TWO-DIMENSIONAL NMR SPECTROSCOPIC STUDIES", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 56, no. 10, 10 mai 1991 (1991-05-10), pages 3377-3385, XP000985128, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/J000010A037 -----	1-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
A	ALEXEI V. DEMCHENKO ET AL: "A Highly Convergent Synthesis of a Complex Oligosaccharide Derived from Group B Type III Streptococcus", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 66, no. 8, 1 avril 2001 (2001-04-01), pages 2547-2554, XP055303680, US ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/jo001477w -----	1-8	
A	WEI Z ET AL: "Synthesis and NMR assignment of two repeating units (decasaccharide) of the type III group B Streptococcus capsular polysaccharide and its<13> C-labeled and N-propionyl substituted sialic acid analogues", CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 295, 13 décembre 1996 (1996-12-13), pages 209-228, XP004071115, ISSN: 0008-6215, DOI: 10.1016/S0008-6215(96)00236-4 -----	1-8	
A,D	WO 2009/081276 A2 (NOVARTIS AG [CH]; COSTANTINO PAOLO [IT]; NORELLI FRANCESCO [IT]; BERTI) 2 juillet 2009 (2009-07-02) ----- -/-	1-8	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 novembre 2017		Langer, Miren	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document interclassés		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 (03.02.2016) 2



**RAPPORT DE RECHERCHE**  
 établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
 de la loi belge sur les brevets d'invention  
 du 28 mars 1984

BO 11462  
 BE 201705163

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
A	ALBERTO NILO ET AL: "Tyrosine-Directed Conjugation of Large Glycans to Proteins via Copper-Free Click Chemistry", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 25, no. 12, 17 décembre 2014 (2014-12-17), pages 2105-2111, XP055377050, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc500438h -----	1-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
A	ALBERTO NILO ET AL: "Anti-Group B Streptococcus Glycan-Conjugate Vaccines Using Pilus Protein GBS80 As Carrier and Antigen: Comparing Lysine and Tyrosine-directed Conjugation", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 10, no. 7, 17 juillet 2015 (2015-07-17), pages 1737-1746, XP055310601, US ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/acscchembio.5b00247 * page 1739; tableau 1 *	1-8	
T	FILIPPO CARBONI ET AL: "Structure of a protective epitope of group B Streptococcus type III capsular polysaccharide", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, vol. 114, no. 19, 9 mai 2017 (2017-05-09), pages 5017-5022, XP055377054, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1701885114 -----	1-8	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 novembre 2017		Langer, Miren	
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul                  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie                  A : arrière-plan technologique                  O : divulgation non-écrite                  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention                  E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date                  D : cité dans la demande                  L : cité pour d'autres raisons                  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 (03.02.2016) (4/4)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

B0 11462  
BE 201705163

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

14-11-2017

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2011121576	A2	06-10-2011	AU 2011234031	A1 25-10-2012
			CA 2795093	A1 06-10-2011
			CN 102917729	A 06-02-2013
			EP 2552477	A2 06-02-2013
			JP 5960121	B2 02-08-2016
			JP 2013523718	A 17-06-2013
			JP 2016098231	A 30-05-2016
			NZ 602693	A 25-07-2014
			SG 184151	A1 30-10-2012
			SG 10201502583V	A 28-05-2015
			US 2013071416	A1 21-03-2013
			US 2015343051	A1 03-12-2015
			US 2016362457	A1 15-12-2016
			US 2017296645	A1 19-10-2017
			WO 2011121576	A2 06-10-2011
			WO 9104335	A1
CA 2066036	A1 19-03-1991			
EP 0493521	A1 08-07-1992			
JP H05502157	A 22-04-1993			
WO 9104335	A1 04-04-1991			
WO 2009081276	A2	02-07-2009	AU 2008339553	A1 02-07-2009
			CA 2708878	A1 02-07-2009
			CN 101932698	A 29-12-2010
			EP 2235159	A2 06-10-2010
			EP 2891498	A1 08-07-2015
			ES 2535080	T3 05-05-2015
			JP 5465676	B2 09-04-2014
			JP 2011507501	A 10-03-2011
			JP 2014094012	A 22-05-2014
			NZ 586193	A 29-06-2012
			PT 2235159	E 13-05-2015
			US 2010272755	A1 28-10-2010
			US 2014011183	A1 09-01-2014
			US 2016137973	A1 19-05-2016
WO 2009081276	A2 02-07-2009			



## OPINION ÉCRITE

Dossier N° BO11462	Date du dépôt (jour/mois/année) 16.03.2017	Date de priorité (jour/mois/année) 05.04.2016	Demande n° BE201705163
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K47/64			
Déposant GSK Vaccines S.R.L.			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- Cadre n° I Base de l'opinion
- Cadre n° II Priorité
- Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle: citations et explications à l'appui de cette déclaration
- Cadre n° VI Certains documents cités
- Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Examineur

Langer, Miren

## OPINION ÉCRITE

Demande n°  
BE201705163

---

### Cadre n° I Base de l'opinion

---

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
  - a. Nature de l'élément:
    - un listage de la ou des séquences
    - un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
  - b. Type de support:
    - sur papier
    - sous forme électronique
  - c. Moment du dépôt ou de la remise:
    - contenu(s) dans la demande telle que déposée
    - déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
    - remis ultérieurement
3.  De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

---

**Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

---

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	2-5
	Non : Revendications	1, 6-8
Activité inventive	Oui : Revendications	2
	Non : Revendications	1, 3-8
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-8
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

---

**Cadre n° VIII Observations relatives à la demande**

---

voir feuille séparée

**Ad point V**

**Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1 ZOU W ET AL: "Oligosaccharide fragments of the type III group B streptococcal polysaccharide derived from *S. pneumoniae* type 14 capsular polysaccharide by a chemoenzymatic method", CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 309, no. 3, 1 juillet 1998 (1998-07-01), pages 297-301, XP004145715, ISSN: 0008-6215, DOI: 10.1016/S0008-6215(98)00134-7
- D2 ALBERTO NILO ET AL: "Exploring the Effect of Conjugation Site and Chemistry on the Immunogenicity of an anti-Group B Streptococcus Glycoconjugate Vaccine Based on GBS67 Pilus Protein and Type V Polysaccharide", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 26, no. 8, 19 août 2015 (2015-08-19), pages 1839-1849, XP055377046, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00365
- D3 FIKRI Y AVCI ET AL: "A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design", NATURE MEDICINE, vol. 17, no. 12, 20 novembre 2011 (2011-11-20), pages 1602-1609, XP055179286, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm.2535
- D4 WO 2011/121576 A2 (NOVARTIS AG [CH]; GRANDI GUIDO [IT]; MAIONE DOMENICO [IT]; RINUADO DAN) 6 octobre 2011 (2011-10-06)

**1.2 Nouveauté**

La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet de la revendication 1, 6, 7, 8 n'étant pas nouveau.

D1 divulgue des fragments oligosaccharidiques du polysaccharide d'un streptocoque du groupe B de type III comme représenté dans la figure 1 à la page 299. A la page 300 (colonne 1, dernier paragraphe), il est indiqué que les oligosaccharides sont

ensuite conjugués à des supports protéiques pour être utilisés comme immunogènes. Comme déjà mentionné au point VIII, le terme «degré de glycosylation» n'est pas clair et a donc été interprété dans son sens le plus large. Les oligosaccharides décrits dans la figure 1 comprennent plusieurs molécules de glucose par saccharide, de sorte qu'ils ont le degré de glycosylation revendiqué. En ce qui concerne la quantité de l'unité répétitives, les oligosaccharides représentés sur la figure 1 ont tous de 1 à 5 unités répétitives. De même, le tableau 1 à la page 298 donne un aperçu de la quantité d'unités répétitives d'oligosaccharides de GBS III qui varie de 1 à 5. D1 détruit donc la nouveauté des revendications 1, 6-8.

D2 décrit un conjugué selon la revendication 1, qui comprend un polysaccharide modifié de GBS de type III répondant à la définition d'un fragment qui a 7 unités répétitives (page 1840, colonne 2, paragraphe 3, figure 1). Le degré de glycosylation tombe dans la gamme revendiquée, comme on peut le voir dans le tableau 1, page 1842, "saccharide: rapport protéique dans le conjugué". D2 détruit donc la nouveauté des revendications 1, 7 et 8.

### **1.3 Activité inventive**

La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet de la revendication 3-5 n'impliquant pas d'activité inventive.

D1 est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 2-5.

Par conséquent, l'objet de la revendication 3-5 diffère de ce conjugué connu en ce que un protéine porteuse spécifique est utilisé ou en ce que une synthèse différente est décrit.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme la mise à disposition des alternatives.

La solution proposée dans la revendication 3-5 de la présente demande ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive.

La présentation des protéines porteuses alternatives est connue de D3 (page 1602, colonne 2, dernier paragraphe). Différentes manières de produire les oligosaccharides comme la dépolymérisation ou la synthèse chimique sont décrites à la page 96 de D4.

Par conséquent, l'objet de la revendication 2 diffère de ce conjugué connu en ce que des conjugués avec une structure spécifique défini par la formule Markush de la revendication 2 sont proposés.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme présentation d'un vaccin effective.

La solution proposée dans la revendication 2 de la présente demande peut être considérée comme impliquant une activité inventive.

Des conjugués avec une structure spécifique défini par la formule Markush de revendication 2 sont pas décrit dans l'art antérieur. Pour arriver à la structure revendiquée, il faut effectuer un certain nombre de modifications qui ne sont pas évidentes à partir de D1 en tant qu'art antérieur le plus proche.

### **Ad point VIII**

#### **Certaines observations relatives à la demande**

Le terme «degré de glycosylation» employé dans la revendication 1 est vague et imprécis, et laisse subsister un doute quant à la signification de la caractéristique technique à laquelle il se rapporte, au point que l'objet de ladite revendication n'est pas clairement défini.

Une définition d'un degré de glycosylation est donnée à la page 7, 2ème par, cependant, cette définition n'est pas dans la revendication 1. Le terme de degré de glycosylation pourrait être compris comme la quantité de molécules de glucose par saccharide ou par protéine rendant ainsi ladite revendication peu claire. Afin de rendre la revendication claire, une définition du degré de glycosylation doit être incorporée dans la revendication 1.